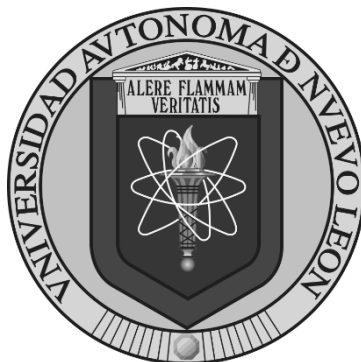


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PARTICIPACIÓN DE ECCD3 EN EL FENÓMENO DE FARMACORRESISTENCIA
EN *MYCOLICIBACTERIUM SMEGMATIS* Y SU EVALUACIÓN COMO BLANCO
FARMACOLÓGICO

Por

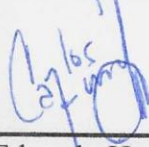
ANA LAURA GRANADOS TRISTÁN

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2023

PARTICIPACIÓN DE ECCD3 EN EL FENÓMENO DE
FARMACORRESISTENCIA EN *MYCOLICIBACTERIUM*
SMEGMATIS Y SU EVALUACIÓN COMO
BLANCO FARMACOLÓGICO

Comité de Tesis



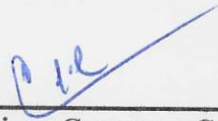
Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Presidente



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Secretario



Dra. Katia Peñuelas Urquides
Vocal



Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Vocal

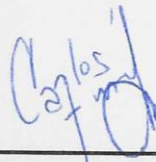


Dra. Licet Villareal Treviño
Vocal

Subdirector de Posgrado

PARTICIPACIÓN DE ECCD3 EN EL FENÓMENO DE
FARMACORRESISTENCIA EN *MYCOLICIBACTERIUM*
SMEGMATIS Y SU EVALUACIÓN COMO
BLANCO FARMACOLÓGICO

Dirección de Tesis



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

Director Interno



Dra. Katia Peñuelas Urquides

Directora Externo

AVISO DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías por el apoyo económico para la realización de mis estudios de Doctorado otorgándome la beca con número 462073.

Gracias a la Subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por la formación académica y a todos los catedráticos por orientarme e impulsarme en la ciencia. Gracias al Laboratorio de Enzimología de la Facultad de Ciencias Biológicas y al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS por permitir el desarrollo de esta investigación, bajo el proyecto “Evaluación del transportador EccD3, componente del sistema de secreción ESX3 y su impacto en el fenómeno de farmacorresistencia en *M. smegmatis*” con número “R-2020-785-175”.

Gracias a la Dra. Katia Peñuelas Urquides por todo su apoyo en cada paso y orientación en este camino llamado ciencia, por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y su impulso para mi crecimiento profesional y personal; gracias por compartir todo ese conocimiento necesario para generar productos de excelente calidad científica y mostrarme con el ejemplo. Gracias al Dr. Carlos Hernández Luna por sus valiosos consejos, apoyo, motivación, orientación y compromiso para la realización del presente proyecto. Gracias al Dr. Mario Bermúdez de León por su apoyo, asesoramiento, consejos, orientación, compromiso y paciencia, para compartir sus conocimientos y experiencias, impulsando mi crecimiento profesional y personal. Gracias al Dr. Mauricio Carillo Tripp por su orientación, compromiso y por compartir sus conocimientos para realizar la parte *in silico* de este proyecto. Gracias a la Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal, a la Dra. Lizeth Villareal Treviño y al Dr. Juan Francisco Contreras Cordero por ser parte del comité de tesis, por su tiempo, compromiso, consejos y conocimientos para poder realizar el proyecto. Gracias a mis padres Fernando y Laura, a mis hermanas y a mi familia por estar apoyándome en este camino. Gracias a todos mis compañeros del laboratorio por sus consejos, enseñanzas, ánimos y por compartir sus experiencias. Gracias a todas las personas que estuvieron conmigo durante la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A mi familia porque siempre está ahí conmigo, apoyándome.

A todo el conjunto de células eucariotas y procariotas que lograron hacer este proyecto posible.

“En algún lugar, algo increíble está esperando a ser descubierto”.

Carl Sagan

ÍNDICE

Contenido	Página
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	V
ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XV
RESUMEN.....	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Tuberculosis.	3
2.2. Micobacterias.	4
2.2.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.3. Tratamiento de la Tuberculosis.	6
2.4. Tuberculosis resistente a fármacos.	7
2.5. Sistema de secreción Esx3	10
2.5.1. EccD3.....	13
2.6. Estrategias para el estudio de genes de <i>M. tuberculosis</i>	14
2.6.1. CRISPR (sistema de repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas) de interferencia.....	14
2.6.2. Técnicas bioinformáticas para el estudio de producto génicos.....	15
2.7. Modelos para estudiar <i>M. tuberculosis</i>	16
2.7.1. <i>Mycobacterium smegmatis</i>	16
2.8. Sistema de secreción ESX3 en <i>M. smegmatis</i>	17
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	20
5.1. Objetivo general.	20
5.2. Objetivos particulares.....	20

6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. Cultivo de cepas bacterianas.	21
6.1.1 Cultivo de <i>E. coli</i>	21
6.1.2. Cultivo de <i>M. smegmatis</i>	21
6.2. Evaluación de la secuencia del gen <i>eccD3</i> de <i>M. smegmatis</i> y <i>M. tuberculosis</i> . ..	21
6.3. Construcción del plásmido PLJR962 con los elementos para inhibir el gen <i>eccD3</i> mediante CRISPRi.	22
6.3.1. Diseño del RNA guía para inhibir el gen <i>eccD3</i>	22
6.3.2. Clonación del RNAg en el vector PLJR962	23
6.3.2.1. Diseño del gblock de los genes <i>eccD3</i> , <i>mmpL3</i> y scramble.	23
6.3.2.2. Clonación del RNAg.	25
6.3.3. Caracterización de la construcción pLJR962-RNAg- <i>eccD3</i>	26
6.4. Generación de la cepa de <i>M. smegmatis</i> transformada.....	28
6.5. Evaluación de la inhibición del gen <i>eccD3</i> en <i>M. smegmatis</i>	29
6.5.1. Evaluación fenotípica de la inhibición del gen <i>eccD3</i> en <i>M. smegmatis</i>	30
6.5.1.1. Análisis estadístico de la evaluación fenotípica.....	30
6.5.2. Evaluación genotípica de la inhibición del gen <i>eccD3</i> en <i>M. smegmatis</i>	31
6.5.2.1. Extracción de RNA total de las cepas de <i>M. smegmatis</i>	31
6.5.2.2. Síntesis de cDNA de las cepas de <i>M. smegmatis</i>	31
6.5.2.3. PCR en tiempo real del gen <i>eccD3</i>	33
6.6. Evaluación de la susceptibilidad de las cepas de <i>M. smegmatis</i> a fármacos antituberculosis.....	34
6.6.1. Método de microdilución en placa con el compuesto de resazurina.	35
6.6.2. Curvas de crecimiento bacteriano.....	36
6.7. Evaluación del potencial farmacológico de EccD3 y proteínas del sistema de secreción ESX3	37
6.7.1. Obtención de la estructura tridimensional de las proteínas del sistema ESX3.	37
6.7.2. Obtención de la estructura 3D de los ligandos.	38
6.7.3. Selección del sitio de unión de ligandos.	41
6.7.4. Acoplamiento molecular.....	41

6.7.5. Estadística para el acoplamiento molecular.....	42
6.8. Evaluación de las propiedades de las avermectinas.	43
6.9. Evaluación de la inhibición del gen <i>eccD3</i> en presencia de ivermectina.....	43
7. RESULTADOS.....	45
7.1. Comparación de las secuencias del gen <i>eccD3</i> entre <i>M. smegmatis</i> y <i>M. tuberculosis</i>	45
7.2. Evaluación de la susceptibilidad de las cepas de <i>M. smegmatis</i> a los fármacos antituberculosis.....	46
7.2.1. Construcción del vector PLJR962 con el RNAg.	47
7.3. Evaluación de la inhibición del gen <i>eccD3</i> en <i>M. smegmatis</i>	49
7.3.1. Análisis fenotípico de la inhibición del gen <i>eccD3</i>	49
7.3.2. Análisis genotípico de la inhibición del gen <i>eccD3</i>	51
7.4. Evaluación de la susceptibilidad de cepas de <i>M. smegmatis</i> a fármacos antituberculosis.....	55
7.5. Evaluación del potencial farmacológico de la proteína EccD3 y los componentes del sistema de secreción ESX3.....	63
7.5.1. Obtención de la estructura 3D de las proteínas del sistema ESX3.	64
7.5.2. Selección del sitio de unión de fármacos del sistema de secreción ESX3.	67
7.5.3. Acoplamiento molecular entre las proteínas y los fármacos.	70
7.5.4. Análisis de propiedades de los fármacos de la familia de las avermectinas...80	
7.6. Evaluación de la inhibición del gen <i>eccD3</i> en presencia de Ivermectina.....	82
8. DISCUSIÓN	87
8.1. Efecto de la inhibición del gen <i>eccD3</i> en el fenómeno de resistencia a fármacos.	87
8.2. Potencial farmacológico de la proteína EccD3 y de las proteínas estructurales del sistema de secreción ESX3.....	90
8.3. Evaluación del efecto de la inhibición del gen <i>eccD3</i> en presencia de ivermectina.	93
9. CONCLUSIONES	94
10. PERSPECTIVAS	95
11. ANEXOS	96

11.1. Anexo A. Alineamiento de la secuencia del RNAg-scramble con el genoma de <i>M. smegmatis</i>	96
11.2 Anexo B. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen <i>eccD3</i> de <i>M. smegmatis</i> y <i>M. tuberculosis</i>	97
11.3. Anexo C. Ensayo de microdilución en placa con resazurina de diferentes fármacos.	98
11.4. Anexo D. Curvas de crecimiento de la cepa de <i>M. smegmatis</i> PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i> en presencia de diferentes concentraciones de rifampicina.	102
11.5. Anexo E. Curva de crecimiento de la cepa de <i>M. smegmatis</i> PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i> en presencia de diferentes concentraciones de linezolid.	103
11.6. Anexo F. Curva de crecimiento de la cepa <i>M. smegmatis</i> PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i> en presencia de diferentes concentraciones de bedaquilina.	104
11.7. Anexo G. Tablas comparativas sobre la calidad de los modelos 6UMM y 6SGW obtenidos de las proteínas del sistema de secreción ESX3.	105
11.8. Anexo H. Gráficas de los resultados del ΔG obtenido del acoplamiento molecular de la interacción fármaco-proteína.	107
11.9. Anexo I. Curvas de crecimiento de la cepa <i>M. smegmatis</i> PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i> en presencia de diferentes concentraciones de ivermectina.	113
11.10. Anexo J. Productos de difusión de la ciencia. Asistencia a congresos y publicaciones.	114
12. BIBLIOGRAFÍA	121

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla 1. Fármacos utilizados contra la TB.....	6
Tabla 2. Definiciones de la TB resistente a fármacos de acuerdo con la OMS.	7
Tabla 3. Mutaciones asociadas a la resistencia a fármacos anti-TB.	9
Tabla 4. RNA guías utilizados en el presente estudio.....	23
Tabla 5. Secuencias utilizadas para el sitio múltiple de clonación en el gblock.....	24
Tabla 6. Cálculos para la reacción de amplificación de identificación de la construcción pLJR962-RNAg- <i>eccD3</i>	27
Tabla 7. Primers utilizados para caracterizar la construcción pLJR962-RNAg- <i>eccD3</i> ...	27
Tabla 8. Cálculos para amplificar el gen <i>sigA</i>	32
Tabla 9. Sondas TaqMan utilizadas.	33
Tabla 10. Solubilidad y concentración del stock de fármacos anti-TB.....	34
Tabla 11. CMI y rangos de los fármacos antituberculosis utilizados.	35
Tabla 12. Secuencia aminoacídica de las proteínas del sistema de secreción ESX3.	37
Tabla 13. Moléculas utilizadas como ligandos en el presente estudio.....	39
Tabla 14. Características seleccionadas para cada uno de los ligandos.	40
Tabla 15. Coordenadas de las cajas de muestra de cada sitio seleccionado.	41
Tabla 16. Resultados del alineamiento de las secuencias del clúster de genes ESX3 de <i>M. smegmatis</i> y <i>M. tuberculosis</i>	45
Tabla 17. Resultados del alineamiento de las secuencias del gen <i>eccD3</i> de <i>M. smegmatis</i> y <i>M. tuberculosis</i>	45
Tabla 18. Resultados del alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los componentes del clúster de genes del sistema de secreción ESX3.	46
Tabla 19. Promedio de las UFC/mL de cada una de las cepas en presencia o ausencia de ATc.	50
Tabla 20. Concentraciones de RNA de cada cepa de <i>M. smegmatis</i>	52
Tabla 21. Comparación de las estructuras del sistema de secreción ESX3 de <i>M. tuberculosis</i> contra <i>M. smegmatis</i>	64
Tabla 22. Valores de la minimización de energía de la estructura 3D de la proteína EccB3- dominio periplásmico.	65

Tabla 23.Tabla de los aminoácidos de los sitios de unión seleccionados en el sistema ESX3.	69
Tabla 24. Menor energía de unión de cada acoplamiento molecular de cada uno del par proteína-ligando evaluados y valores Z-scores.	71
Tabla 25.Aminoácidos del sitio activo del dominio ATPasa III de EccC3 que interactúan con el ATP.	77
Tabla 26.Actividad biológica de las avermectinas.....	80
Tabla 27.Toxicidad de las avermectinas.	81
Tabla 28.Propiedades ADME de las avermectinas.	81
Tabla G1.1. Calidad de los modelos de las proteínas del protómero 1 del sistema de secreción ESX3.	105
Tabla G1.2. Calidad de los modelos de las proteínas del protómero 1 del sistema de secreción ESX3.	105
Tabla G2.1. Calidad de los modelos de las proteínas del protómero 2 del sistema de secreción ESX3.	106
Tabla G2.2. Calidad de los modelos de las proteínas del protómero 2 del sistema de secreción ESX3.	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Operón del sistema de secreción ESX3 y su región reguladora.	12
Figura 2. Estructura 3D de la proteína EccD3. Estructura obtenida del PDB 6UMM	13
Figura 3. Estrategia para el diseño y clonación del RNAg en el vector PLJR962.....	22
Figura 4. Identificación de los sitios de enzimas de restricción en el vector PLJR962. ..	24
Figura 5. Características de la secuencia del gblock para clonar el RNAg-eccD3.	25
Figura 6. Estrategia para identificar la construcción pLJR962-RNAg-eccD3.....	27
Figura 7. Caracterización de la construcción PLJR962-RNAg-eccD3 en <i>E. coli</i>	48
Figura 8. Caracterización de la construcción PLJR962-RNAg-eccD3 en <i>M. smegmatis</i> . ..	49
Figura 9. Evaluación fenotípica de la inhibición por CRISPRi	51
Figura 10. Evaluación de la calidad del RNA con tratamiento de DNAsa.	52
Figura 11. Evaluación de la funcionalidad del cDNA de cada cepa	53
Figura 12. Rango dinámico y eficiencia de amplificación del gen <i>eccD3</i> de <i>M. smegmatis</i>	54
Figura 13. Expresión relativa del gen <i>eccD3</i> en diferentes cepas de <i>M. smegmatis</i>	55
Figura 14. CMI de isoniazida y rifampicina en <i>M. smegmatis</i> mc2 155	56
Figura 15. CMI de fármacos de segunda línea en <i>M. smegmatis</i> wild type.....	57
Figura 16. CMI de rifampicina <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg-eccD3.....	58
Figura 17. CMI de linezolid <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg-eccD3	59
Figura 18. CMI de bedaquilina <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg-eccD3.....	60
Figura 19. Curva de crecimiento de las cepas de <i>M. smegmatis</i> utilizadas en este estudio.	61
Figura 20. Curva de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg-eccD3 en presencia de rifampicina.....	62
Figura 21. Curva de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg-eccD3 en presencia de linezolid.....	63
Figura 22. Gráfica de los valores de la minimización de energía de la estructura EccB3- dominio periplásmico.....	66
Figura 23. Modelo de proteínas del sistema de secreción ESX3 de <i>M. tuberculosis</i>	67
Figura 24. Sitio de unión a fármacos del dominio ATPasa III de la proteína EccD3.	67

Figura 25. Resultados de PDBePISA del dímero del dominio periplásmico de EccB3 de <i>M. tuberculosis</i> .	68
Figura 26. Resultados de PDBePISA del dímero de los monómeros de EccD3 de <i>M. tuberculosis</i> .	68
Figura 27. Resultados de PDBePISA del dímero de los protómeros del sistema de secreción ESX3 de <i>M. tuberculosis</i> .	68
Figura 28. Sitios de unión de fármacos seleccionados en las interfaces del sistema de secreción ESX3 de <i>M. tuberculosis</i> .	69
Figura 29. Mapa de calor del análisis por columnas de los valores Z basados en el valor ΔG de la interacción del par proteína-fármaco	72
Figura 30. Mapa de calor del análisis por filas de los valores Z basados en el valor ΔG de la interacción del par proteína-fármaco.	73
Figura 31. Acoplamiento molecular de EccB3 y fármacos	74
Figura 32. Acoplamiento molecular entre EccD3 y fármacos	75
Figura 33. Acoplamiento molecular entre el protómero 1 del sistema de secreción ESX3 y fármacos	76
Figura 34. Acoplamiento molecular entre el protómero 2 del sistema de secreción ESX3 y fármacos.	76
Figura 35. Acoplamiento molecular del ATP con el dominio ATPasa III de la proteína EccC3.	78
Figura 37. Interacción del canal de cloro con la ivermectina.	80
Figura 39. CMI de la ivermectina en <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i> .	83
Figura 40. CMI de la ivermectina en <i>M. smegmatis</i> PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i> .	83
Figura 41. CMI de la ivermectina en <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg-scramble.	84
Figura 42. CMI de la ivermectina en <i>M. smegmatis</i> PLJR962-RNAg-scramble.	84
Figura 43. Curva de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i> en presencia de ivermectina	85
Figura 44. Curva de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i> en presencia de ivermectina.	86
Figura A1. Alineamiento del RNAg-scramble contra el genoma de <i>M. smegmatis</i> .	96

Figura B1. Alineamiento de las secuencias del gen <i>eccD3</i> de <i>M. smegmatis</i> y <i>M. tuberculosis</i>	97
Figura C1. CMI de isoniazida <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i>	98
Figura C2. CMI de levofloxacin <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i>	99
Figura C3. CMI de moxifloxacin <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i>	100
Figura C4. CMI de protionamida <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i>	101
Figura D1. Curva de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i> en presencia de rifampicina.	102
Figura E1. Curva de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i> en presencia de linezolid.	103
Figura F1. Curva de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i> en presencia de bedaquilina.	104
Figura H1. Acoplamiento molecular entre el sitio del dominio ATPasa III de la proteína EccC3 <i>M. tuberculosis</i> y los fármacos seleccionados.	107
Figura H2. Acoplamiento molecular entre el sitio EccB3 de <i>M. tuberculosis</i> y los fármacos seleccionados.	108
Figura H3. Acoplamiento molecular entre el sitio EccD3 N-terminal de <i>M. tuberculosis</i> y los fármacos seleccionados.	109
Figura H4. Acoplamiento molecular entre el sitio EccD3 C-terminal de <i>M. tuberculosis</i> y los fármacos seleccionados.	110
Figura H5. Acoplamiento molecular entre el sitio ESX3 protómero 1 de <i>M. tuberculosis</i> y los fármacos seleccionados.	111
Figura H6. Acoplamiento molecular entre el sitio ESX3 protómero 2 de <i>M. tuberculosis</i> y los fármacos seleccionados.	112
Figura I1. Curva de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> -PLJR962-RNAg- <i>eccD3</i> en presencia de ivermectina.	113

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
Pb	Pares de bases
Kpb	Kilopares de bases (mil pares de bases)
Mpb	Megapares de bases (1 millón de pares de bases)
mM	Milimolar
c/u	Cada uno
Ng	Nanogramo
μL	Microlitro
μg	Microgramo
μm	Micrómetro
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TB	Tuberculosis
CIBIN99	Aislado clínico de <i>M. tuberculosis</i> CIBIN:UMF:15:99
H37Rv	Cepa de referencia de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
MFR	Multifarmacorresistente
XFR	Tuberculosis con resistencia extendida
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CRISPR	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas
CRISPRi	CRISPR de interferencia
RNAg	RNA guía
Nm	Nanómetro

U	Unidades
°C	Grados centígrados
rpm	Revoluciones por minuto
g	Gravedades
LB	Medio Luria Bertani
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
INH	Isoniazida
RIF	Rifampicina
EMB	Etambutol
PZA	Pirazinamida
MPM	Marcador de peso molecular
MTBC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MNT	Micobacterias no tuberculosas
OMS	Organización Mundial de la Salud
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
CENAPRECE	Centro nacional de programas preventivos y control de enfermedades
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
H ₂ O NF	Agua libre de nucleasas
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
REMA	Método de microdilución en placa con resazurina
CMI	Concentración mínima inhibitoria
5' y 3'	Cinco prima y tres prima
aa	Aminoácidos
PDB	Protein Data Bank

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, y representa un gran problema debido a que existe resistencia a su tratamiento. Se ha identificado que ciertas mutaciones causan la resistencia a fármacos, sin embargo, no siempre existe esta relación. Con la finalidad de encontrar marcadores moleculares relacionados a este fenómeno de resistencia a fármacos, nuestro grupo de trabajo encontró que los genes *esxG* y *esxH* están sobre-expresados en una cepa resistente a fármacos de *M. tuberculosis*. Además, estos genes están vinculados con la resistencia a isoniazida y rifampicina, al inhibirlos o expresarlos heterológamente. Estos genes forman parte de un locus que codifica para el sistema de secreción ESX3. El sistema de secreción ESX3 es esencial para la viabilidad, tiene un rol en la homeostasis del zinc/hierro y en la virulencia de *M. tuberculosis*. Al realizar una mutante del gen que codifica a la proteína EccD3, componente principal de la estructura del sistema de secreción ESX3, encontraron que aumenta la resistencia a rifampicina, isoniazida y etambutol. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es estudiar la participación de EccD3 en el fenómeno de farmacoresistencia en *Mycobacterium smegmatis* y evaluar su potencial farmacológico. Para cumplir con el objetivo se generó la mutante *M. smegmatis* PLJR962-RNAg-*eccD3* la cual contiene el sistema CRISPRi para inhibir el gen *eccD3*, y posterior evaluar sus efectos en presencia de fármacos antituberculosis de segunda línea. Además, se realizaron análisis *in silico* para evaluar el potencial farmacológico de EccD3 y de los componentes estructurales del sistema de secreción ESX3. Encontrando que al inhibir *eccD3* en *M. smegmatis* se observa un aumento en la resistencia a rifampicina y un aumento en la sensibilidad hacia linezolid. En los análisis *in silico* se encontró que la avermectina, ivermectina, moxidectina y selamectina interactúan en las interfaces de las proteínas de las interacciones del sistema de secreción ESX3. Se evaluó la inhibición del gen *eccD3* en presencia de ivermectina, encontrando que aumenta la sensibilidad de este fármaco al inhibir el gen. Como conclusión se observa que la inhibición de *eccD3* en *M. smegmatis* genera resistencia a rifampicina y sensibilidad a linezolid e ivermectina, además la avermectina, moxidectina y selamectina, presentan potencial farmacológico para inhibir la estructura del sistema ESX3 que causaría una inhibición en la viabilidad de *M. tuberculosis*.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is caused by *Mycobacterium tuberculosis* and this disease is a health issue due to drug resistant. The identification of some mutations that cause drug resistant have been shown, however this relation does not always exist. To identify new drug resistant molecular targets our group found that *esxG* and *esxH* genes are overexpressed in a resistant strain of *M. tuberculosis*. Furthermore, these genes were inhibited and heterologous expressed, showing a link with isoniazid and rifampicin resistance. The *esxG* and *esxH* genes are in the ESX3 locus that codify the ESX3 secretions system. This secretion system is essential for the survival of *M. tuberculosis* and plays a role in iron/zinc homeostasis and virulence. A mycobacteria knockout of *eccD3* gene showed rifampicin, isoniazid, and ethambutol resistance. Therefore, the aim of this study was to evaluate *eccD3* gene in *Mycobacterium smegmatis* resistant phenomena and to evaluated pharmacologic potential of EccD3 and the other structural proteins of the ESX3 secretion system. We produced *M. smegmatis* PLJR962-RNAg-*eccD3* strain using CRISPRi system to inhibit *eccD3* gene and to evaluated in presence of antituberculosis second line drugs. Besides, *in silico* analysis were performed to evaluated drug interactions with EccD3 and structural proteins of ESX3 secretion system. In this study an increase in rifampicin resistance and in linezolid susceptible were found by *eccD3* inhibition. Avermectin, ivermectin, moxidectin and selamectina showed interactions with amino acids of ESX3 secretion system interfaces in the *in silico* analysis. Subsequently, *eccD3* gene inhibition was evaluated in the presence of ivermectin showing an increase in susceptibility to this drug in *M. smegmatis* PLJR962-RNAg-*eccD3* strain. As conclusion *eccD3* inhibition in *M. smegmatis* cause rifampicin resistance and linezolid and ivermectin susceptibility, besides avermectin, moxidectin, and selamectin have pharmacological potential to interact with ESX3 secretion system interfaces and may produce *M. tuberculosis* viability reduction.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que ha causado millones de muertes a lo largo de la historia de la humanidad afectando diferentes partes del cuerpo humano; sin embargo, en la mayoría de los casos afecta a los pulmones, denominándose tuberculosis pulmonar (Lyon y Rossman 2017). Esta enfermedad es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* pero existen otras bacterias que pertenecen al complejo de *M. tuberculosis* que provocan la enfermedad ya sea en humanos o en otros animales (Delogu et al. 2013; Brosch et al. 2002). El tratamiento de esta enfermedad se basa en antibióticos de primera línea los cuales son isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida, no obstante, la aparición de la tuberculosis resistente a fármacos provoca que aumente el control de esta enfermedad (WHO 2022a). Existen mecanismos moleculares completamente descritos que causan este fenómeno de resistencia a fármacos los cuales permiten que la bacteria pueda sobrevivir al estrés provocado por el tratamiento, estos mecanismos son ocasionados por mutaciones en ciertos genes que provocan la resistencia a fármacos (Almeida Da Silva y Palomino 2011). Es así como existen mutaciones ya conocidas asociadas al fenómeno de resistencia lo que ha permitido un diagnóstico oportuno de casos de pacientes con tuberculosis resistente a rifampicina; sin embargo, existen casos en los que ocurre este fenómeno sin la presencia de las mutaciones ya conocidas (Gygli et al. 2017). Por lo tanto, es necesario aumentar la investigación y desarrollo del conocimiento sobre los mecanismos moleculares de la resistencia a fármacos contra la TB para encontrar nuevos marcadores biológicos y así desarrollar nuevos fármacos, que permitan disminuir esta amenaza en la salud pública mundial. Por tanto, con la finalidad de encontrar marcadores moleculares de resistencia a fármacos en tuberculosis, nuestro grupo de trabajo evaluó el transcriptoma de una cepa sensible y una cepa multifarmacorresistente de *M. tuberculosis*, identificando que los genes *esxG* y *esxH* estaban sobreexpresados en la cepa resistente en comparación de la sensible (Penuelas-Urquides et al. 2013). Además, se realizó la expresión heteróloga y una inhibición de los genes *esxG* y *esxH* en el modelo *Mycobacterium smegmatis* en donde se observó un efecto en la resistencia a isoniazida y rifampicina (Granados-Tristán et al. 2020). Estos genes *esxG* y *esxH* forman parte del locus ESX3, el cual codifica para un sistema de secreción del sistema en el cual las proteínas EsxG y EsxH son secretadas por este sistema (Houben et al. 2012). El sistema

de secreción ESX3 es responsable de la expulsión de proteínas fuera de la célula, además es necesario para la viabilidad en *M. tuberculosis* (Tinaztepe et al. 2016) y tiene un rol en la homeostasis del zinc y hierro (Siegrist et al. 2009; Serafini et al. 2013), así como en la virulencia y patogenicidad de esta bacteria (Tufariello et al. 2016). El sistema de secreción ESX3 está formado por una maquinaria de secreción compuesta por las proteínas EccB3, EccC3, EccD3 y EccE3, las cuales forman un protómero que a su vez forma un dímero y se ha planteado que este dímero forma un trímero de dímeros para generar la maquinaria de secreción del sistema ESX3 (Famelis et al. 2019; Poweleit et al. 2019). En un estudio de funcionalidad génica, se inhibió el gen *eccD3* en *M. smegmatis* observando un aumento en la resistencia a fármacos de primera línea y se demostró que es necesario para el mantenimiento de la fisiología y morfología normal de la bacteria (Nath et al. 2018). La investigación sobre el sistema ESX3 ha proporcionado importantes avances en el conocimiento de la patogenicidad de las micobacterias y representa un objetivo para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la TB. EccD3 es un componente clave para procesos fisiológicos como el mantenimiento de la fisiología y morfología de las micobacterias, por lo tanto, evaluar su participación en la resistencia a fármacos de primera y segunda línea presenta una oportunidad en la identificación de marcadores moleculares involucrados en dicho fenómeno. Además, los componentes del sistema de secreción ESX3 presentan alta posibilidad de ser blancos farmacológicos (Bottai et al. 2014; Dragset et al. 2015). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la participación de EccD3 en el fenómeno de farmacoresistencia en *M. smegmatis* y evaluar el potencial farmacológico en *M. tuberculosis* de esta proteína y de los demás componentes de la maquinaria de secreción del sistema ESX3. Por otro lado, se utilizaron técnicas moleculares como CRISPRi para evaluar la funcionalidad génica, así como análisis *in silico* para generar acoplamiento molecular y evaluar el potencial farmacológico.

2. ANTECEDENTES

2.1. Tuberculosis.

La TB es una enfermedad infectocontagiosa presente desde tiempos antiguos de la humanidad (Donoghue 2009). En momias del antiguo Egipto que datan del año 2400 A.C. se encontraron deformidades esqueléticas características de la TB, además de encontrar reportes en ilustraciones en el arte egipcio sobre lesiones de la TB vertebral o enfermedad de Pott (Cave y Demonstrator 1939). Sin embargo, los primeros escritos en donde reportaron a la TB como enfermedad datan de hace 3300 y 2300 años aproximadamente en India y China respectivamente. Además, existen reportes de la TB en textos bíblicos, en la antigua Grecia descrita por Hipócrates, en el imperio Romano, en el imperio bizantino, en la edad media, en los siglos XVII, XVIII, XIX hasta la actualidad (Donoghue 2009).

En la actualidad la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó en el 2021 que 10.6 millones de personas enfermaron de TB en todo el mundo, y esta enfermedad causó 1.4 millones de muertes (WHO 2022a). En México en el 2022 se reportaron 19,603 casos de TB en el sistema de vigilancia epidemiológica mientras que específicamente en el estado de Nuevo León se reportaron 1,569 casos de TB (SINAVE 2022).

Esta enfermedad es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, sin embargo, existen otras bacterias que pertenecen al complejo *M. tuberculosis* que también causan la enfermedad, como *M. canetti*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. pinnipedii* y *M. caprae*. Estas bacterias causan la tuberculosis en humanos, pero también en animales como en bovinos, ciervos, puercoespines, ovejas, entre otros (Brosch et al. 2002).

La TB afecta diferentes órganos del cuerpo humano, como el cerebro, laringe, sistema digestivo, nodo linfático, huesos, articulaciones, riñones, provocando daño tisular progresivo en las zonas afectadas; sin embargo, en la mayoría de los casos esta enfermedad afecta a los pulmones denominándose TB pulmonar (Golden y Vikram 2005).

Las personas con TB pulmonar presentan tos crónica de más de 15 días, tos con sangre, fiebre en picos, sudoración nocturna, decaimiento, anorexia, pérdida de peso y dolor de pecho. Estos síntomas se presentan cuando la persona tiene TB pulmonar activa, y se le llama así debido a que la bacteria se divide dentro del tejido pulmonar provocando daño tisular. La TB activa se transmite de una persona contagiada con *M. tuberculosis* a otra a través del aire, cuando la persona contagiada estornuda, tose o habla ya que expulsa partículas aerosólicas que transportan a los bacilos bacterianos; aunque en la mayoría de los casos las personas pueden contener y combatir la infección mediante la acción del sistema inmune (Delogu et al. 2013; WHO 2022a). Por otro lado, existe una forma de la enfermedad que se conoce como TB pulmonar latente, siendo una forma silenciosa ya que las personas no presentan síntomas clínicos ni contagian la enfermedad. La TB latente surge debido a que células del sistema inmune y otro tipo de células forman una estructura llamada granuloma el cual contiene a las micobacterias en un estado de dormancia, lo que provoca que el metabolismo de la bacteria disminuya y no se replique, pero cuando la persona presenta un desequilibrio en la estructura del granuloma y provoca que las bacterias salgan y comiencen a dividirse lo que produce una TB activa (Bolscher et al. 2007).

2.2. Micobacterias.

Las micobacterias pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae* orden Corinebacterales clase Actinomycetes phylum Actinomycetota clado Terrabacteria. Esta familia es muy diversa la cual incluye bacterias en una amplia variedad de ambientes, desde el suelo, agua, hasta la piel y mucosas de animales, incluyendo los humanos. Los miembros de esta familia se clasifican en seis géneros *Mycobacterium*, *Mycobacteroides*, *Mycolicibacillus*, *Mycolicibacter*, *Mycolicibacterium*, *Hoyosella* y otras que aún no se clasifican dentro de ninguno de los seis géneros (Gupta et al. 2018; Meehan et al. 2021; Hamada et al. 2016; Li et al. 2016). Dentro de esta familia existen varias bacterias que son patógenas como las del complejo *M. tuberculosis* que causan la TB, *M. leprae* que causa la lepra, *M. ulcerans* que causa la úlcera de Buruli, las pertenecientes al complejo *M. avium* que causan infecciones pulmonares, *M. marinum* que causa una enfermedad cutánea granulomatosa, entre otras (Ashford et al. 2001; Marras y Daley 2002). Es así como dentro de esta familia

existen muchos patógenos tanto para el humano como para animales, y algo característico de las micobacterias es su pared celular confiriéndoles resistencia a diferentes factores externos.

Las micobacterias tienen una pared celular que presentan una membrana didérmica la cual está formada por una membrana citoplasmática y otra membrana externa constituida por ácidos micólicos, la cual se denomina micomembrana. La primera capa de la envoltura de las micobacterias es la membrana citoplasmática la cual contiene lípidos como fosfoglicéridos, fosfatidilinositol manósidos unidos con lipomananos y lipoarabinomananos, estos últimos se encuentran en el periplasma, entre la membrana citoplasmática y la capa de peptidoglicano. Esta capa de peptidoglicano está unida con la capa de en medio de arabinogalactano los cuales están unidos con la micomembrana. La micomembrana está compuesta por lípidos y proteínas secretadas; sin embargo, su mayor composición es de ácidos micólicos los cuales pueden estar unidos a trehalosa monomicolato o trehalosa dimicolato. Finalmente se encuentra la capsula en donde están los lípidos de superficie como el tiocerol dimicocerosato, polisacáridos y proteínas (Abrahams y Besra 2021; Dulberger et al. 2020).

2.2.1. *Mycobacterium tuberculosis*.

M. tuberculosis, pertenece al género *Mycobacterium*, y es el principal patógeno causante de la TB, sin embargo, existen otras bacterias que forman parte del complejo *M. tuberculosis*, las cuales son *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae*, *M. mungi*, *M. dassie* y *M. oryx*. Estas bacterias presentan el 99.9% de similitud en su secuencia nucleotídica de sus genomas y secuencias idénticas en el gen de 16S rRNA (Wirth et al. 2008; Riojas et al. 2018).

M. tuberculosis es un bacilo aerobio de crecimiento lento con un tiempo de duplicación de 12 a 24 horas bajo condiciones óptimas, ácido alcohol-resistente, curvados, inmóviles, no formadores de esporas, con un genoma de 4 Mpb (Delogu et al. 2013).

2.3. Tratamiento de la Tuberculosis.

Existen diferentes fármacos que son utilizados para tratar a la TB, dentro de estos fármacos se encuentran los de primera y segunda línea (Tabla 1) (WHO 2022b; Padda y Reddy 2021).

Tabla 1. Fármacos utilizados contra la TB.

Clasificación	Tipo	Fármaco	Mecanismo de acción
Primera línea	Rifamicinas	Isoniazida (INH)	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos.
		Rifampicina (RIF)	Inhibición de la transcripción.
		Rifabutina (RBN)	
		Rifapentina (RPT)	
		Pirazinamida (PZA)	Inhibición de la enzima ácido graso sintetasa I, lo que provoca la inhibición de la síntesis de ácidos grasos de la micobacteria.
Segunda línea		Etambutol (EMB)	Inhibición de la enzima arabinosil transferasa lo que causa que se inhiba la síntesis de componentes de la pared celular.
	Diarilquinolina	Bedaquilina (BDQ)	Inhibición de la enzima ATP sintasa.
	Oxazolidinona	Linezolid (LNZ)	Se une a un sitio del RNA ribosomal 23S de la subunidad 50s, lo que causa la inhibición de la producción de proteínas.
	Fluoroquinolona	Levofloxacino (LVX) Moxifloxacino (MOX)	Inhibición de la síntesis del DNA.
	Aminoglucósido	Estreptomicina (STR) Kanamicina (KAN) Amikacina (AMK) Capreomicina (CPM)	Se une al RNA 16S y 12S de la subunidad 30S, causando la inhibición de síntesis de proteínas.
	Ácido salicílico	Ácido p-aminosalicílico (PAS)	Inhibición de la síntesis de ácido fólico y componentes de la pared celular.

Aminoácido	Cicloserina (CS)	Inhibición de la síntesis de pared celular.
Tioamida	Protionamida (PRO)	Inhibición de la síntesis de componentes de la pared celular.
	Etionamida (ETH)	
	Pretomanida (PMD)	
	Delamida (DEL)	

Información obtenida de WHO 2022b; Padma y Reddy 2021.

Existen diferentes esquemas de tratamiento para la TB y depende del tipo de TB que presente el paciente y su situación específica, encontrando esquemas con duración desde los cuatro hasta los nueve meses de tratamiento. Cuando un paciente presenta TB pulmonar sensible a los fármacos, el tratamiento estándar que se administra consta de dos fases: la fase intensiva en donde se debe administrar al paciente isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida por dos meses; y en la fase de continuación se le administra al paciente isoniazida y rifampicina por cuatro meses (WHO 2022b; Padma y Reddy 2021). Cuando los pacientes presentan una TB resistente a los fármacos de primera línea se utilizan otros esquemas en los cuales se utilizan fármacos de segunda línea, sin embargo, estos fármacos presentan mayores efectos adversos (WHO 2022b).

2.4. Tuberculosis resistente a fármacos.

El fenómeno de resistencia a fármacos en la TB ha sido ampliamente estudiado y de acuerdo con la OMS la TB que presenta resistencia a fármacos se puede clasificar en diferentes definiciones mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Definiciones de la TB resistente a fármacos de acuerdo con la OMS.

Definición	Resistencia a fármacos
TB resistente a isoniazida	Isoniazida
TB resistente a rifampicina (TB-RR)	Rifampicina
TB multifarmacorresistente (TB-MFR)	Isoniazida y rifampicina
TB pre-extendida	Rifampicina y una fluoroquinolona
TB con resistencia extendida (TB-XDR)	Rifampicina, una fluoroquinolona y al menos a uno de los fármacos bedaquilina y linezolid.

TB totalmente resistente definida por la literatura
(Udwadia et al. 2012)

A todos los fármacos existentes para su
tratamiento.

(WHO 2022b; Padda y Reddy 2021).

En el 2021 la OMS reportó 450 000 casos de TB-MFR/RR y un estimado de 191 000 muertes debido a la TB-MFR/RR en todo el mundo (WHO 2022a). Este fenómeno de resistencia a fármacos en la TB ha sido ampliamente estudiado para conocer sus causas encontrando diversos factores que lo provocan. Los factores causantes de la resistencia a fármacos en la TB se pueden clasificar en dos tipos los intrínsecos y los adquiridos. Los intrínsecos son aquellos que se refieren a la pared celular característica de *M. tuberculosis*, mientras que los adquiridos se refiere a aquellas mutaciones que *M. tuberculosis* adquiere en genes blanco de los fármacos o que están relacionados con su mecanismo de acción (Almeida Da Silva y Palomino 2011).

La resistencia intrínseca de *M. tuberculosis* es proporcionada por la capa de ácidos micólicos de su pared celular, la cual provoca una baja permeabilidad de compuestos hacia dentro de la célula, como antibióticos u otras moléculas químicas; además también se ha clasificado como un mecanismo de resistencia intrínseca al rol de las bombas de eflujo de la bacteria debido a que son un factor muy importante para resistir la acción de diferentes moléculas, como tetraciclina, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, entre otros al expulsar de la célula estos y otros compuestos (Singh et al. 2020; Almeida Da Silva y Palomino 2011).

La resistencia adquirida de *M. tuberculosis* se refiere a las mutaciones que se generan en el genoma de la bacteria a lo largo de las generaciones. Por lo tanto, cuando una mutación afecta a los genes que codifican para las proteínas que son blancos de los fármacos o bien para los genes que codifican a proteínas vinculadas con algún mecanismo de acción de fármacos ocurre la resistencia a fármacos. En la literatura ya existen muchas mutaciones

asociadas con los fármacos existentes como podemos observar en la Tabla 3 (Iacobino et al. 2020; Singh et al. 2020).

Tabla 3. Mutaciones asociadas a la resistencia a fármacos anti-TB.

Fármaco	Gen donde se presenta la mutación	Mecanismos de resistencia
Isoniazida	<i>katG</i>	Inhibición de la activación del pro-fármaco.
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Disminuye la unión del fármaco al blanco.
Rifabutina		
Rifapentina		
Pirazinamida	<i>pncA</i> , inserción en IS6110, <i>rpsA</i>	Reduce la actividad de la pirazinamidasa.
Etambutol	<i>embB</i> y región intergénica de <i>embCA</i>	Disminuye la unión del fármaco al blanco.
Bedaquilina	<i>AtpE</i>	Modificación del blanco.
Linezolid	RplC, rrl	Modificación del blanco.
Levofloxacino	<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i>	Reduce la unión del fármaco al blanco.
Moxifloxacino		
Estreptomina	<i>rrs</i> , <i>rpsL</i>	Reduce o no se une la unión del fármaco al blanco.
Kanamicina		
Amikacina		
Capreomicina		
Cicloserina	<i>Alr</i>	Modificación del blanco
Protionamida	<i>inhA</i> , <i>EthR</i> .	Reduce la unión del fármaco al blanco y su activación.
Etionamida		
Pretomanida	<i>Ddn</i> , <i>FbiA</i>	Disminuye la activación del fármaco.
Delamida		

Además de los mecanismos mencionados también existen otros mecanismos específicos que pueden estar influenciados por factores ambientales y estilo de vida de los pacientes; por ejemplo, el uso inadecuado de los medicamentos, como la falta de adherencia al tratamiento, puede fomentar la selección de mutaciones asociadas a resistencia a fármacos resistentes, así como la presencia de otras enfermedades, como el VIH/SIDA, también puede aumentar el riesgo de resistencia a los medicamentos. Aunado a esto se ha

observado el fenómeno de resistencia en la TB sin que existan estas mutaciones conocidas (Tabla 3), por lo tanto, diversos grupos han realizado análisis para encontrar esas diferencias que existen entre cepas resistentes y sensibles a los fármacos para encontrar las causas que siguen sin conocerse sobre este fenómeno de resistencia a fármacos de la TB.

Nuestro grupo de trabajo realizó un análisis del transcriptoma de dos cepas de *M. tuberculosis*, una resistente y una sensible a fármacos de primera línea, encontrando ciertos genes diferencialmente expresados en la cepa resistente en comparación de la sensible. Dentro de estos genes se encontraron sobreexpresados los genes *esxG* y *esxH* en la cepa resistente a fármacos de *M. tuberculosis* en comparación de la cepa sensible (Penuelas-Urquides et al. 2013), estos genes codifican para proteínas que son secretadas por el sistema de secreción ESX3, el cual es necesario para la sobrevivencia de *M. tuberculosis* (Tinaztepe et al. 2016). Continuando con la línea de investigación se evaluó la expresión de estos genes en diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis* con diferentes patrones de resistencia a fármacos, observando su sobreexpresión en la mayoría de los aislados clínicos (Gonzalez-Escalante et al. 2015). Además, al expresar heterológamente los genes *esxG* y *esxH* de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis* la bacteria se volvió sensible a rifampicina e isoniazida, mientras que al inhibir los genes ortólogos de *esxG* y *esxH* en *M. smegmatis* la bacteria se volvió resistente a rifampicina (Granados-Tristán et al. 2020). Estos resultados sugieren que los genes *esxG* y *esxH*, que codifican para proteínas que son secretadas por el sistema de secreción ESX3 presentan una relación con el fenómeno de resistencia a fármacos. Por lo tanto, este sistema de secreción puede estar vinculado con el fenómeno.

2.5. Sistema de secreción Esx3

El sistema de secreción ESX3 es uno de los cinco sistemas de secreción ESX de tipo VII que se encuentran en *M. tuberculosis*. Estos sistemas ESX secretan proteínas las cuales se han vinculado a diferentes actividades como virulencia, supervivencia, entre otras cosas. Los sistemas ESX se han denominados del 1 al 5, y de los más estudiados se encuentran

los sistemas ESX 1, 3 y 5, mientras que los sistemas ESX 2 y el 4 son los menos estudiados (Houben et al. 2012).

El sistema de secreción ESX3 es esencial para la supervivencia de *M. tuberculosis* (Tinaztepe et al. 2016), además de tener un rol en la virulencia (Tufariello et al. 2016) y en la homeostasis de hierro y zinc en la bacteria (Siegrist et al. 2009; Serafini et al. 2013).

El operón que codifica para este sistema se compone de once genes, los cuales están altamente conservados entre las micobacterias (Figura 1). Los genes que están dentro del operón son los genes *ecc* (*eccA3*, *eccB3*, *eccC3*, *eccD3* y *eccE3*) los cuales codifican para proteínas con dominios de ATPasas y transmembranales; también se encuentran los genes *esx* (*esxG* y *esxH*), *PE4* y *PE5*, que codifican para proteínas que son secretadas por el sistema; y los genes *espG3* y *mycP3* que codifican para una proteína chaperona y una serin-proteasa anclada en la membrana respectivamente (Houben et al. 2012).

Estos genes se regulan por una secuencia promotora que se encuentra en la región 5' del gen *eccA3* del operón, sin embargo existe otra región reguladora dentro del operón antes del gen *esxG* (Figura 1) (Rodríguez et al. 2002; Maciag et al. 2009). Por otro lado, el operón ESX3 es regulado negativamente por las metaloproteínas IdeR (Iron dependent Repressor), Zur (Zinc uptake repressor) y MntR (Manganese transport Regulator). Estas proteínas tienen un dominio de unión a iones hierro (Fe^{+2}), zinc (Zn^{+2}) y manganeso (Mn^{+2}), respectivamente; cuando sucede la unión de la proteína con el metal estas proteínas se unen a la secuencia de DNA blanco para provocar la inhibición de la transcripción del operón ESX3. El sistema ESX3 está regulado por los niveles de hierro y zinc dentro de la bacteria, a mayor concentración se inhibe el sistema mientras que a menor concentración aumenta la activación del sistema (Rodríguez et al. 2002; Maciag et al. 2009; Pandey et al. 2015).

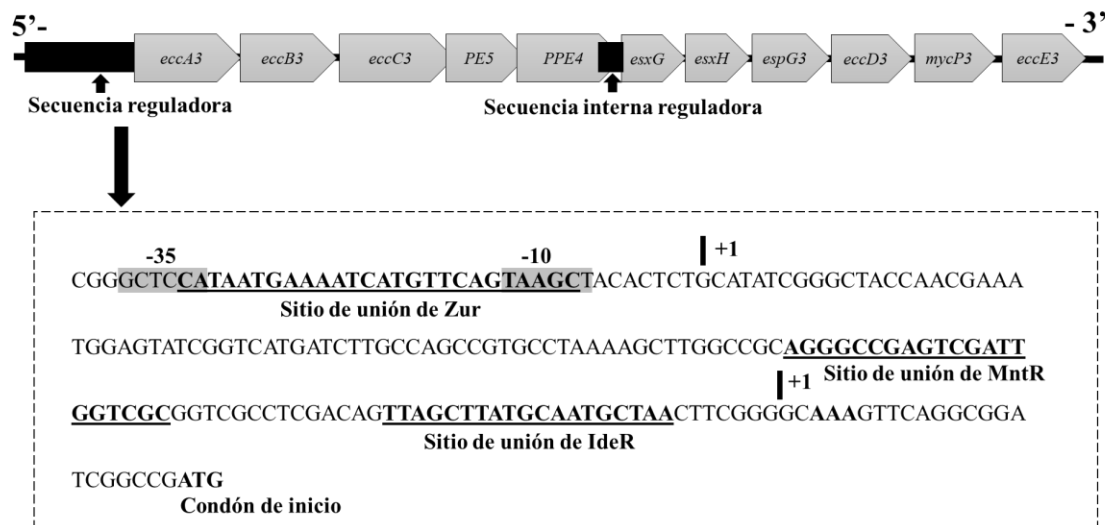


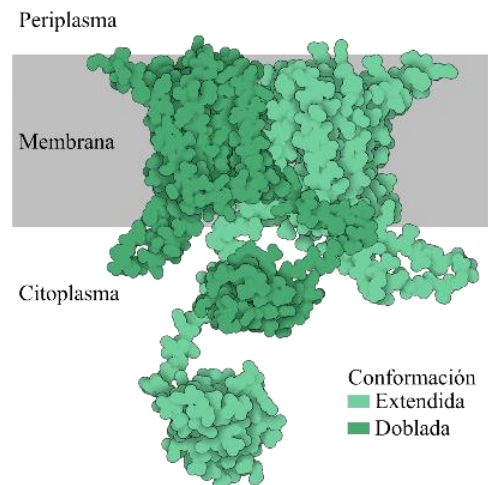
Figura 1. Operón del sistema de secreción ESX3 y su región reguladora. Sitios de unión de los reguladores IdeR, Zur y MntR subrayados. Codón de inicio del gen *eccA3*.

La maquinaria de secreción del sistema ESX3 de la bacteria *M. smegmatis* ha sido obtenida por dos diferentes estudios, encontrando que el sistema está formado por un dímero de protómeros, y cada protómero está formado por una proteína EccB3, EccC3, EccE3 y dos proteínas EccD3. Además se cree que el sistema se encuentra en una conformación hexamérica similar a la observada por su homólogo el sistema de secreción ESX5 en la membrana, por lo que se han creado modelos de esta posible conformación (Poweleit et al. 2019; Famelis et al. 2019).

En un estudio en donde realizaron un tamizaje virtual con el objetivo de detectar posibles blancos farmacológicos dentro del proteoma de *M. tuberculosis*, se encontró que las proteínas EccD3 y EccC3 presentan alta confiabilidad para ser blancos terapéuticos (Raman et al. 2008). En otro estudio en donde se evaluó de manera experimental la identificación de blancos terapéuticos en *M. tuberculosis*, utilizando una plataforma escalable basada en el cribado de células completas, junto con la secuenciación del genoma completo de mutantes resistentes de *M. tuberculosis* se encontró que la proteína EccB3 presenta potencial como un nuevo blanco farmacológico (Loerger et al. 2013).

2.5.1. EccD3.

El gen *eccD3* tiene un tamaño de 1,419 pb y codifica para un proteína de 472 aminoácidos. Esta proteína tiene un dominio transmembranal y un dominio ubiquitin-like N-terminal que se encuentra en el citoplasma. Esta proteína forma un homodímero el cual presenta dos conformaciones de EccD3, una es la conformación extendida y otra es la conformación doblada, estas conformaciones se diferencian por el plegamiento que presenta el dominio citoplasmático (Poweleit et al. 2019; Famelis et al. 2019) (Figura 2).
Figura 2. Estructura 3D de la proteína EccD3. Estructura obtenida del PDB 6UMM (Poweleit et al. 2019).



La proteína EccD3 forma parte del principal soporte de la estructura del protómero ya que es la única que se encuentra en forma de monómero en la parte central del protómero del sistema ESX3. El monómero de EccD3 presenta una cavidad altamente hidrófoba por donde se sugiere que atraviesan lípidos de la membrana, sin embargo aún no existe evidencia experimental (Poweleit et al. 2019; Famelis et al. 2019).

Se ha reportado que al inhibir gen *eccD3* en *M. smegmatis* la resistencia a los fármacos isoniazida, etambutol y rifampicina aumenta, además se observó que presenta un rol en el mantenimiento de la fisiología de la pared celular bacteriana (Nath et al. 2018).

Por lo anterior, los componentes del sistema de secreción ESX3 tienen un alto potencial farmacológico y son candidatos para ser evaluados en el fenómeno de resistencia a fármacos en TB.

2.6. Estrategias para el estudio de genes de *M. tuberculosis*.

Dentro de las estrategias que se utilizan para estudiar la funcionalidad de los genes de *M. tuberculosis* se encuentra la secuenciación completa del genoma, evaluación de la expresión de genes, mutación dirigida y edición genética, así como el uso de diversas técnicas bioinformáticas (Dippenaar et al. 2022; Chhotaray et al. 2018).

Existen diversas técnicas como el uso de plásmidos para expresar genes heterólogos o sobre-expresar los genes en las micobacterias, ya que existen muchos vectores plasmídicos obtenidos de micobacterias que los poseen de forma natural como *M. avium*, *M. fortuitum* o *M. smegmatis*. Estas construcciones permiten evaluar la funcionalidad génica. El uso de transposones que causan mutaciones aleatorias en el genoma de *M. tuberculosis* ha sido muy utilizado, sin embargo, las mutaciones no son dirigidas. También se pueden encontrar sistemas para inhibir genes generando mutantes, pero en este caso, las proteínas de genes esenciales no pueden ser estudiados con este sistema; por lo tanto, se han generado sistemas para inhibir la transcripción génica. Uno de los sistemas de reciente generación ha sido el sistema de repetición palindrómica corta, agrupada y regularmente interespaciada de interferencia (CRISPRi) (Chhotaray et al. 2018).

2.6.1. CRISR (sistema de repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas) de interferencia.

El sistema de repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISR) es utilizado como una herramienta para la edición génica. Esta herramienta consta de una nucleasa (CAS-9) que escindirá el DNA provocando que la célula active los mecanismos de reparación de DNA creando una mutación en el sitio blanco; también consta de un RNA guía (RNAg) el cual es complementario a la secuencia blanco del DNA, lo que provoca su unión, además este RNAg contiene una secuencia que se une a la nucleasa, esto forma un complejo de nucleasa-RNAg el cual se unirá a la secuencia nucleotídica blanco. La secuencia blanco del RNAg debe encontrarse cerca de la secuencia del motivo adyacente del protoespaciador (PAM), debido a que la secuencia PAM es necesaria para que la nucleasa reconozca a la secuencia blanco y proceda a escindir el DNA, si la secuencia PAM no se reconoce esta no tendrá la actividad de

nucleasa por que nos e unirá a la secuencia blanco (Wang et al. 2016; Tycko et al. 2016). Se han realizado diversas modificaciones a la herramienta de CRISPR.

CRISPR de interferencia (CRISPRi) es un sistema que contienen una nucleasa con mutaciones en los dominios RuvC y HNH lo que causa que se inhiba su actividad de nucleasa, por lo tanto, la enzima solo se unirá por medio del RNAg a la secuencia nucleotídica blanco provocando una inhibición de la RNA polimerasa por un efecto alostérico. Se han utilizado estos sistemas de CRISPRi para inhibir genes de diferentes micobacterias como *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG obteniendo un silenciamiento de los genes blanco (Singh et al. 2016; Rock et al. 2017).

2.6.2. Técnicas bioinformáticas para el estudio de producto génicos.

Cuando se utiliza la secuenciación de genomas es necesario utilizar diversas técnicas bioinformáticas por la cantidad de datos que se obtienen, así mismo existen varias herramientas para poder evaluar la funcionalidad génica y conocer las características de los productos génicos.

Una de las técnicas más utilizadas en el área de la farmacéutica es para evaluar el potencial farmacológico de los genes realizando análisis a los productos génicos mediante el uso de técnicas que permiten evaluar la estructura tridimensional (3D) de las proteínas (Sabe et al. 2021). Estas técnicas bioinformáticas representan un avance en el desarrollo de fármacos debido a que acortan el tiempo, ya que normalmente este proceso se lleva a cabo entre 12 y 15 años, además que reducen costos por el ahorro que representan en la realización de experimentos (Wouters et al. 2020).

Uno de los métodos más utilizados para evaluar la interacción entre proteínas y fármacos, es el acoplamiento molecular. El acoplamiento molecular (docking molecular) evalúa la interacción cuaternaria y el cambio en la energía libre (ΔG) del complejo proteína-ligando, el cual puede ser un fármaco, o bien alguna otra molécula. Este método es muy utilizado para realizar tamizajes con grandes cantidades de fármacos o moléculas y así poder generar una base de datos de posibles moléculas que puedan interaccionar con blancos

farmacológicos o posibles blancos farmacológicos (Guedes et al. 2014). Además, también se pueden utilizar fármacos que presentan un uso seguro para los humanos al encontrarse ya aprobados y generar así un reposicionamiento de estos fármacos para otra enfermedad (Pushpakom et al. 2019).

2.7. Modelos para estudiar *M. tuberculosis*.

Existen varias bacterias de la familia *Mycobacteriaceae* que son utilizadas como modelos de *M. tuberculosis*, las cuales se utilizan para evitar la patogenicidad, virulencia y el largo tiempo requerido para su cultivo debido a su lento crecimiento. Dentro de las cepas utilizadas más comúnmente como modelo se encuentran *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. aurum*, *M. abscessus*, *M. marinum* y *M. bovis* (Chaturvedi et al. 2007; O'Donnell y Gibbons 2007; Khan y Sarkar 2008; Gordien et al. 2009).

2.7.1. *Mycobacterium smegmatis*.

Mycobacterium smegmatis basónimo de *Mycobacterium smegmatis* pertenece al filo *Actinobacter*, familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium* (Gupta et al. 2018; Oren y Garrity 2018). Esta bacteria es de crecimiento rápido con un tiempo de generación de 3-4 horas, es aerobia, su temperatura óptima es de 37°C, sus colonias son visibles entre los 3 y 5 días en medio sólido mientras que en medio líquido en 24 horas se observa su crecimiento. Presenta un genoma de 6.99 Mpb con un contenido de GC del 67.4 %, y con 6,938 genes, 6,717 proteínas, 6 ARN ribosomales, 47 ARN de transferencia y 617 pseudogenes (Mohan et al. 2015). La podemos encontrar libre en el medio ambiente en lugares como en el suelo y agua, esta bacteria no presenta patogenicidad para humanos ni para animales (Brown-Elliott y Wallace Jr 2002).

M. smegmatis es considerado un buen modelo debido a que presenta alta homología en diversos genes de virulencia, rutas metabólicas, además en su estructura celular y metabolismo con *M. tuberculosis* (Shiloh y Champion 2010; Ranjitha et al. 2020; Reyrat y Kahn 2001). Existen diversos estudios en donde utilizan a *M. smegmatis* como modelo para evaluar la funcionalidad de diferentes genes (Landick et al. 2014; Mi et al. 2017).

La cepa *M. smegmatis* mc²155 es la más utilizada ya que presenta una mayor eficiencia de transformación por electroporación con ADN plasmídico desde 10 a 100 veces más que la cepa parental (Snapper et al. 1990).

2.8. Sistema de secreción ESX3 en *M. smegmatis*

M. smegmatis presenta en su genoma tres clústeres de genes que codifican para tres sistemas de secreción ESX, estos son ESX1, ESX3 y ESX4. La secuencia aminoacídica de estos sistemas en *M. smegmatis* presenta entre 60 y 75% de similitud con *M. tuberculosis* H37Rv, sin presentar ninguna delección, cambio de marco de lectura o codón de paro en los genes de estos sistemas, en su caso, el sistema ESX3 en *M. smegmatis* presenta todos los genes del sistema de *M. tuberculosis* (Gey van Pittius et al. 2001). El hierro y zinc regulan la transcripción del sistema de secreción ESX3 en *M. tuberculosis*, sin embargo, en *M. smegmatis* solo el hierro regula la transcripción y no el zinc (Serafini et al. 2009). En *M. tuberculosis* el sistema ESX3 está vinculado con la adquisición de hierro mediado por micobactinas sin embargo en *M. smegmatis* solo se ha vinculado con la adquisición del metal, pero no por medio de las micobactinas (Tufariello et al. 2016).

Por lo tanto, el enfoque principal del presente estudio se centra en ampliar el conocimiento sobre la participación del gen *eccD3* en el fenómeno de la resistencia a fármacos en *M. smegmatis*, lo que permitiría la potencial identificación de marcadores genéticos de resistencia; además de evaluar el potencial farmacológico de la proteína EccD3 y de los otros componentes de la maquinaria de secreción del sistema ESX3 en *M. tuberculosis*.

3. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una enfermedad reemergente causada principalmente por *M. tuberculosis*, y aunque ya existen fármacos contra esta enfermedad, su eficacia ha disminuido por la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a estos fármacos. Se ha encontrado que existen mutaciones específicas en genes blanco de estos fármacos que causan resistencia; sin embargo, no en todos los casos se presenta esta vinculación sugiriendo que otros mecanismos moleculares pueden estar involucrados.

El conocer estos mecanismos sería beneficioso, al identificar nuevos marcadores genéticos de resistencia los cuales potencialmente tendrían una aplicación directa en el diagnóstico temprano de tuberculosis resistente a fármacos. Lo anterior permitiría identificar más blancos terapéuticos y, por otro lado, mejorar la implementación de un tratamiento oportuno.

En la búsqueda de estos mecanismos nuestro grupo de trabajo evaluó la expresión génica entre una cepa multifarmacorresistente y una sensible de *M. tuberculosis*, encontrando genes con diferencias en su expresión, dentro de estos genes se encontró a *esxG* y *esxH* sobre-expresados en la cepa multifarmacorresistente. Estos genes forman parte del clúster de genes que codifican para el sistema de secreción Esx3, las proteínas EsxG y EsxH son secretadas por este sistema, y la principal proteína que forma el poro de secreción es EccD3. Previamente se reportó que al eliminar el gen de esta proteína en una cepa de *M. smegmatis* se observó un aumento en la resistencia a los fármacos de primera línea isoniazida y etambutol (Nath et al. 2018). Por lo tanto, en el presente proyecto se pretende ampliar la caracterización de la participación de EccD3 en el fenómeno de fármacorresistencia en *M. smegmatis* y evaluar el potencial como blanco farmacológico de EccD3 y de los demás componentes que conforman la maquinaria de secreción del sistema ESX3.

4. HIPÓTESIS

La inhibición de *eccD3* tiene un efecto en la sensibilidad a fármacos antituberculosis en *M. smegmatis*, además EccD3 y otros componentes del sistema de secreción ESX3 de *M. tuberculosis* presentan interacciones favorables con fármacos antituberculosis.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1. Objetivo general.

Estudiar la participación de EccD3 en el fenómeno de farmacorresistencia en *Mycobacterium smegmatis* y evaluar su potencial farmacológico.

5.2. Objetivos particulares.

- Evaluar el efecto de la inhibición del gen *eccD3* en la resistencia a los fármacos de primera y segunda línea en *M. smegmatis*.
- Evaluar *in silico* la interacción de EccD3 con fármacos antituberculosis y fármacos de reposicionamiento en contra de la tuberculosis.
- Evaluar *in silico* la interacción de los componentes del sistema de secreción ESX3 con fármacos antituberculosis y fármacos de reposicionamiento en contra de la tuberculosis.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cultivo de cepas bacterianas.

6.1.1 Cultivo de *E. coli*.

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5 alfa (α) para realizar las construcciones plasmídicas, cultivando la cepa en medio líquido de cultivo Luria Bertani (LB) (US Biological Life Sciences, CA, EUA) a 37°C con agitación constante por 24 h y en medio sólido en agar LB a 37°C. En las cepas de *E. coli* DH5 alfa (α) que se transformaron con las construcciones generadas con el vector PLJR962 se agregó kanamicina (Sigma-Aldrich, MO, EUA) al medio de cultivo a una concentración final de 20 $\mu\text{g/mL}$.

6.1.2. Cultivo de *M. smegmatis*.

Se utilizó la cepa *M. smegmatis* mc²155 (ATCC 700084). Los cultivos en medio líquido se realizaron utilizando medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson and Co, MD, EUA) suplementado con albumina bovina, dextrosa, catalasa (ADC) (Becton Dickinson and Co, MD, EUA) al 10% y 0.05% de Tween 80 (Sigma-Aldrich, NJ, EUA) y se incubaron a 37°C con agitación constante. Para los cultivos en medio sólido de *M. smegmatis*, se utilizó el medio Middlebrook 7H10 agar (Becton Dickinson and Co, MD, EUA) suplementado con albumina bovina, dextrosa, catalasa (OADC) (Becton Dickinson and Co, MD, EUA) al 10% y 0.05% de Tween 80, los cuales también se incubaron a 37°C. Las cepas de *M. smegmatis* mc²155 que fueron transformadas con las construcciones realizadas con el vector PLJR962 se agregó kanamicina a una concentración final de 20 $\mu\text{g/mL}$ a los medios de cultivo líquidos o sólidos.

6.2. Evaluación de la secuencia del gen *eccD3* de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*.

La secuencia del gen *eccD3* de *M. smegmatis* y de *M. tuberculosis* se identificó en la base de datos del NCBI con número de referencia CP000480.1 y NC_000962.3, respectivamente. Posteriormente se realizó un alineamiento global de las dos secuencias de ambas bacterias con el algoritmo Needleman-Wunsch utilizando la herramienta EMBOSS Needle (https://wwwdev.ebi.ac.uk/Tools/jdispatcher/psa/emboss_needle) (Madeira et al. 2022).

Se realizó también un alineamiento global utilizando el algoritmo Needleman-Wunsch de las secuencias de todo el clúster de los genes ESX3 de ambas bacterias con el mismo número de ID de la base de datos del NCBI señalado anteriormente, utilizando la herramienta EMBOSS stretcher (https://wwwdev.ebi.ac.uk/Tools/jdispatcher/psa/emboss_stretcher) (Madeira et al. 2022).

6.3. Construcción del plásmido PLJR962 con los elementos para inhibir el gen *eccD3* mediante CRISPRi.

La estrategia para realizar el diseño y clonación del RNAg se resumen la Figura 3.

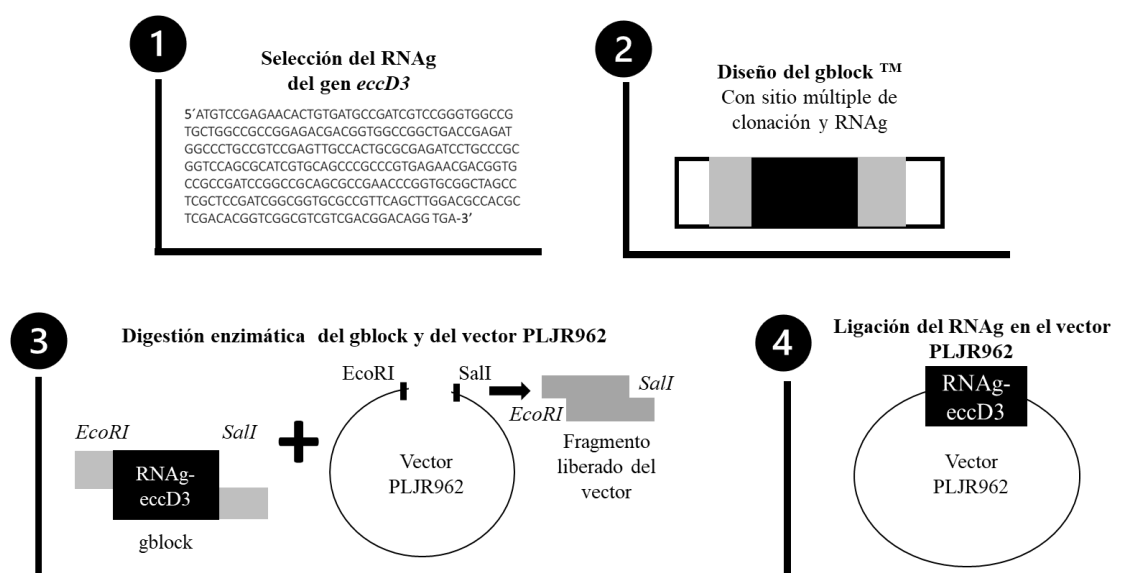


Figura 3. Estrategia para el diseño y clonación del RNAg en el vector PLJR962.

6.3.1. Diseño del RNA guía para inhibir el gen *eccD3*.

Se realizó el diseño del RNAg del gen *eccD3* tomando en cuenta los sitios PAM propuestos por Rock y colaboradores y seleccionando el motivo PAM NNAGAAG con mayor capacidad de inhibición dentro de la secuencia codificante del gen (Rock et al. 2017) (Tabla 4). La secuencia blanco-seleccionada corresponde a la región codificante del gen *eccD3* (sinónimo *snm* y *Msmeg_0623*, con número de referencia CP000480.1 en la base de datos NCBI) la cual se encuentra ubicada en las coordenadas 702,737 pb a la 704,164 pb (Tabla 4).

Como control positivo del sistema de CRISPRi se utilizó el RNAg del gen *mmpL3* el cual es necesario para la sobrevivencia de *M. smegmatis* (Rock et al. 2017). Por otro lado, se diseñó un RNAg-scramble, el cual también fue utilizado como control. Esta secuencia no presenta un alineamiento con regiones del genoma de *M. smegmatis* (Anexo A). Para el diseño del RNAg-scramble se utilizó la herramienta Genscript (<https://www.genscript.com/tools/create-scrambled-sequence>) para generar una secuencia al azar (Tabla 4).

Tabla 4. RNA guías utilizados en el presente estudio.

Gen	Secuencia blanco del RNAg (5'-3')	PAM (5'-3')	Posición
<i>eccD3</i>	GAGGCACGCAGGCGCAGTGGGGT	CC AGAAG	+ 360
<i>mmpL3</i>	GCGACAGACTGGCTGCCCTC	CC AGAAG	+ 133
scramble	GGAGCGGTTATTGCGGACA	n/A	n/A

n/A, no aplica.

6.3.2. Clonación del RNAg en el vector PLJR962

Se utilizó un gblockTM generado por la empresa IDT para poder realizar la clonación del RNAg en el vector PLJR962, el cual se diseñó como se menciona en las siguientes secciones.

6.3.2.1. Diseño del gblock de los genes *eccD3*, *mmpL3* y scramble.

El gblock utilizado para clonar los RNA guías se diseñó utilizando secuencias de enzimas de restricción (sitio múltiple de clonación, tabla 5), secuencias de los siguientes primers, primer Forward pMV261 GTTG TAGTGCTTGTGGTGGCA y primer Reverse pMV261 GACA ACTTGAGCCGTCCGT; una secuencia de 247pb del vector PLJR962 (coordenadas del vector de la 65 pb a la 308 pb) y la secuencia del RNAg del gen a evaluar. Se diseñó un sitio múltiple de clonación el cual se encuentra en cada uno de los extremos 5' y 3' de la secuencia del vector que contiene el RNAg.

Tabla 5. Secuencias utilizadas para el sitio múltiple de clonación en el gblock.

Enzima de restricción	Secuencia de reconocimiento 5'-- 3'
<i>XbaI</i>	TCTAGA
<i>NheI</i>	GCTAGC
<i>XmnI</i>	GAAGTCGTTT
<i>NotI</i>	GCGGCCGC
<i>PvuI</i>	CGATCG
<i>BamHI</i>	GGATCC
<i>MscI</i>	TGGCCA
<i>XhoI</i>	CTCGAG
<i>SmaI</i>	CCCGGG

Estos sitios múltiples de clonación rodean a una secuencia del vector PLJR962 de 247 pb la cual fue seleccionada debido a que se encuentran las secuencias de las enzimas *EcoRI* y *Sall* para su posterior clonación en el vector, como se muestra en la Figura 4.

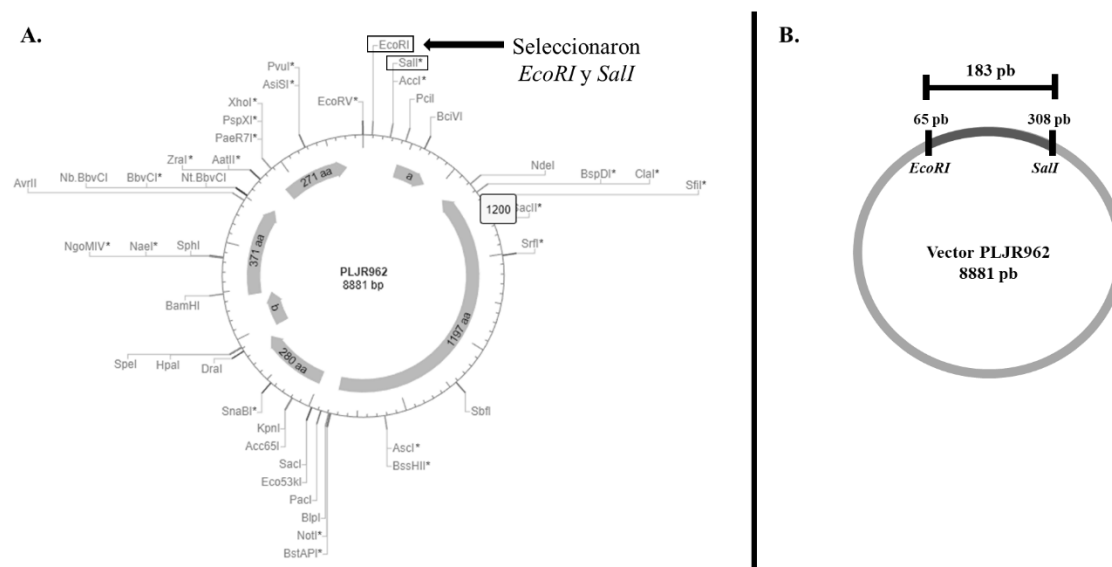


Figura 4. Identificación de los sitios de enzimas de restricción en el vector PLJR962. A. Esquema de los sitios de acción de enzimas de restricción que generan un solo corte en el vector PLJR962, seleccionando *EcoRI* y *Sall*. B. Representación esquemática, de la digestión in silico del vector PLJR962 con las enzimas seleccionadas, la cuales libera un fragmento de 183pb del vector.

Finalmente se agregó una secuencia al azar de 26 pb en la región 5' del gblock y 38 pb en la región 3' del gblock generando una secuencia final de 471 pb mostrada en la Figura 5.

Secuencia al azar 5' 5'-GTCTTGACGCCTTGAGGCGTGAAGGC | *XbaI* | *NheI* | *XmnI* |
 | *NotI* | *PvuI* | *BamHI* | *MscI* | *XhoI* | *SmaI* | Primer Forward pMV261
 GCGGCCGC | CGATCG | GGATCC | TGGCCA | CTCGAG | CCCGGG | GTTGTAGTGCTTG
 Inicio secuencia del vector PLJR962 | *EcoRI* *
 TGGTGGCA // CGCCGCAACTGCGGCGCTTTTTTTTTT | GAAT TCTCTGACCAGGG
 AAAATAGCCCTCTGACCTGGGGATTT GGATCCCTATCAGTGATAGATATA ATCTG
 GGA **ACCCCACTGGCGCCTGCGTGCCCTC** GTTTT TGT ACTCGAAAGAAGCTAC
 AAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAGGGTGTTTTT
 TTTTT | *Sall* * Fin de secuencia del vector PLJR962 | Primer Forward pMV261
 | *BamHI* | *MscI* | *PvuI* | *XhoI* | *SmaI* | *XmnI* | *XbaI* |
 TCCGT | GGATCC | TGGCCA | CGATCG | CTCGAG | CCCGGG | GAAGTCGTTT | TCTAGA
 | *NotI* | *NheI* | Secuencia al azar 3' TCGTGTCGTGATCGTAGCTAGGGTTAACAGGCGTCGTG-3'

Figura 5. Características de la secuencia del gblock para clonar el RNAg-*eccD3*. Señalando cada secuencia con su identificador en la parte de arriba. Secuencias al azar en la región 5' y 3' subrayadas. Secuencias de los primers y de las de las enzimas de restricción señaladas con su identificador. El inicio y fin de la secuencia de 247 pb del vector PLJR962 con el RNAg-*eccD3* integrado, está marcada con dos símbolos de dos líneas en diagonal (//). La secuencia del RNAg-*eccD3* se encuentra señalada con color gris y letras en negritas. El asterisco señala las enzimas utilizadas para clonar el fragmento que contiene al RNAg-*eccD3* en el vector PLJR962 (sección 6.3.2.2)

6.3.2.2. Clonación del RNAg.

Se realizó un ensayo de restricción enzimática para linealizar el vector purificado pLJR962 y, por otro lado, liberar el fragmento del RNAg-vector del gBlock con las enzimas *EcoRI* (New England Biolabs, MA, EUA) y *Sall* (New England Biolabs, MA, EUA) (enzimas referidas en la Figura 5). La reacción enzimática constaba de un volumen final de 15 µL conteniendo 1× de Buffer 3 (New England Biolabs, MA, EUA), 1 µL de cada una de las enzimas *EcoRI* y *Sall*, DNA plasmídico y DNA de gBlock en una relación 1:3 vector:gblock (ejemplo: 97.94 ng de DNA plasmídico, 6.18 ng de gBlock) y agua libre de nucleasas. La reacción enzimática se incubó por 2 h a 37°C en agitación constante a 300 rpm en el equipo Thermomixer Compact (Eppendorf, DA, Alemania). Posteriormente, las enzimas de restricción se inactivaron a 65°C por 20 min.

Además, se realizó una reacción de ligación agregando ATP (Invitrogen, MA, EUA) a una concentración final de 1mM y T4 DNA ligasa (New England Biolabs, MA, EUA) a la reacción de restricción previamente descrita, para después incubar a 16°C toda la noche.

La construcción obtenida de la ligación previa fue transformada en *E. coli* DH5 α utilizando el protocolo de choque térmico (Sambrook y Russell 2001). Brevemente se transfirió la construcción generada en la ligación obtenida previamente, colocando el DNA plasmídico en bacterias *E. coli* DH5 α competentes, para continuar con una incubación de 60 min en hielo, posteriormente se realizó el choque térmico colocando a las bacterias por 90 segundos a 42°C y 1 min en hielo. Después se agregó 1 mL de medio LB y se dejó incubando por 60 min a 37°C para posterior transferir 100 μ L del cultivo bacteriano transformado a placas con medio LB suplementado con kanamicina (20 μ g/mL), incubando las placas a 37°C toda la noche.

Las bacterias transformadas con la construcción pLJR962-RNAg-*eccD3* se seleccionaron por medio de su resistencia a kanamicina (20 μ g/mL).

6.3.3. Caracterización de la construcción pLJR962-RNAg-*eccD3*.

La identificación de la construcción pLJR962-RNAg-*eccD3* se realizó obteniendo el DNA plasmídico de la cepa de *E. coli* transformada con el vector pLJR962-RNAg-*eccD3* utilizando el protocolo de lisis alcalina en minipreparación estandarizada (Sambrook y Russell 2001). El DNA plasmídico obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría en un NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Wilmington, EUA) y se evaluó su calidad mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed (Biotium, Hayward, EUA). Posteriormente se realizó la caracterización mediante una amplificación por PCR punto final de la secuencia del RNAg-*eccD3* más una secuencia del vector como se muestra en la Figura 6, para obtener un producto amplificado de 186 pb. Para la amplificación de la región mencionada se utilizó la mezcla de reacción referida en la tabla 6. Las condiciones de amplificación fueron 95°C por 5 min de desnaturalización, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, de alineamiento a 55°C por 30 segundos y

de extensión a 72°C por 30 segundos, y un paso final de extensión a 72°C por 5 min. Los primers utilizados para amplificar se encuentran en la tabla 7.

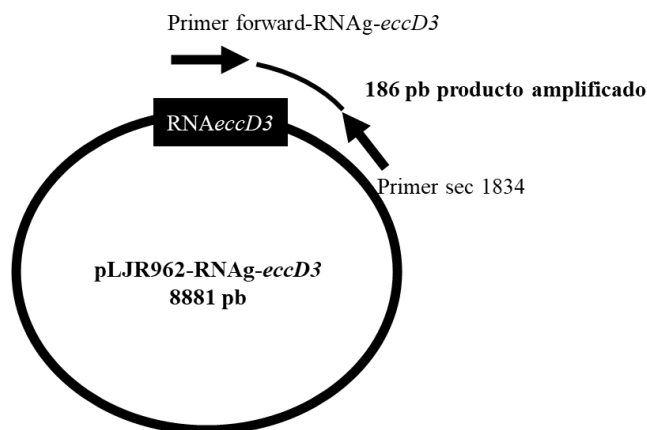


Figura 6. Estrategia para identificar la construcción pLJR962-RNAg-eccD3.

Tabla 6. Cálculos para la reacción de amplificación de identificación de la construcción pLJR962-RNAg-eccD3.

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	1 reacción
Buffer	10 ×	1 ×	2.5 µL
dNTP's	10 mM c/u	0.2 mM c/u	0.5 µL
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75 µL
Primer Forward	100 ng/ µL	2.5 ng µL	1 µL
Primer Reverse	100 ng/ µL	2.5 ng/ µL	1 µL
Taq polimerasa	5 U/ µL	0.03 U / µL	0.125 µL
H ₂ O libre de nucleasas			19. 125 µL
Volumen total			25 µL

Tabla 7. Primers utilizados para caracterizar la construcción pLJR962-RNAg-eccD3.

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Producto amplificado
Forward-RNAg-eccD3	5'-ACCCCACTGGCGCCTGC-3'	186 pb
Sec 1834	5'-TTCCTGTGAAGAGCCATTGA-3'	

Para verificar la fidelidad de la secuencia de la región de interés de la construcción plasmídica obtenida, se utilizó secuenciación automatizada. Se utilizó el primer Sec 1834 (Tabla 7) y como templado el DNA plasmídico de la construcción pLJR962-RNAg-eccD3 previamente obtenido. La secuenciación se realizó utilizando el servicio brindado por

LANBAMA (Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica Ambiental, IPICYT, S.L.P., México) utilizando el Gene Analyzer 3500 (Applied Biosystem, MA, EUA).

6.4. Generación de la cepa de *M. smegmatis* transformada

Se realizó una electroporación para transformar la cepa *M. smegmatis* mc² 155 con la construcción pLJR962-RNAg-*eccD3*. Para realizar la electroporación se inocularon 100 µL de un cultivo de *M. smegmatis* mc² 155 que se encontraba entre 2.22 a 4.6 unidades de McF en 10 mL de medio 7H9 suplementado con ADC y 0.05% de Tween 80; se generaron 5 cultivos de 10 mL y se dejaron incubando por 20 h a 37°C en agitación constante. Posteriormente el cultivo se incubó durante 40 min en hielo, continuando con dos centrifugaciones a 2,000 g por 10 min a 4°C después de las cuales se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla bacteriana en 40 mL de glicerol al 10% conteniendo Tween 80 al 20%, posteriormente se realizó una tercera centrifugación a 2,000 g por 10 min a 4°C eliminando el sobrenadante y se resuspendió la pastilla bacteriana en 5 mL de glicerol al 10% conteniendo Tween80 al 20%. Se colocaron 250 ng de DNA plasmídico de la construcción pLJR962-RNAg-*eccD3* en la cubeta de electroporación (Gene Pulser/MicroPulser electroporation cuvettes con 0.2 cm de separación entre los electrodos, BIO RAD, Berkeley, California) y posteriormente se colocaron los 5 mL del cultivo resuspendido, también se procesó una muestra de 5 mL del cultivo con el mismo procedimiento, pero esta no contenía DNA plasmídico, esta muestra representaba el control de la electroporación. La cubeta se colocó en el electroporador Gene Pulser Xcell Total Electroporation System (BIO RAD, CA, EUA) para generar un pulso de 2.5 kV, 1000 Ohms y 25 µFD, el cultivo electroporado se colocó en un tubo de 15 mL y se agregaron 2 mL de 7H9 suplementado con ADC y 0.05% de Tween 80 para dejarlo incubando a 37°C por 2 h en agitación constante. Después de la incubación se centrifugó el cultivo con la cepa transformada y el cultivo sin transformar a 2,000 g por 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante para posteriormente resuspender la pastilla bacteriana en 500 µL de 7H9 suplementado con ADC y 0.05% de Tween 80. Se tomaron 200 µL del cultivo resuspendido y se inocularon por extensión en placa en medio 7H10 suplementado OADC y 0.05% de Tween80 utilizando la kanamicina (20 µg/mL) como

marcador de selección. Las placas se incubaron de 3 a 4 días a 37°C hasta observar las colonias candidato. Se seleccionó un candidato y este se creció en medio líquido 7H9 suplementado con ADC y 0.05% de Tween 80 por 23 h. A partir de este cultivo, se realizó una extracción de DNA plasmídico de la cepa *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-*eccD3*, utilizando el kit PureLink™ Quick (Invitrogen, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante y agregando un paso extra después de la lisis. Se cultivó la cepa *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-*eccD3* por 23 h, obteniendo la pastilla bacteriana mediante centrifugaciones, resuspendiéndola en la solución del kit para posteriormente agregar la solución de lisis. La muestra con la solución de lisis se transfirió a un tubo Fast Prep el cual contiene una matriz de esferas de sílica de 0.1 mm (Matriz B, MP Biomedicals), colocando la muestra en el homogeneizador (Fast Prep, MP Biomedicals, OH, EUA) por tres ciclos de 6 m/s por 30 segundos para generar una lisis mecánica. Posterior se centrifugó la muestra y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo para colocar en una columna del Kit, para realizar un lavado de columna y seguir con la elución del DNA plasmídico utilizando las soluciones del kit. El DNA plasmídico extraído se cuantificó mediante espectrofotometría en un NanoDrop 2000 y se evaluó su calidad mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed. Posteriormente se realizó la amplificación de un fragmento de 186pb, como se muestra en la figura 6 el cual consta de la secuencia del RNAg-*eccD3* más una secuencia del vector. Los cálculos y condiciones de la PCR fueron las mencionadas anteriormente.

6.5. Evaluación de la inhibición del gen *eccD3* en *M. smegmatis*.

Se realizó la evaluación de la inhibición del gen *eccD3* en la cepa generada (*M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-*eccD3*) mediante dos métodos uno fenotípico y otro genotípico. Por otro lado, se utilizaron dos cepas control: la cepa *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-*mmpL3* y la cepa *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-scramble las cuales fueron generadas y caracterizadas en un trabajo previo en el laboratorio (Arriaga Guerrero 2021). La cepa *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-*mmpL3* es un control positivo del sistema CRISPRi debido a que el gen *mmpL3* es un gen esencial para la bacteria y al inhibirlo la bacteria no crece (Rock et al. 2017). La cepa *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-scramble es una cepa con un RNAg que contiene una secuencia al azar la cual no hibrida con ningún gen de *M.*

smegmatis por lo que esta no debe inhibir ningún gen de la bacteria, y nos permite demostrar que el sistema no causa ningún efecto en el crecimiento de la bacteria.

6.5.1. Evaluación fenotípica de la inhibición del gen *eccD3* en *M. smegmatis*.

Se evaluó el crecimiento de las cepas *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-*eccD3*, *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-*mmpL3* y *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-scramble en presencia del inductor del sistema CRISPRi, el clorhidrato de anhidrotetraciclina (ATc) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), a una concentración de 100 ng/mL (Rock et al. 2017) en medio sólido. Brevemente, las cepas se activaron en cultivos en medio líquido 7H9 suplementado con ADC y 0.05% de Tween 80 por 24h, se sembraron en medio líquido y se incubaron hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (20-24 h). A partir del cultivo líquido en fase exponencial se realizó una dilución en un volumen final de 200 µL para ajustar el cultivo y que presentará aproximadamente 7,700 células, siguiendo de diluciones seriadas 1 en 10 hasta llegará a la dilución 1 en 1000. De cada una de las diluciones anteriores se sembraron 10 µL de cultivo con triplicado técnico, utilizando la técnica de sembrado por goteo en placa con medio Middlebrook 7H10 agar suplementado con OADC al 10% y 0.05% de Tween80, con kanamicina (20 µg/mL) como marcador de selección y ATc (100 ng/mL) como inductor del sistema CRISPRi, incubando las placas a 37°C por 48 h.

Posterior de la incubación se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), seleccionando la dilución en donde se pudiera contar individualmente cada colonia. De cada uno de los experimentos se realizó triplicado biológico. Se utilizó la siguiente fórmula para obtener las UFC/mL de cultivo:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{UFC} * \text{factor de dilución}}{\text{volumen de muestra}}$$

6.5.1.1. Análisis estadístico de la evaluación fenotípica.

Se realizó una prueba de *t* de student para evaluar las diferencias entre los valores de UFC/mL de cada una de las cepas *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-*eccD3*, *M. smegmatis*-

pLJR962-RNAg-*mmpL3* y *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-scramble en presencia o ausencia de ATc. Seleccionando como valores significativos aquellos que presentaron una $p < 0.05$ en la prueba *t* de student.

6.5.2. Evaluación genotípica de la inhibición del gen *eccD3* en *M. smegmatis*.

Para evaluar genotípicamente la inhibición del gen *eccD3* se analizaron las cepas *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-*eccD3*, *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-scramble y *M. smegmatis* wild type, manteniendo el cultivo a 37°C en la fase exponencial (20 a 24 horas) de las cepas en ausencia o en presencia de ATc.

6.5.2.1. Extracción de RNA total de las cepas de *M. smegmatis*.

Se realizó una extracción de RNA total de las tres cepas seleccionadas. Primero se activó el cultivo de cada una de las cepas de *M. smegmatis* en Middlebrook 7H9 suplementado con ADC al 10% y 0.05% de Tween 80 más kanamicina (20 µg/mL) (cepas transformadas) incubándose toda la noche a 37°C. Se resembró el cultivo y se incubó a 37°C en agitación constante hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (20-24 h). A partir de este cultivo se inocularon 200 µL en 20 mL de medio 7H9 suplementado con ADC al 10% y 0.05% de Tween 80 más kanamicina (20 µg/mL) y se mantuvo el cultivo en presencia o ausencia de ATc (100 ng/mL) para inducir el sistema CRISPRi. El cultivo se incubó por 20 horas a 37°C en agitación constante a 300rpm. Después se centrifugó y se agregó 800 µL de TRizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) transfiriéndose a tubos de FastPrep, realizando el procedimiento de lisis mecánica mencionado en la sección 6.4. utilizando el homogeneizador FastPrep. Posteriormente se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5mL nuevo y estéril para la adición de cloroformo y la precipitación del RNA utilizando isopropanol y un lavado con etanol al 70%. El RNA total obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría en un NanoDrop 2000 y se visualizó en una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed.

6.5.2.2. Síntesis de cDNA de las cepas de *M. smegmatis*.

Se realizó el tratamiento con DNasa I (New England Biolabs, MA, EUA) al RNA total obtenido de cada una de las cepas *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-*eccD3*, *M. smegmatis*-

pLJR962-RNAg-scramble y *M. smegmatis* wild type. Se agregaron 2,000 ng de RNA total de cada una de las cepas, a la reacción conteniendo 2 Unidades de enzima DNAsa I (Invitrogen, Carlsbad, CA), buffer de la enzima 1 × y agua libre de nucleasas en un volumen total de 8 µL, para digerir los restos de DNA presentes en la muestra. Incubando la muestra por 10 min a 37°C seguido de 10 min a 75°C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed para confirmar la integridad del RNA de cada muestra.

Posteriormente, se realizó la retrotranscripción del RNA tratado con DNAsa I utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, CA, EUA) y *primers* aleatorios siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor. Para evaluar la funcionalidad del cDNA generado, se realizó una amplificación del gen *sigA* mediante una PCR punto final. Se utilizó el kit de la DNA polimerasa (No. de referencia 10342-020 Invitrogen, CA, EUA) para amplificar la secuencia del gen *sigA* para obtener un producto amplificado de 551 pb. Los cálculos de la reacción se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Cálculos para amplificar el gen *sigA*.

Reactivos	Amplificación de <i>sigA</i>		
	Concentración		1 reacción
	Inicial	Final	
Buffer	10 ×	1 ×	2.5 µL
dNTP's	10 mM c/u	0.2 mM c/u	0.5 µL
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75 µL
Primer Forward	100 ng/ µL	2.5 ng µL	1 µL
Primer Reverse	100 ng/ µL	2.5 ng/ µL	1 µL
Taq polimerasa	5 U/ µL	0.03 U / µL	0.125 µL
DNA blanco			1 µL
H ₂ O libre de nucleasas			18.125 µL
Total			25 µL

Las condiciones de la PCR fueron 95°C por 5 min de desnaturalización, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, de alineamiento a 59°C por 1 min y de extensión a 72°C por 1 min, y un paso final de extensión a 72°C por 5 min. Se utilizaron los primers

forward Msmeg_sigA-F2 con secuencia 5'-ACG CAA AGA CGC CGA GCT GA-3' y el primer reverse Msmeg_sigA-R3 con secuencia 5'-GCT CTT CGG GCG TGG GCT C-3', diseñados en un trabajo previo (Granados-Tristán et al. 2020). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed para confirmar la amplificación del gen *sigA* y confirmar la funcionalidad de cada muestra.

6.5.2.3. PCR en tiempo real del gen *eccD3*.

El análisis de los niveles de expresión del gen *eccD3* se realizó para cada una de las muestras del cDNA obtenido utilizando el método cuantitativo, utilizando como control endógeno el gen *sigA*. Se utilizaron sondas TaqMan con el sistema 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) (Tabla 9). La reacción de PCR se preparó en un volumen final de 25 μ L el cual contenía la mezcla maestra de PCR para ensayos TaqMan® 1 $\times$ (Applied Biosystems) más 400 mM de primers/sondas y 3 μ L de cDNA como templado obtenido de las cepas en ausencia y en presencia de ATc (100 ng/mL). Las condiciones de amplificación fueron 1 min a 50°C de incubación inicial, 10 min a 95°C de desnaturalización inicial, y 50 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C.

Tabla 9. Sondas TaqMan utilizadas.

Gen	Sonda 5'-3'	Primer Forward 5'-3'	Primer Reverse 5'-3'
<i>eccD3</i>	GTCGCCGCGTGGTCG TTGATCAGCA	GTCGCCGCGTGGTC	CGGTGAACACCGCGATAC
<i>sigA</i>	GCATGTCGCGGCGCT GCTGCACTGG	CGCCTCCAGCAGATGGT TTT	CGAGAAGGGCGAGAAGCT

Se estableció la curva de rango dinámico de amplificación realizando diluciones seriales del cDNA a partir de la dilución 1:8 a 1:128, con triplicados técnicos y controles negativos en cada ensayo. Se utilizó como control endógeno para el análisis de expresión el gen *sigA* en paralelo. El análisis de los resultados fue por medio del método comparativo de doble delta del CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (Schmittgen y Livak 2008).

El análisis estadístico de la expresión del gen *eccD3* de las muestras se realizó utilizando una prueba *t* de student de los valores obtenidos del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ comparando entre cada una de las cepas *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-*eccD3*, *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-scramble y *M. smegmatis* wild type.

6.6. Evaluación de la susceptibilidad de las cepas de *M. smegmatis* a fármacos antituberculosis.

El análisis de la inhibición del gen *eccD3* en presencia de diferentes fármacos antituberculosis se realizó evaluando el crecimiento de las cepas *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-*eccD3*, *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-scramble y la cepa *M. smegmatis* wild type en presencia de diferentes fármacos, usando como control el crecimiento en presencia y ausencia de ATc a una concentración de 100 ng/mL para activar o mantener apagado el sistema de CRISPRi, respectivamente.

Se realizó el análisis con los fármacos isoniazida, rifampicina, linezolid, levofloxacin, (obtenidos de Sigma-Aldrich, MO, EUA), moxifloxacin, bedaquilina y protionamida (obtenidos de ChemCruz, SantaCruz Biotech, CA, EUA). Se preparó la solución stock de cada fármaco siguiendo las instrucciones del proveedor (Tabla 10).

Tabla 10. Solubilidad y concentración del stock de fármacos anti-TB.

Fármacos	Solubilidad	Concentración del stock
Isoniazida	Agua libre de nucleasas	10 mg/mL
Rifampicina	DMSO	102.4 mg/mL
Linezolid	Agua libre de nucleasas	5 mg/mL
Bedaquilina	DMSO	0.768 mg/mL
Levofloxacin	NaOH(1N):H ₂ O 1:10	1 mg/mL
Moxifloxacin	NaOH(1N):H ₂ O 1:10	1 mg/mL
Protionamida	DMSO	512 mg/mL

Para evaluar el crecimiento de las cepas y el efecto de los fármacos, se utilizaron dos métodos: el método de microdilución en placa con el compuesto resazurina-REMA y curvas de crecimiento de cada cepa de *M. smegmatis* en presencia de 3 diferentes concentraciones de fármaco de manera independiente, las cuales fueron seleccionadas

dependiendo de la Concentración mínima inhibitoria (CMI.) encontrada para cada fármaco en cada una de las cepas (la CMI, una concentración serial antes y una concentración serial después de la CMI obtenida).

6.6.1. Método de microdilución en placa con el compuesto de resazurina.

Se utilizó el método de microdilución en placa con el compuesto resazurina para evaluar la CMI de cada uno de los fármacos mencionados. La CMI es la concentración más baja de un fármaco en donde no se observa crecimiento de la bacteria, por lo tanto, utilizando el método de REMA la CMI se observa en el cultivo con una coloración azul debido a que no existe crecimiento de la bacteria, mientras que cuando existe crecimiento bacteriano, la resazurina se oxida provocando que el cultivo cambie a una coloración rosa. Se realizó la búsqueda de la CMI de cada fármaco en *M. smegmatis* en la literatura. En el caso del fármaco de protionamida no se encontraron reportes de la CMI en *M. smegmatis*; pero, por otro lado, si existen reportes de la etionamida, por lo tanto, como este fármaco es análogo de la protionamida, se tomó la CMI de este fármaco como referencia (Tabla 10) (Agrawal et al. 2015; Coban et al. 2014).

Para la realización del ensayo REMA se utilizó una placa de 96 pozos, para evaluar un rango de concentraciones establecidas de acuerdo con la CMI obtenida en la literatura de cada uno de los fármacos antituberculosis seleccionados (Tabla 11). Se realizaron diluciones seriadas de las concentraciones seleccionadas de los fármacos partiendo de una concentración inicial de fármaco en un volumen de 100 μ L en el primer pozo, posteriormente se realizaron diluciones seriales a partir de 1:2 hasta el rango mencionado en la Tabla 10 dependiendo del fármaco, en un volumen final de 100 μ L. La placa se inoculó con un cultivo que se encontraba en fase logarítmica (20-24 h) el cual fue previamente ajustado a 2.7 unidades de McF a partir del cual se realizó una dilución 1:1000 la cual fue inoculada en cada uno de los pozos de la placa de 96 pozos colocando 50 μ L de cultivo en cada uno de ellos. Posteriormente se incubó la placa a 37°C por 40 h. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

Tabla 11. CMI y rangos de los fármacos antituberculosis utilizados.

Fármacos	CMI en <i>M. smegmatis</i>	Rango de concentraciones
Isoniazida	8 µg/mL (Agrawal et al. 2015)	256 - 0.25 µg/mL
Rifampicina	0.8 µg/mL (Agrawal et al. 2015)	51.6 - 0.05 µg/mL
Linezolid	<1 µg/mL (Saffo y Ognjan 2016)	8 - 0.007 µg/mL
Bedaquilina	0.024-0.048 µg/mL (Lelovic et al. 2020)	0.384 – 0.00037 µg/mL
Levofloxacino	0.125 µg/mL (Jeong et al. 2020)	8 - 0.007 µg/mL
Moxifloxacino	< 0.25 µg/mL (Saffo y Ognjan 2016)	8 - 0.007 µg/mL
Protionamida	No existe	256 - 0.25 µg/mL
Etionamida	64 µg/mL (Do et al. 2022)	--

Posterior a las 40 h de incubación, se agregaron 30 µL de resazurina a una concentración de 0.2 mg/mL en cada pozo, para continuar con una incubación de 6 h a 37°C en agitación constante. Finalmente se tomaron fotografías de cada placa utilizando el transiluminador de Benchtop UV en conjunto con el MultiDoc-It Digital Imaging System, utilizando un convertidor de luz UV a luz blanca de 21 cm × 26 cm para capturar las imágenes; seleccionando luz blanca en la parte de superior y luz UV en la parte inferior del transiluminador.

6.6.2. Curvas de crecimiento bacteriano

Con la finalidad de evaluar el efecto del fármaco en las cepas *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-*eccD3*, *M. smegmatis*-pLJR962-RNAg-scramble y la cepa *M. smegmatis* wild type, se evaluó el crecimiento de estas durante 27 h en presencia de diferentes concentraciones de fármacos antituberculosis como se describió en la sección 6.6. A partir de un cultivo en fase exponencial se ajustó el cultivo a 1 unidad de McF para después realizar una dilución 1:100, y ese cultivo diluido (1:100) se utilizó para inocular la placa de 96 pozos con 200 µL en cada pozo. Las placas se incubaron en el equipo Synergy HT (Biotek, Agilent, CA, EUA) evaluando la absorbancia del cultivo contenido en pozo a 600 nm cada hora por 27 h.

El análisis estadístico que se realizó para evaluar las diferencias entre las cepas en presencia o de anhidrotetraciclina (inductor del sistema CRISPRi), y las diferencias entre

la cepa con *eccD3* inhibido y la cepa control (*M. smegmatis* PLJR962-RNAg-scramble), fue un ANOVA de medidas repetidas seleccionando como variable dependiente la absorbancia obtenida en el tiempo (lectura de cada hora) y como variables independientes la presencia o ausencia de ATc y el tipo de cepa. Se utilizó el software IBM SPSS Statistics 23 (IBMCorp. 2015). Se realizó un triplicado de cada uno de los ensayos realizados obteniendo su promedio para realizar las gráficas de las curvas de crecimiento de cada una de las cepas mencionadas.

6.7. Evaluación del potencial farmacológico de EccD3 y proteínas del sistema de secreción ESX3

6.7.1. Obtención de la estructura tridimensional de las proteínas del sistema ESX3.

Se realizó una búsqueda en la literatura y en la base de datos Protein data bank (PDB) (Berman et al. 2000) (<https://pdb101.rcsb.org/>) para obtener las estructuras 3D de las proteínas del sistema de secreción ESX3 de *M. tuberculosis*, las cuales aún no han sido reportadas. Por otro lado, se localizaron las estructuras de las proteínas homólogas del sistema ESX3 pertenecientes a *M. smegmatis*. Además, la secuencia aminoacídica de cada uno de los componentes del sistema de secreción ESX3 (Tabla 12) se obtuvieron de la base de datos de proteínas UniProt (UniProt-Consortium 2023) (<https://www.uniprot.org/>).

Tabla 12. Secuencia aminoacídica de las proteínas del sistema de secreción ESX3.

Proteína	UniProtKB	Aminoácidos	Organismo
EccB3	P9WNR3	538	<i>M. tuberculosis</i>
EccC3	P9WNA9	1, 330	<i>M. tuberculosis</i>
EccD3	P9WNQ3	472	<i>M. tuberculosis</i>
EccE3	P9WJE5	331	<i>M. tuberculosis</i>

La estructura tridimensional (3D) de las proteínas EccB3, EccD3, EccC3 y EccE3 de *M. tuberculosis* se obtuvo mediante un modelado por homología utilizando como blanco la estructura 3D de cada una de las proteínas mencionadas de *M. smegmatis* como modelo (PDB 6UMM) (Poweleit et al. 2019), utilizando el servidor en línea de SwissModel

(Waterhouse et al. 2018) (<https://swissmodel.expasy.org/>). En el caso del dominio ATPasa de la proteína EccC3 se utilizó la estructura del dominio ATPasa número III, perteneciente a *M. tuberculosis* con su código PDB: 6J17 (Wang et al. 2020).

Para la preparación de las estructuras proteicas se eliminaron moléculas de solventes o iones presentes, además se agregaron átomos de hidrógeno faltantes y se asignaron las cargas correspondientes utilizando el campo de fuerza AMBER ff14SB a cada una de las estructuras 3D obtenidas. Posteriormente, con la finalidad de obtener la estructura más estable se realizó una minimización de energía de cada una de las estructuras proteicas utilizando como parámetros 10,000 de steepest descent steps, 0.02 Å de steepest descent size, 1000 de conjugate gradient steps y 0.02 Å de conjugate gradient step size, utilizando el software USCF Chimera versión 1.14 (Pettersen et al. 2004).

El modelo del dímero de protómeros del sistema de secreción ESX3 de *M. tuberculosis* se generó a partir de las estructuras proteicas obtenidas anteriormente utilizando como modelo las coordenadas de la estructura del PDB 6UMM (Poweleit et al. 2019), así mismo se utilizó esta estructura del PDB 6UMM para realizar un superposicionamiento de cada estructura obtenida de *M. tuberculosis* contra la estructura de *M. smegmatis* en el software USCF Chimera versión 1.14.

6.7.2. Obtención de la estructura 3D de los ligandos.

Se seleccionaron 34 ligandos para evaluar sus interacciones con las proteínas del sistema de secreción ESX3 de *M. tuberculosis*. De estos ligandos, 23 moléculas corresponden a los fármacos de primera y segunda línea utilizados como tratamiento para la tuberculosis (Parums 2021), y 11 moléculas fueron seleccionadas de la literatura en donde se ha reportado tratamiento nuevo para la tuberculosis basado en la reposición de fármacos (Kanvatirth et al. 2019; Mourenza et al. 2020) (Tabla 13). La molécula de ATP se agregó como control positivo de la simulación de las interacciones fármaco y el dominio ATPasa III de EccC3. Cada estructura 3D de los ligandos se construyó utilizando el software Chimera mediante la herramienta “Build structure”, evaluando su estructura y enlaces de cada átomo con la información obtenida de la base de datos PubChem

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Kim et al. 2021) a partir de su número de identificación o el código SMILE (the canonical Simplified Molecular Input Line Entry system). Posterior a su construcción se minimizó la energía de cada molécula utilizando el software USCF Chimera versión 1.14 con los parámetros de 10,000 steepest descent steps, de 0.02 Å steepest descent size, de 1000 conjugated gradient steps y de 0.02 Å conjugated gradient size, generando el archivo MOL2 de cada ligando. Posteriormente se agregaron cargas, hidrógenos faltantes y se seleccionaron enlaces rotables de las moléculas utilizando AUTODOCK TOOLS (Morris et al. 2009), para generar la estructura 3D con las características mencionadas en la Tabla 14, y finalmente obtener el archivo PDBQT como estructura final de cada fármaco seleccionado.

Tabla 13. Moléculas utilizadas como ligandos en el presente estudio.

No	Molécula	CID	No	Molécula	CID
1	Isoniazida	3767	19	Cicloserina	6234
2	Pirazinamida	1046	20	Tioacetazona	9568512
3	Etambutol	14052	21	Ácido tiosulfúrico	24478
4	Rifampicina	135398735	22	Viomicina	54677440
5	Rifapentina	135403821	23	Enviomicina	135565326
6	Rifalazil	135431094	24	Florfenicol	114811
7	Rifabutina	135398743	25	Vanoxerina	3455
8	Amikacina	37768	26	Metformina	4091
9	Estreptomicina	19649	27	Vitamina D	5280795
10	Kanamicina	6032	28	Simvastatina	54454
11	Levofloxacino	149096	29	Tamoxifeno	2733526
12	Esparfloxacino	60464	30	Fluvastatina	446155
13	Pazufloxacino	65957	31	Avermectina	6858006
14	Etionamida	2761171	32	Ivermectina	6321424
15	Pretomanida	456199	33	Moxidectina	9832912
16	Bedaquilina	5388906	34	Selamectina	9578507
17	Linezolid	441401	35	ATP	5957
18	Ácido aminosalicílico	4649			

Tabla 14. Características seleccionadas para cada uno de los ligandos.

Molécula	H no polares fusionados	Carbonos aromáticos	Enlaces rotables	TORSDOF
Isoniazida	4	5	3	2
Pirazinamida	3	4	2	1
Etambutol	20	--	11	11
Rifampicina	52	6	10	10
Rifapentina	58	6	11	11
Rifalazil	59	10	10	10
Rifabutina	57	11	9	9
Amikacina	26	--	23	22
Estreptomina	23	--	20	16
Kanamicina	21	--	17	17
Levofloxacino	19	9	3	3
Esparfloxacino	18	9	5	5
Pazufloxacino	12	12	4	4
Etionamida	8	5	3	3
Pretomanida	12	9	6	6
Bedaquilina	30	25	9	9
Linezolid	19	6	5	4
Ácido aminosalicílico	3	6	4	4
Cicloserina	3	--	1	1
Tioacetazona	8	6	6	5
Ácido tiosulfúrico	--	--	3	3
Viomicina	16	--	8	7
Enviomicina	24	--	19	16
Florfenicol	12	6	8	7
Vanoxerina	32	18	10	10
Metformina	6	--	4	0
Vitamina D	43	--	7	7
Simvastatina	37	--	8	8
Tamoxifeno	29	18	8	8
Fluvastatina	23	14	11	11
Avermectina	69	--	11	11
Ivermectina	71	--	11	11
Moxidectina	51	--	5	5
Selamectina	60	--	7	7
ATP	8	5	15	15

TORSDOF, torsional degree of freedom

6.7.3. Selección del sitio de unión de ligandos.

El primer sitio de unión de ligandos seleccionado fue en el dominio ATPasa III de EccC3, seleccionando el sitio catalítico en donde se une la molécula de ATP, el cual ha sido reportado en la literatura, tanto de manera teórica como su estructura 3D del complejo proteína-ligando (Wang et al. 2020). Este sitio se seleccionó con la finalidad de inhibir la actividad de secreción del sistema ESX3.

Se realizó un análisis para predecir las interfaces que se encuentran en el dímero de protómeros que conforman la estructura 3D del sistema de secreción ESX3 de *M. tuberculosis* utilizando el servidor en línea PDBePISA (https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver) (Krissinel y Henrick 2007). Además, se utilizó la información que se encuentra en la literatura sobre la estructura del sistema de secreción ESX3 (Poweleit et al. 2019; Famelis et al. 2019). A partir de este análisis se seleccionaron cinco sitios de unión para los ligandos seleccionados. Por lo tanto, se seleccionaron seis sitios de cada estructura proteica para evaluar las interacciones con los fármacos mostrados en la Tabla 13.

6.7.4. Acoplamiento molecular.

El acoplamiento molecular entre cada uno de los sitios de unión de fármacos seleccionados en las proteínas contra los ligandos se realizó utilizando el software AutoDock Vina (Trott y Olson 2010). Se realizó cada uno de los acoplamientos moleculares con los parámetros de 6 para exhaustividad de búsqueda, 1 de numero de modos de unión y 3 kcal/mol de máxima energía de diferencia. Las coordenadas de las cajas de búsqueda en cada acoplamiento molecular de cada uno de los seis sitios seleccionados se mencionan en la Tabla 15.

Tabla 15. Coordenadas de las cajas de muestra de cada sitio seleccionado.

Proteína	Grid center (x, y, z)	Tamaño Å
EccB3	163.052, 160.002, 144.649	- 36.4192, 49.7789, 48.8539

EccD3 N-terminal	215.316, 208.195, 196.713	25.676, 23.5991, 41.3019
EccD3 C-terminal	217.127, 178.081, 181.243	26.1652, 32.091, 42.0759
Dominio III ATPasa de EccC3	22.59, -7.20, 23.23	30.00, 33.00, 30.00
ESX3 protómero 1	159.167, 162.145, 197.592	44.9949, 49.4289, 48.4317
ESX3 protómero 2	189.304, 172.168, 210.911	56.6132, 42.4863, 41.0964

Se realizaron 10 repeticiones independientes de cada simulación de cada acoplamiento molecular realizando una automatización de la simulación mediante un bash script para realizar cada una de las simulaciones.

Se generó una matriz de datos a partir de los resultados del cambio libre de energía (ΔG_b) de cada acoplamiento molecular de cada proteína-fármaco. Las poses predichas de cada acoplamiento molecular se evaluaron utilizando el software USCF Chimera versión 1.14 y el software Chimera X versión 1.2.5 (Pettersen et al. 2021) para visualizar tridimensionalmente cada pose, y para tener una visualización de dos dimensiones se utilizó LigPlot (Wallace et al. 1995).

6.7.5. Estadística para el acoplamiento molecular.

A partir de la matriz de datos generada de los resultados del ΔG_b de cada una de las 10 repeticiones independientes de cada acoplamiento molecular, se seleccionó la pose con el menor ΔG_b obtenido de cada una de las 10 repeticiones independientes. Se realizó una normalización de los datos de la matriz numérica utilizando la función estadística del lenguaje R *heatmap2* (Warnes et al. 2020). Se utilizaron los datos de las filas (ligandos) y de las columnas (proteínas) para escalarlos con la finalidad de obtener el promedio = 0 y una desviación estándar = 1 generando un mapa de calor con los valores Z obtenidos a partir del promedio y desviación estándar.

Los valores Z generados se utilizaron para seleccionar las poses con la mejor energía de unión de los complejos proteína-fármaco, utilizando los siguientes criterios:

- Valores Z menores a -1.

- Interacciones moleculares de los fármacos con los aminoácidos que forman las interfaces de las proteínas.

Bajo los criterios anteriores se seleccionaron las mejores interacciones proteína-fármaco.

6.8. Evaluación de las propiedades de las avermectinas.

Los fármacos que pertenecen a la familia de las avermectinas presentaron las mejores interacciones con los sitios de unión en las proteínas.

Se utilizó el código SMILE de los fármacos de la familia de las avermectinas obtenido en PubChem para evaluar sus propiedades. La actividad biológica de las avermectinas se predijo utilizando la plataforma PASS online (<http://way2drug.com/passonline/>) (Filimonov et al. 2014) la cual se basa en un algoritmo bayesiano. Los datos de salida que genera la plataforma son la probabilidad de determinada actividad biológica (Pa) valorada entre 0 y 1, en donde 1 indica que la actividad ocurrirá en un 100% mientras que un 0 significa que es imposible que ocurra la actividad.

Además, se evaluó la toxicidad que producen las avermectinas utilizando el servidor de Pro-Tox II (https://tox-new.charite.de/protox_II/) (Banerjee et al. 2018), el cual se basa en la similaridad química de las moléculas e identificación de fragmentos tóxicos usando compuestos con toxicidad conocida mediante valores de LD50 en roedores. Los resultados generados es la probabilidad de toxicidad la cual indica si es activa o inactiva.

La absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de las avermectinas se predijo utilizando la herramienta del servidor en línea SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) (Daina et al. 2017), el cual está basado en diferentes métodos como BOILED-Egg, iLOGP, SILICOS-IT y Radar Bioavailability.

6.9. Evaluación de la inhibición del gen *eccD3* en presencia de ivermectina.

Se utilizó la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* que presenta la inhibición del gen *eccD3*, para evaluar su crecimiento en presencia del fármaco ivermectina (Sigma-Aldrich, MO, EUA), de acuerdo con los resultados obtenidos del ensayo *in silico*. Se

realizó una solución stock de ivermectina diluida en DMSO, partiendo de esa solución se generó la solución de trabajo la cual se diluyó en medio 7H9 suplementado con ADC mezclando a una velocidad de 300 rpm y a una temperatura de 37°C. Además, se utilizaron las cepas *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble y *M. smegmatis wild type* para evaluar su crecimiento en presencia de ivermectina. Se utilizó el método de REMA para determinar la CMI de ivermectina de cada cepa, posteriormente se realizó una curva de crecimiento de cada cepa de *M. smegmatis* en presencia de diferentes concentraciones de ivermectina. Los rangos de concentración de la ivermectina utilizados en el REMA fueron de 4096 µg/mL a 0.25 µg/mL, tomando en cuenta que la CMI para ivermectina en *M. smegmatis* es de 8 µg/mL. La metodología para el REMA y la curva de crecimiento se realizó de acuerdo con los procedimientos mencionados previamente en las secciones anteriores.

7. RESULTADOS

7.1. Comparación de las secuencias del gen *eccD3* entre *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*.

Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas del gen *eccD3* y de los demás genes del clúster del sistema de secreción ESX3 de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, a partir de los cuales se realizó un alineamiento observando una similitud e identidad de más del 66% (Tabla 16) (Tabla 17) (Anexo B).

Tabla 16. Resultados del alineamiento de las secuencias del clúster de genes ESX3 de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*.

Clúster ESX3	No. ID NCBI	Coordenadas	Tamaño	Similitud	Identidad
<i>M. smegmatis</i>	CP000480.1	702,737-704,164	1,428 pb	66.8 %	66.8%
<i>M. tuberculosis</i>	NC_000962.3	353,083-354,501	14,746 pb		

Tabla 17. Resultados del alineamiento de las secuencias del gen *eccD3* de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*.

Gen <i>eccD3</i>	No. ID NCBI	Coordenadas	Tamaño	Similitud	Identidad
<i>M. smegmatis</i>	CP000480.1	691,998-706,477	14,480 pb	68.4%	68.4%
<i>M. tuberculosis</i>	NC_000962.3	342,130-356,875	14,746 pb		

El alineamiento de cada una de las secuencias de los componentes del clúster entre las dos bacterias muestra que las secuencias de los genes que codifican para las proteínas que se encuentran en el citoplasma y son accesorias para el sistema (EccA3 y EspG3,) presentan menor similitud entre el 47% al 55% en comparación de las secuencias que codifican para las proteínas que forman el sistema de secreción (EccB3, EccC3 y EccE3) las cuales presentan una similitud arriba del 60%, excepto en el caso del gen que codifica para la proteína EccE3 en donde su similitud es del 55.3%, además los genes de las proteínas que son secretadas (PE5, PPE4, EsxG y EsxH) por este sistema también presentan una similitud arriba del 60% (Tabla 18).

Tabla 18.Resultados del alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los componentes del clúster de genes del sistema de secreción ESX3.

Bacteria	Gen	Coordenadas	Tamaño	Similitud	Identidad
<i>M. smegmatis</i>	<i>eccA3</i>	691,998-693,767	1,770 pb	47.4 %	47.4%
<i>M. tuberculosis</i>		342,130-344,025	1,896 pb		
<i>M. smegmatis</i>	<i>eccB3</i>	693,764-695,320	1,557 pb	69.6%	69.6%
<i>M. tuberculosis</i>		344,022-345,638	1,617 pb		
<i>M. smegmatis</i>	<i>eccC3</i>	695,317-699,294	3,078 pb	74.7%	74.7%
<i>M. tuberculosis</i>		345,635-349,627	3,993 pb		
<i>M. smegmatis</i>	PE5	699,291-699,602	312 pb	68.7%	68.7%
<i>M. tuberculosis</i>		349,624-349,932	309 pb		
<i>M. smegmatis</i>	PPE4	699,604-701,175	1,572 pb	60.8%	60.8%
<i>M. tuberculosis</i>		349,935-351,476	1,542 pb		
<i>M. smegmatis</i>	<i>esxG</i>	701,225-701,518	294 pb	67.6%	67.6%
<i>M. tuberculosis</i>		351,525-351,818	294 pb		
<i>M. smegmatis</i>	<i>esxH</i>	701,553-701,840	288 pb	76.5%	76.5%
<i>M. tuberculosis</i>		351,848-352,138	291 pb		
<i>M. smegmatis</i>	<i>espG3</i>	701,853-702,854	882 pb	54.2%	54.2%
<i>M. tuberculosis</i>		352,149-353,036	888 pb		
<i>M. smegmatis</i>	<i>mycP3</i>	704,172-705,551	1,380 pb	66.6%	66.6%
<i>M. tuberculosis</i>		354,498-355,883	1,386 pb		
<i>M. smegmatis</i>	<i>eccE3</i>	705,548-706,477	930 pb	55.3%	55.3%
<i>M. tuberculosis</i>		355,880-356,875	996 pb		

Se utilizó el número de ID del NCBI de *M. smegmatis* CP000480.1 y de *M. tuberculosis* NC_000962.3.

7.2. Evaluación de la susceptibilidad de las cepas de *M. smegmatis* a los fármacos antituberculosis.

La inhibición del gen *eccD3* se realizó utilizando la técnica de CRISPRi siguiendo el protocolo de Rock y sus colaboradores (Rock et al. 2017). Generando una cepa de *M. smegmatis* con el gen *eccD3* inhibido, una cepa control con el gen *mmpL3* inhibido y otra cepa con una secuencia nucleotídica al azar la cual no genera inhibición de ningún gen debido a que el RNAg no se une a ninguna secuencia del genoma de la bacteria. En la

siguiente sección se muestran los resultados de la generación de la construcción del vector para inhibir el gen *eccD3*.

7.2.1. Construcción del vector PLJR962 con el RNAg.

Se realizó la ligación del vector PLJR962 con el RNAg para inhibir el gen *eccD3* para continuar con la transformación de la cepa *E. coli DH5α* con la construcción. Se seleccionaron los candidatos que crecieron en el medio LB con kanamicina caracterizándolos por PCR. Para verificar la presencia de la construcción PLJR962-RNAg-*eccD3* se realizó la amplificación de una secuencia de 186 pb (Figura 7), la cual contiene la secuencia del RNAg-*eccD3* y una secuencia del vector, observando a partir de la amplificación realizada del candidato 1 un producto amplificado de aproximadamente 186 pb (Figura 7A), por lo tanto, se seleccionó este candidato para continuar con la caracterización. Se secuenció el DNA plasmídico del candidato 1 observando que la secuencia corresponde con la construcción PLJR962-RNAg-*eccD3* (Figura 7B).

La construcción PLJR962-RNAg-*eccD3* obtenida por purificación de DNA plasmídico a partir del candidato 1 de la cepa *E. coli* siguiente fue electroporada en *M. smegmatis*. Se seleccionó un candidato que creciera en el medio 7H10 suplementado con OADC y conteniendo kanamicina como fármaco de selección (Figura 8A). Para después realizar una extracción de DNA plasmídico y realizar una amplificación para caracterizar la construcción PLJR962-RNAg-*eccD3* en *M. smegmatis*, observando un fragmento de aproximadamente 186 pb (Figura 8B).

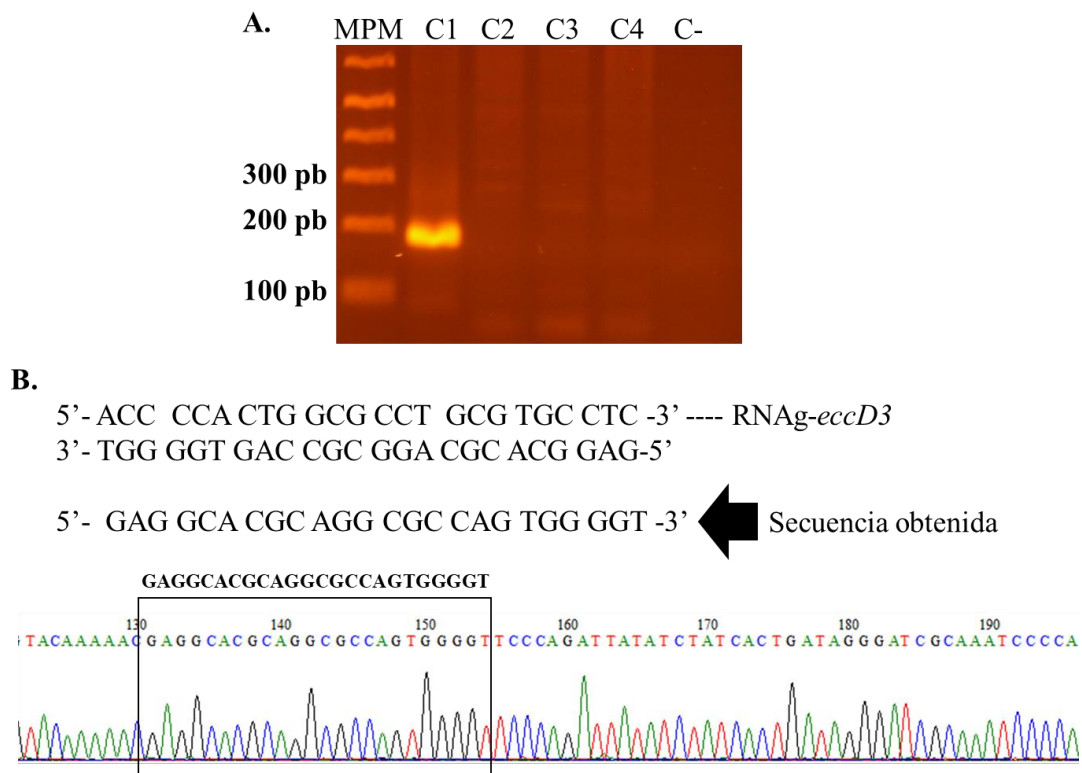


Figura 3. Caracterización de la construcción PLJR962-RNAg-*eccD3* en *E. coli*. A. Amplificación de un fragmento de 186 pb conformado por la secuencia del RNAg-*eccD3* y una secuencia del vector PLJR962. Electroforesis en gel de agarosa al 2% corrimiento de 50 min a 100 Volts. Los símbolos MPM corresponde al marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder, C1, C2, C3, C4 y C5 corresponden a los candidatos de *E. coli* con la construcción PLJR962-RNAg-*eccD3* obtenidos. C- se refiere al control negativo de la amplificación (H₂O). B. Secuencia del candidato 1 mostrando la calidad del electroferograma con la secuencia de referencia correspondiente al RNAg-*eccD3*.

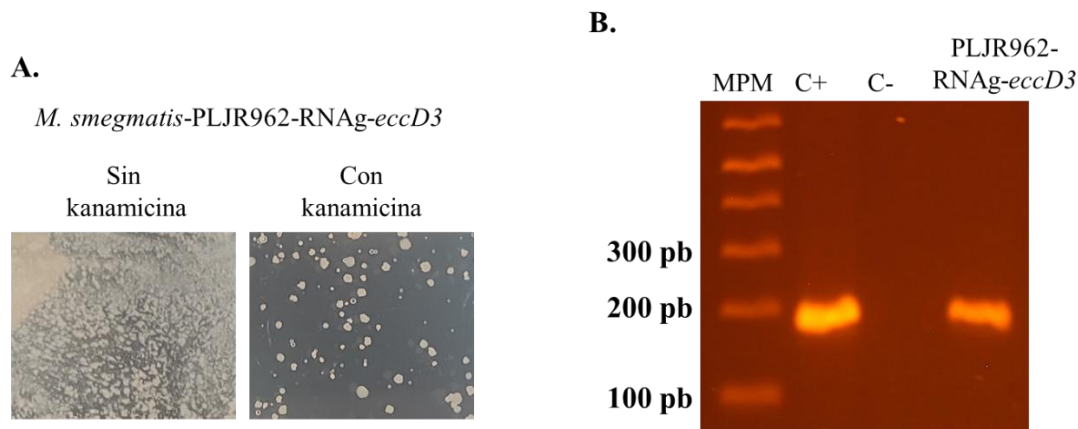


Figura 4. Caracterización de la construcción PLJR962-RNAg-*eccD3* en *M. smegmatis*. A. Candidatos obtenidos de la electroporación de la construcción PLJR962-RNAg-*eccD3* en *M. smegmatis*. Se muestra el crecimiento de la bacteria con y sin kanamicina (20 ng/μL). B. Amplificación de un fragmento de 186 pb correspondiente a la secuencia del RNAg-*eccD3* y una secuencia del vector PLJR962. Electroforesis en gel de agarosa al 2% corrimiento de 50 min a 100 Volts. MPM corresponde al marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder; C+ corresponde al control positivo (DNA plasmídico de PLJR962-RNAg-*eccD3* obtenido a partir del candidato 1 de *E. coli*); C- corresponde al control negativo (H₂O); y PLJR962-RNAg-*eccD3* corresponde al DNA plasmídico obtenido del candidato 1 seleccionado en *M. smegmatis*.

7.3. Evaluación de la inhibición del gen *eccD3* en *M. smegmatis*.

Para evaluar la inhibición del gen *eccD3* se realizaron análisis fenotípicos y genotípicos, utilizando el método de sembrado por goteo-dilución en placa y la PCR tiempo real, respectivamente.

7.3.1. Análisis fenotípico de la inhibición del gen *eccD3*.

El sistema CRISPRi utilizado es encendido por la anhidrotetraciclina (ATc), por lo tanto, para evaluar si la inhibición del gen afecta el crecimiento de la bacteria se evaluó el crecimiento en presencia y ausencia de ATc. Se puede observar que la inhibición del gen *eccD3* no afecta el crecimiento de la cepa *M. smegmatis* pLJR962-RNAg-*eccD3* (Tabla 19) (Figura 9A), tampoco se observan diferencias en el crecimiento de la cepa *M. smegmatis* pLJR962-RNAg-scramble (Tabla 19) (Figura 9C). En la cepa *M. smegmatis* pLJR962-RNAg-*mmpL3* se observa una diferencia significativa en su crecimiento cuando se encuentra en presencia de ATc lo que indica que el sistema CRISPRi está inhibiendo el gen *mmpL3* (Tabla 19) (Figura 9B). Estos resultados nos indican que el sistema

CRISPRi funciona correctamente y no causa ninguna alteración en el crecimiento de la bacteria en las cepas analizadas.

Tabla 19. Promedio de las UFC/mL de cada una de las cepas en presencia o ausencia de ATc.

Unidades formadoras de colonias UFC / mL					
<i>M. smegmatis</i> -PLJR962- RNAg- <i>eccD3</i>		<i>M. smegmatis</i> -PLJR962- RNAg- <i>mmpL3</i>		<i>M. smegmatis</i> -PLJR962- RNAg-scramble	
sin ATc	ATc	sin ATc	ATc	sin ATc	ATc
833333.3	933333.3	366666.7	0	666666.7	533333.3
1766666.7	1433333.3	966666.7	0	966666.7	933333.3
1200000	1300000	866666.7	0	1033333.3	1000000

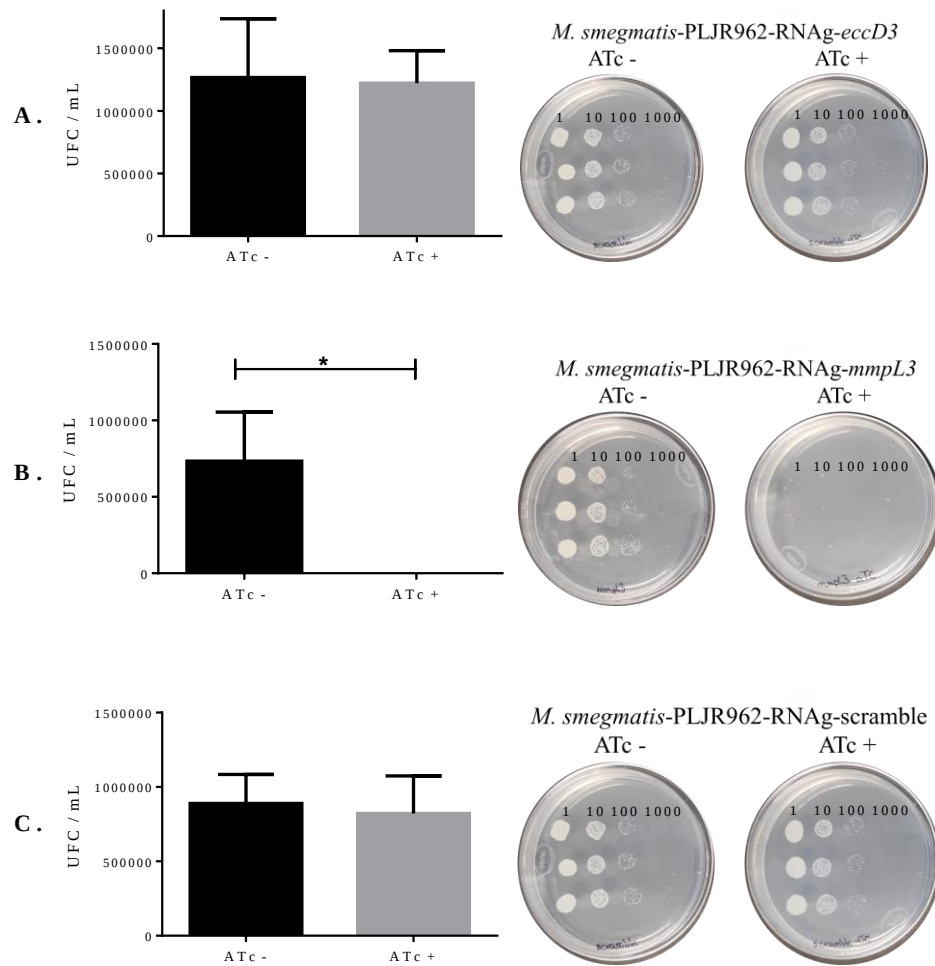


Figura 9. Evaluación fenotípica de la inhibición por CRISPRi. Crecimiento de las cepas **A.** *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*, **B.** *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*mmpL3* y **C.** *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble en presencia o ausencia de anhidrotetraciclina (ATc). Para evaluar el crecimiento se realizó un ensayo de microdilución en placa partiendo de un cultivo en fase exponencial (20 horas) se diluyó para presentar 7,700 células aproximadamente a partir de ese cultivo se realizaron diluciones seriadas 1:10. La marca 1 es el cultivo con 7,700 células aproximadamente, 10 dilución 1:10, 100 dilución 1:100 y 1000 dilución 1:1000. El ensayo se realizó por triplicado biológico y triplicado técnico. Se realizó el conteo de UFC/mL de la dilución 1:1000. Se realizó una prueba *t* de student para comparar el crecimiento de las cepas en presencia o ausencia de ATc, encontrando diferencias significativas en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*mmpL3* con una $p=0.0168$.

7.3.2. Análisis genotípico de la inhibición del gen *eccD3*.

Se obtuvo el RNA total de las cepas *M. smegmatis* pLJR962-RNAg-*eccD3*, *M. smegmatis* pLJR962-RNAg-scramble y *M. smegmatis* wild type en ausencia o en presencia de ATc,

obteniendo la concentración necesaria y calidad para seguir con los análisis posteriores (Tabla 21) (Figura 10).

Tabla 20. Concentraciones de RNA de cada cepa de *M. smegmatis*.

Muestra		Concentración	260/280	260/230
<i>M. smegmatis</i> -PLJR962-	sin ATc	808.9 ng/ μ L	2.01	1.35
RNAg- <i>eccD3</i>	ATc	648.8 ng/ μ L	1.97	1.61
<i>M. smegmatis</i> -PLJR962-	sin ATc	715.2 ng/ μ L	1.91	1.25
RNAg-scramble	ATc	542.5 ng/ μ L	1.99	1.53
<i>M. smegmatis</i> wild type	sin ATc	635.1 ng/ μ L	1.99	1.26

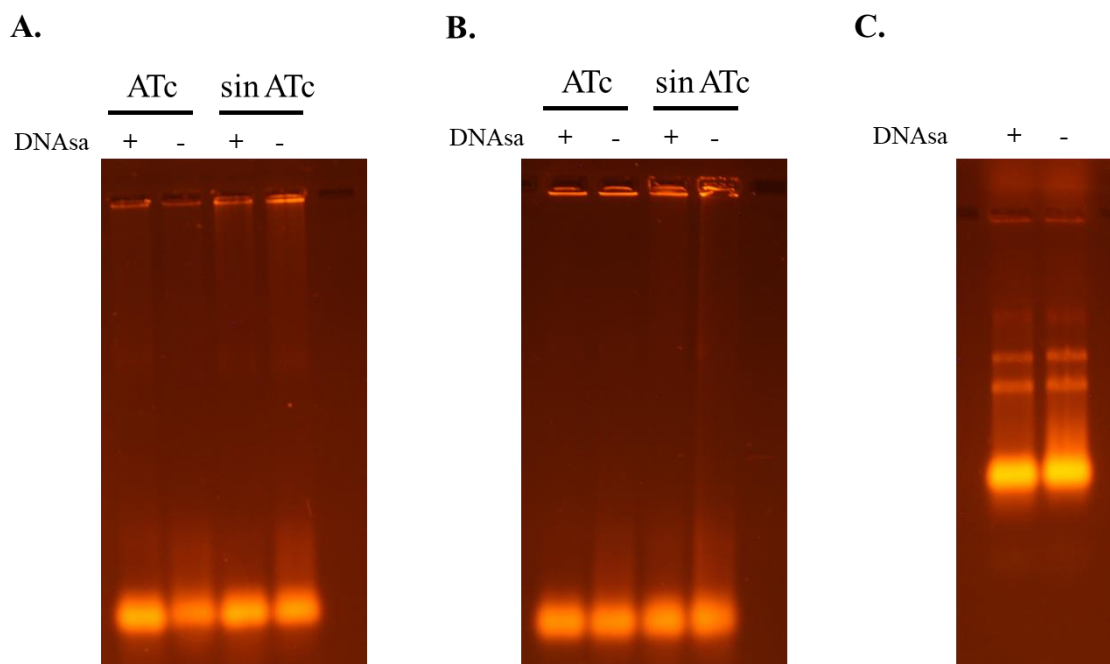


Figura 10. Evaluación de la calidad del RNA con tratamiento de DNAsa. Electroforesis en gel de agarosa al 1% corrimiento de 50 min a 100 Volts. A. *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*, B. *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble y C. *M. smegmatis* wild type. El símbolo positivo (+) significa tratamiento con DNAsa y el símbolo negativo (-) significa sin DNAsa, además en presencia o ausencia de anhidrotetraciclina (ATc).

A partir del RNA obtenido, se realizó la síntesis de cDNA como se menciona en la sección 6.5.2 de material y métodos, posteriormente la funcionalidad del cDNA se verificó mediante la amplificación del gen *sigA* de cada una de las cepas, utilizando una PCR punto final en donde se obtuvo un fragmento de aproximadamente 571 pb (Figura 11).

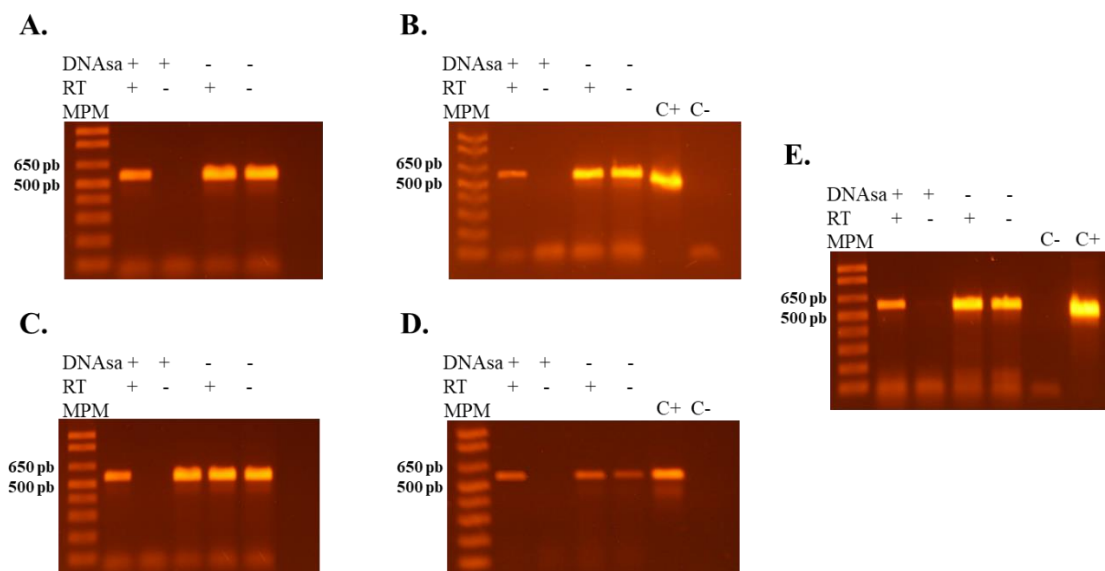


Figura 5. Evaluación de la funcionalidad del cDNA de cada cepa. Electroforesis en gel de agarosa al 1% corrimiento de 50 min a 100 Volts observando un producto amplificado de 571 pb correspondiente al gen *sigA*. A. *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* sin ATc, B. *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* con ATc (100ng/mL), C. *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble sin ATc, D. *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble con ATc (100ng/mL) y E. *M. smegmatis* wild type. El símbolo + significa tratamiento con DNasa I o con retrotranscriptasa (RT) según corresponda y el símbolo – significa la ausencia de estas enzimas. MPM corresponde al marcador de peso molecular, C+ control positivo de la PCR, utilizando como templado el DNA genómico de *M. smegmatis* wild type, y C- control negativo (H₂O).

Para evaluar la inhibición del gen *eccD3* se usó una sonda TaqMan (Tabla 8) realizando un rango dinámico con diferentes concentraciones de cDNA para evaluar la eficiencia de la sonda (Figura 12A) y para identificar la dilución de muestra adecuada que permita visualizar una inhibición del gen *eccD3*. Para esto, se realizó una regresión lineal entre los valores Ct (valor de y, ciclo umbral) y el Log de las diferentes concentraciones de RNA utilizadas (valor de x) observando una R² de 0.9353 y una pendiente de la recta de -3.635 (Figura 12B), lo que nos indica una buena correlación entre el Ct y la concentración de RNA utilizada, así como una eficiencia de amplificación cercana al 100% (Figura 12).

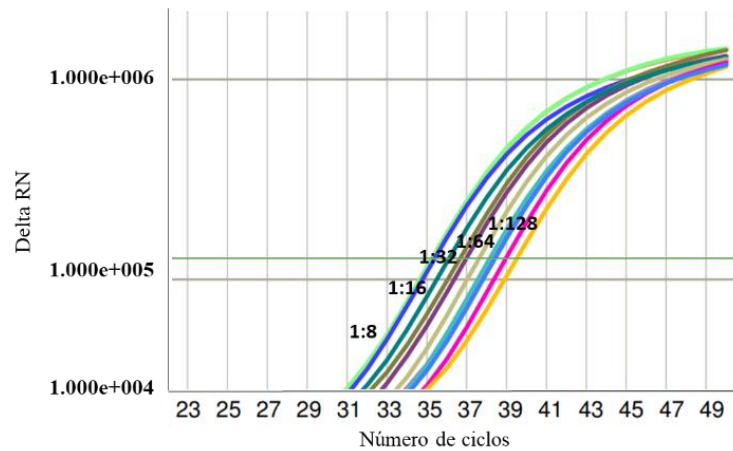
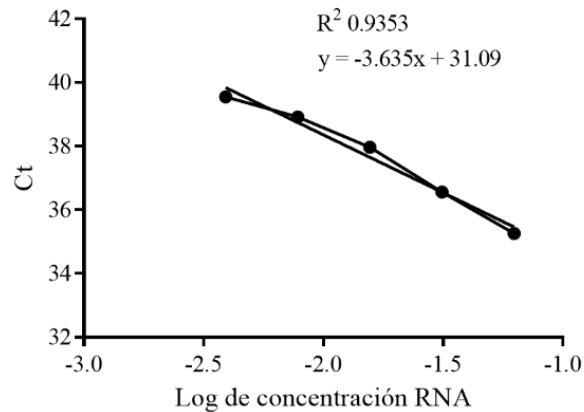
A.**B.**

Figura 12. Rango dinámico y eficiencia de amplificación del gen *eccD3* de *M. smegmatis*. A. Curvas de amplificación de las diluciones seriadas del cDNA (1:8 hasta la 1:128). Delta Rn es el valor obtenido de la intensidad de fluorescencia de la sonda del gen *eccD3* sobre la intensidad del control pasivo (fluoróforo reportero FAM y fluoróforo desactivador MGB-NFQ). B. Curva de regresión lineal del valor de Ct (ciclo umbral) y la dilución del cDNA utilizado (Log de concentración del RNA). Se muestra la pendiente de la recta (valor de y) y el valor predictivo de confianza (R^2), los cuales indican una eficiencia de amplificación cercana al 100 % y una buena correlación entre el Ct y la concentración de RNA, respectivamente.

Posteriormente se realizó la cuantificación relativa del gen *eccD3* utilizando el método comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) y como control endógeno el gen *sigA* en las cepas *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*, *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble y *M. smegmatis* wild type. Se observó la disminución de la expresión del gen *eccD3* significativamente en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* comparando los resultados con esta misma

cepa sin el sistema CRISPRi inducido (sin ATc), además también se observó una disminución respecto a las demás cepas control *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble y *M. smegmatis* wild type (Figura 13). El gen *eccD3* se observó disminuido en su expresión 92.19 veces en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* con el inductor (ATc) del sistema CRISPRi respecto a la misma cepa sin inducir el sistema.

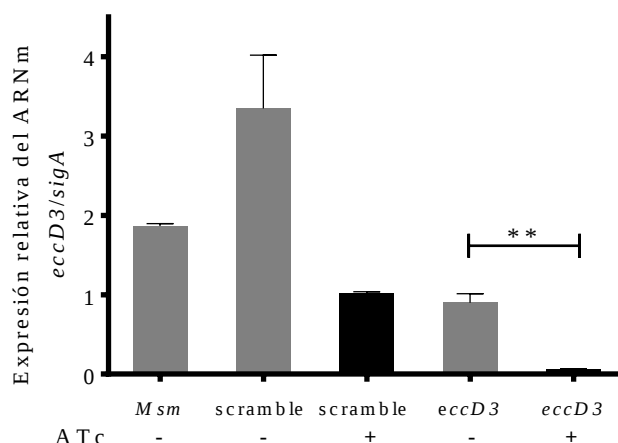


Figura 6. Expresión relativa del gen *eccD3* en diferentes cepas de *M. smegmatis*. Se muestra el promedio de expresión relativa de triplicados técnicos. Las abreviatura *eccD3* corresponde a la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*, scramble a la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble y *Msm* a la cepa *M. smegmatis* wild type. Las cepas que fueron inducidas con anhidrotetraciclina (ATc) a una concentración de 100 ng/mL para encender el sistema CRISPRi se encuentran marcadas con el signo positivo (+) mientras que las que no presentan ATc fueron señaladas con el signo negativo (-). Los resultados fueron obtenidos por PCR cuantitativa, procesados con la fórmula de Schmittgen y Livak (Schmittgen y Livak 2008) y graficados en unidades relativas (UR). Se utilizó como control endógeno el gen *sigA*. Se realizó una prueba *t* de student para comparar la expresión del gen *eccD3* de las cepas en presencia o ausencia de ATc, y entre cada una de las cepas. Las barras con el asterisco muestran las cepas que presentaron diferencias significativas con una $p = 0.0062$.

7.4. Evaluación de la susceptibilidad de cepas de *M. smegmatis* a fármacos antituberculosis.

Primero se evaluó la CMI de los fármacos antituberculosis en la cepa *M. smegmatis* wild type para tener como referencia en el presente estudio. Se observa una CMI de 32 µg/mL para isoniazida y de 6.4 µg/mL para rifampicina (Figura 14), ambos fármacos de primera línea.

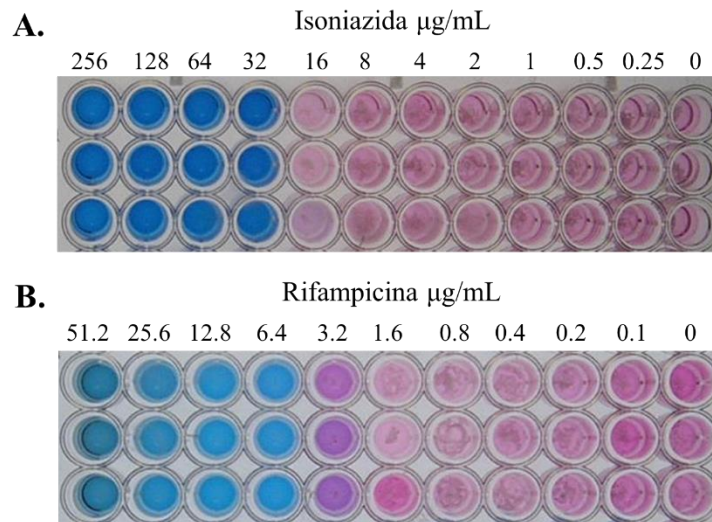


Figura 7. CMI de isoniazida y rifampicina en *M. smegmatis* mc2 155. Método de microdilución en placa con resazurina (REMA) con diluciones seriadas para de cada fármaco para A. isoniazida (256 $\mu\text{g/mL}$ a 0.25 $\mu\text{g/mL}$); y B. rifampicina (51.2 $\mu\text{g/mL}$ a 0.1 $\mu\text{g/mL}$).

La CMI de los fármacos de segunda línea en la cepa *M. smegmatis* wild type se observó en 0.125 $\mu\text{g/mL}$ tanto para levofloxacinó como para moxifloxacinó, de 1 $\mu\text{g/mL}$ para linezolid, de 0.096 $\mu\text{g/mL}$ para bedaquilina y de 4 $\mu\text{g/mL}$ para protionamida (Figura 15).

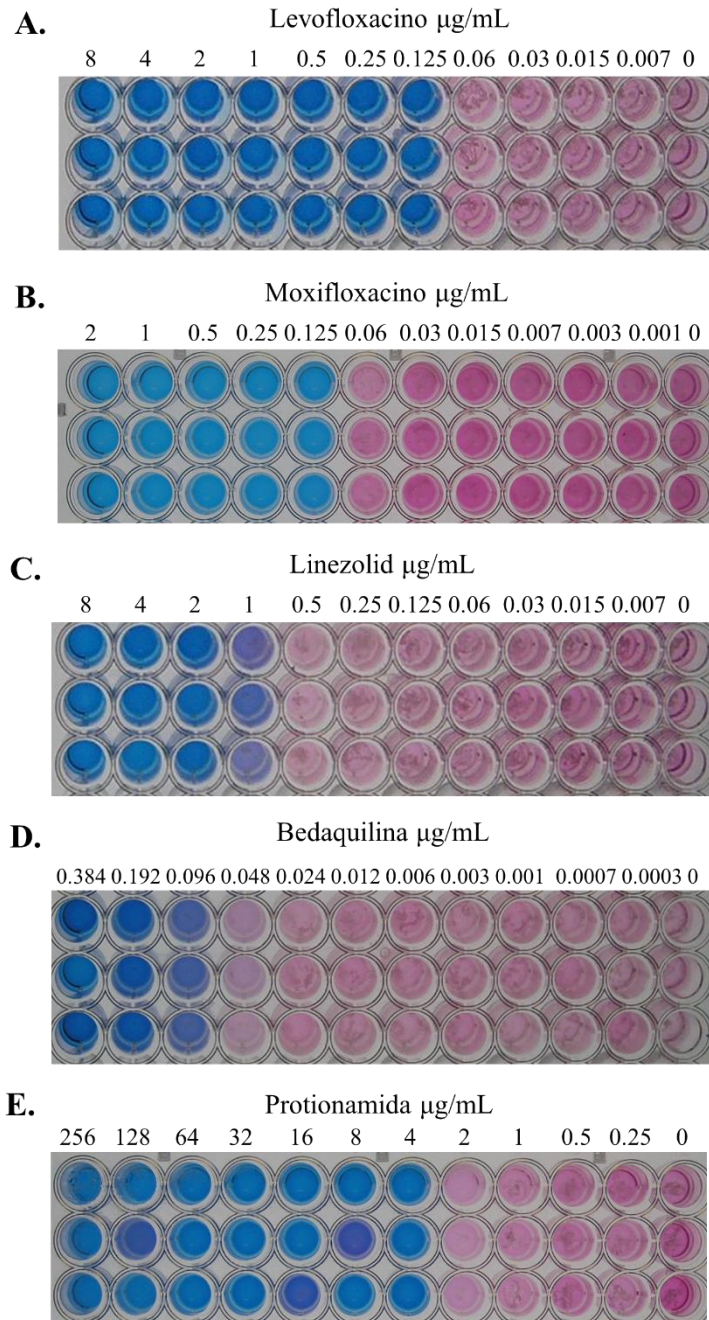


Figura 8. CMI de fármacos de segunda línea en *M. smegmatis* wild type. Método de microdilución en placa con resazurina (REMA) utilizando diluciones seriadas de los fármacos A. levofloxacin (8 $\mu\text{g/mL}$ a 0.007 $\mu\text{g/mL}$); B. moxifloxacin (2 $\mu\text{g/mL}$ a 0.001 $\mu\text{g/mL}$); C. linezolid (8 $\mu\text{g/mL}$ a 0.007 $\mu\text{g/mL}$); D. bedaquiline (0.384 $\mu\text{g/mL}$ a 0.0003 $\mu\text{g/mL}$); y E. protionamida (256 $\mu\text{g/mL}$ a 0.25 $\mu\text{g/mL}$).

Posterior de la obtención de la CMI para cada fármaco en la cepa wild type, se realizó la evaluación de la CMI de los fármacos antituberculosis en las cepas *M. smegmatis*-PLJR962-RNag-*eccD3* y *M. smegmatis*-PLJR962-RNag-scramble.

La CMI de isoniazida en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* se observó en 16 µg/mL tanto en presencia como en ausencia de ATc (Figura C1 A. y B. Anexo C), en la cepa control *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble la CMI fue de 32 µg/mL sin ATc y de 64 µg/mL con ATc (Figura C1 C. y D. Anexo C).

Para el fármaco rifampicina se observó una CMI de 1.6 µg/mL en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de ATc mientras que en ausencia de ATc se observó en 3.2 µg/mL, observando un aumento en la resistencia a este fármaco al inhibir el gen *eccD3* (Figura 16 A y B). En la cepa control *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble la CMI es de 1.6 µg/mL tanto en presencia como en ausencia de ATc, sin embargo, en presencia de ATc uno de los triplicados el corte se observa en 0.8 µg/mL (Figura 16 C y D).

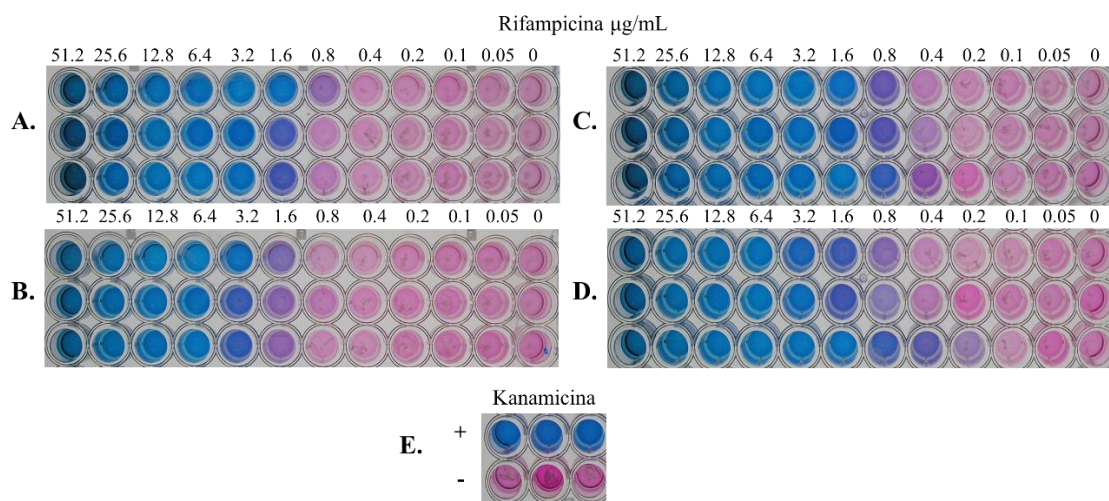


Figura 16. CMI de rifampicina *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*. Método de microdilución en placa con resazurina (REMA) con diluciones seriadas para rifampicina de la concentración 51.2 µg/mL a 0.05 µg/mL. A. y B. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* y C. y D. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble; ambas cepas en ausencia A. y C. y presencia B. y D. de anhidrotetraciclina (ATc) a una concentración de 100 ng/mL. E. Cepa wild type *M. smegmatis* mc² 155 en presencia (signo positivo +) o ausencia (signo negativo -) de kanamicina a una concentración de 20 µg/mL.

La CMI para levofloxacin en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia y en ausencia de ATc se observó de 0.06 µg/mL (Figura C2 A. y B. Anexo C), mientras que en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble se observó en 0.06 µg/mL,

aunque en uno de los triplicados en ausencia de ATc es de 0.125 $\mu\text{g/mL}$ (Figura C2 C. y D. Anexo C).

En el caso de moxifloxacino la CMI se observó en 0.125 $\mu\text{g/mL}$ tanto en presencia como en ausencia de ATc en las dos cepas *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* y *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble (Figura C3, anexo C).

La CMI para linezolid en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de ATc se observó en 1 $\mu\text{g/mL}$ mientras que en ausencia de ATc se observó en 2 $\mu\text{g/mL}$, observando mayor sensibilidad a linezolid al inhibir *eccD3* (Figura 17 A y B). En la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble la CMI se observó en 2 $\mu\text{g/mL}$ para linezolid tanto en ausencia como en presencia de ATc (Figura 17 C y D).

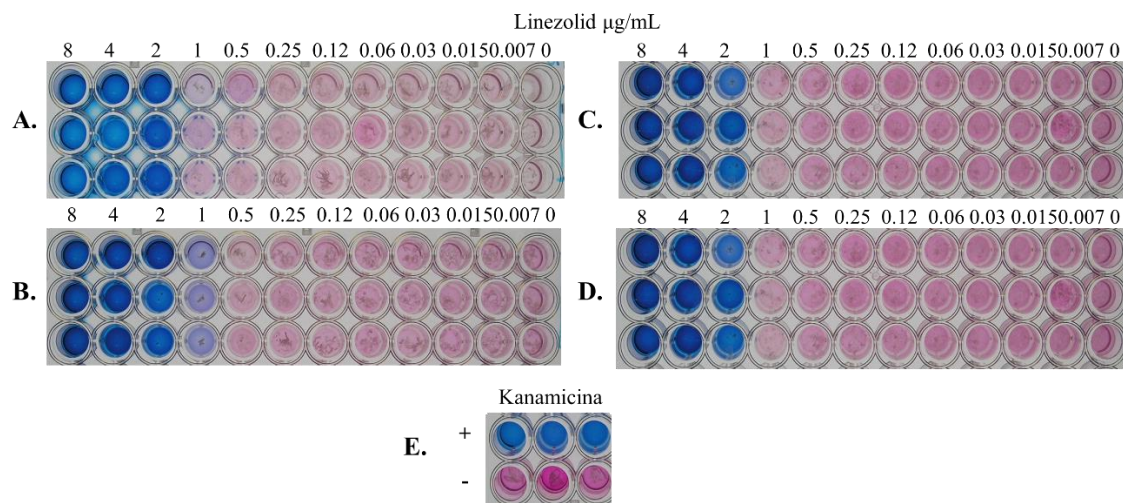


Figura 17. CMI de linezolid *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*. Método de microdilución en placa con resazurina (REMA) con diluciones seriadas para rifampicina de la concentración 8 $\mu\text{g/mL}$ a 0.007 $\mu\text{g/mL}$. A. y B. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* y C. y D. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble; ambas cepas en ausencia A. y C. y presencia B. y D. de anhidrotetraciclina (ATc) a una concentración de 100 ng/mL. E. Cepa wild type *M. smegmatis* mc² 155 en presencia (signo positivo +) o ausencia (signo negativo -) de kanamicina a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$.

Para el fármaco protionamida la CMI en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia o ausencia de ATc se observó en 2 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en la cepa *M.*

smegmatis-PLJR962-RNAg-scramble la CMI en ausencia y presencia de ATc se observó en 8 µg/mL (Figura C4).

En el caso de la bedaquilina la CMI en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia y ausencia de ATc se observó en 0.192 µg/mL (Figura 18 A y B). En la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble la CMI de bedaquilina en ausencia y presencia de ATc se observó en 0.192 µg/mL (Figura 18 C y D).

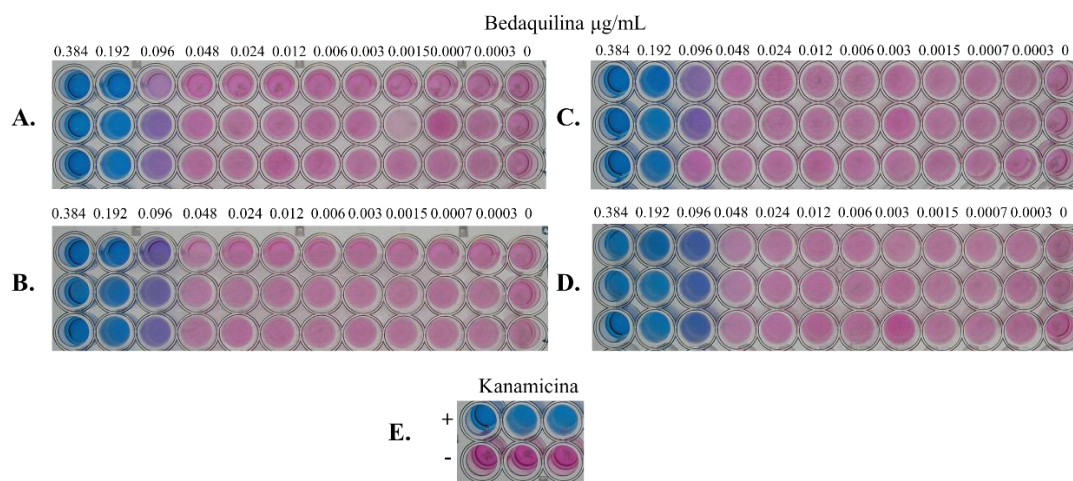


Figura 18. CMI de bedaquilina *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*. Método de microdilución en placa con resazurina (REMA) con diluciones seriadas para rifampicina de la concentración 0.384 µg/mL a 0.00037 µg/mL. A. y B. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* y C. y D. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble; ambas cepas en ausencia A. y C. y presencia B. y D. de anhidrotetraciclina (ATc) a una concentración de 100 ng/mL. E. Cepa wild type *M. smegmatis* mc² 155 en presencia (signo positivo +) o ausencia (signo negativo -) de kanamicina a una concentración de 20 µg/mL.

Con la finalidad de confirmar los cambios en el crecimiento bacteriano en presencia de los fármacos antituberculosis observados en el ensayo de REMA, se realizaron curvas de crecimiento bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de los fármacos seleccionados (rifampicina, linezolid y bedaquilina). Para evaluar que el cambio en el crecimiento bacteriano observado en los resultados posteriores corresponde a una diferencia en la sensibilidad o resistencia al fármaco adquirida por la inhibición del gen *eccD3* y no a la presencia de ATc y/o kanamicina, se crecieron las cepas *M. smegmatis* wild type, *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* y *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-

scramble en condiciones de crecimiento estándar a 37°C con agitación constante en medio 7H9 suplementado con ADC (10%) y Tween 80 (0.05%) agregando kanamicina (20 µg/mL) y/o ATc (100 ng/mL) por 27 horas, las cuales fueron utilizadas para los cultivos en presencia de los fármacos previamente mencionados. No se observaron diferencias en el crecimiento de las cepas *M. smegmatis* wild type, *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* y *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble en presencia o en ausencia de kanamicina, tampoco en ausencia o presencia del inductor ATc (Figura 19).

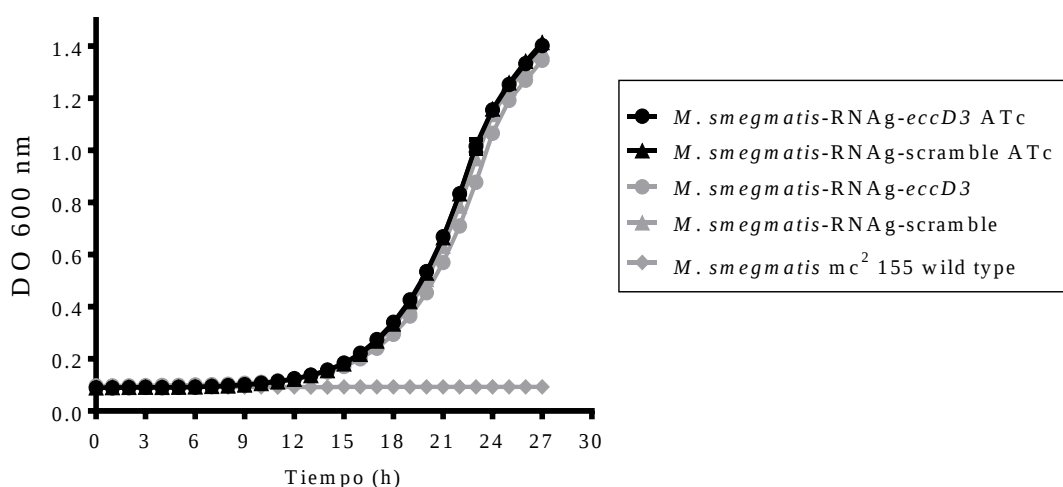


Figura 19. Curva de crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* utilizadas en este estudio. Curva de crecimiento de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* (marcada con círculos), de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble (marcada con triángulos) y de la cepa *M. smegmatis* mc²155 wild type (marcada con rombos) en ausencia (línea color gris) o presencia (línea color negro) de ATc a una concentración de 100 ng/mL y en presencia de kanamicina a una concentración de 20 µg/mL y B. 1 µg/mL y 20µg/mL de kanamicina.

En la curva de crecimiento de rifampicina en la concentración de 3.2 µg/mL del fármaco, no se observa crecimiento de ninguna de las cepas *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* y *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble (Anexo D, Figura D1A). En la concentración de 1.6 µg/mL de rifampicina se observa una tendencia de mayor crecimiento de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* al inhibir el gen *eccD3* en comparación de cuando no se presenta inhibición del gen (Anexo D, Figura D1B). Mientras que en la concentración de 0.8 µg/mL se observa un mayor crecimiento significativo de la cepa *M.*

smegmatis-PLJR962-RNAg-*eccD3* al inhibir el gen *eccD3* en comparación de cuando no se inhibe el gen en esta misma cepa (Figura 20).

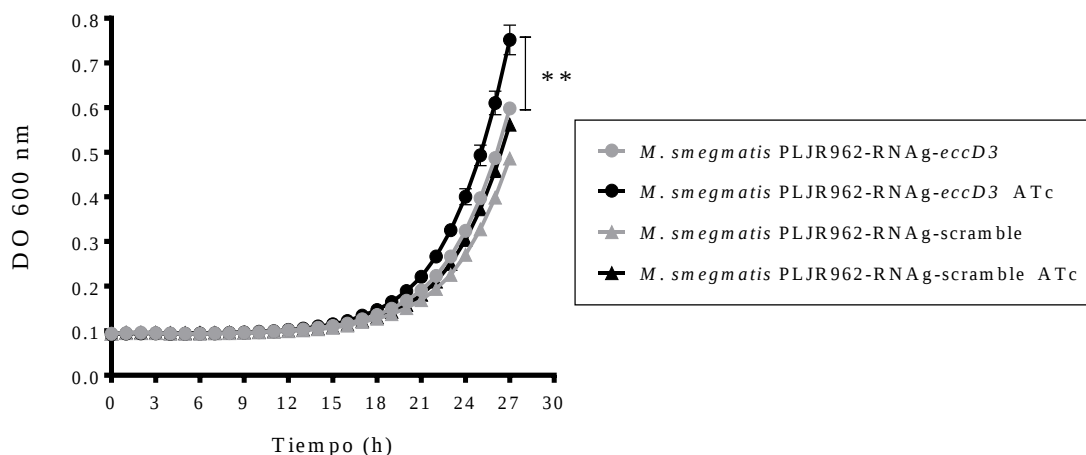


Figura 20. Curva de crecimiento de *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de rifampicina. Curva de crecimiento de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* (marcada con círculos) y de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble (marcada con triángulos) en ausencia (línea color gris) o presencia (línea color negro) de ATc una concentración de 100 ng/mL, una concentración final de 0.8 μ g/mL de rifampicina y 20 μ g/mL de kanamicina. Se realizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas para comparar el crecimiento en diferentes concentraciones de fármaco entre las cepas y entre la misma cepa en presencia o ausencia de ATc. Las barras con el asterisco muestran las cepas que presentaron diferencias significativas respecto a su crecimiento con un valor significativo de $p = 0.003$.

En la curva de crecimiento en presencia de linezolid en las concentraciones de 2 μ g/mL y de 1 μ g/mL, en ninguna de las dos cepas *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* y *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble se observó crecimiento (Anexo E, Figura E1A y E1B). En la concentración de linezolid de 0.5 μ g/mL se observa que la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de ATc es más sensible significativamente a este fármaco en comparación del crecimiento de la cepa en ausencia de ATc (Figura 21).

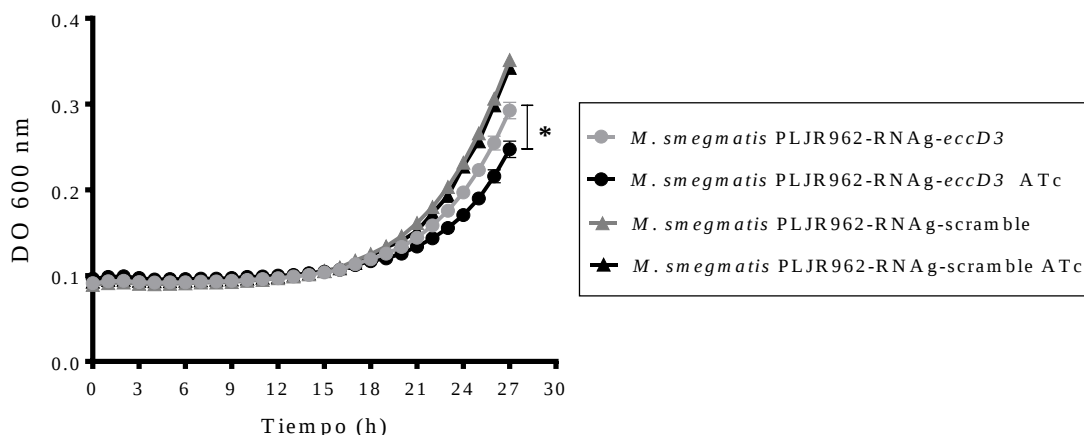


Figura 21. Curva de crecimiento de *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-eccD3 en presencia de linezolid. Curva de crecimiento de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-eccD3 (marcada con círculos) y de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble (marcada con triángulos) en ausencia (línea color gris) o presencia (línea color negro) de ATc una concentración de 100 ng/mL, una concentración final de 0.5 µg/mL de linezolid y 20µg/mL de kanamicina. Se realizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas para comparar el crecimiento en diferentes concentraciones de fármaco entre las cepas y entre la misma cepa en presencia o ausencia de ATc. Las barras con el asterisco muestran las cepas que presentaron diferencias significativas respecto a su crecimiento con un valor significativo de $p = 0.05$.

En el caso de la curva de crecimiento en presencia de bedaquilina no se observó diferencias en el crecimiento de las cepas *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-eccD3 y *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble en ausencia o presencia de ATc (Figura F1, anexo F).

7.5. Evaluación del potencial farmacológico de la proteína EccD3 y los componentes del sistema de secreción ESX3.

La proteína EccD3 forma parte de la estructura del sistema de secreción ESX3 el cual es esencial para la viabilidad de *M. tuberculosis*, además de que el sistema secreta proteínas que son factores de virulencia para la bacteria, por lo tanto, si se inhibe la secreción o de estas proteínas o se inhibe el sistema de secreción, la bacteria pierde viabilidad celular además de que disminuye su virulencia. Por lo tanto, no solo la proteína EccD3 tiene potencial farmacológico, si no también toda la estructura de secreción del sistema ESX3 de *M. tuberculosis*.

7.5.1. Obtención de la estructura 3D de las proteínas del sistema ESX3.

Para obtener la estructura 3D de las proteínas del sistema de ESX3 de *M. tuberculosis* primero se realizó una búsqueda en la literatura y se encontraron dos modelos del sistema ESX3 de *M. smegmatis* generados mediante microscopía electrónica el modelo PDB 6SGW (Famelis et al. 2019) y el otro PDB 6UMM (Poweleit et al. 2019). A partir de los dos modelos del sistema ESX3 de *M. smegmatis* se generaron mediante modelado por homología dos modelos del sistema ESX3 de *M. tuberculosis*, comparando los valores de calidad de los dos modelos para seleccionar los que presentaran mejor calidad (Tabla G1.1, G1.2, G2.1 y G2.2, anexo G). Los modelos de las proteínas del sistema de secreción ESX3 de *M. tuberculosis* con mejor calidad fueron aquellos obtenidos a partir del PDB 6UMM (Tablas Anexo G) (Poweleit et al. 2019).

Posterior de seleccionar los mejores modelos predictivos de las proteínas se generó el dímero de protómeros del sistema de secreción ESX3 de *M. tuberculosis*, realizando un superposicionamiento entre el modelo obtenido de *M. tuberculosis* contra el modelo blanco de *M. smegmatis* encontrando un RMSD menor a 1 Å en aquellas regiones que se encuentran conservadas en las proteínas, mientras que al evaluar el RMSD de toda la proteína completa se observó en todos los casos un valor menor a 2 Å (Tabla 22).

Tabla 21. Comparación de las estructuras del sistema de secreción ESX3 de *M. tuberculosis* contra *M. smegmatis*.

Comparación de estructura entre <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. smegmatis</i> .		
Protómero 1 del sistema de secreción ESX3		
Proteína	RMSD en regiones con mayor similitud (aa)	RMSD de toda la proteína (aa)
EccD3-conformación corta	0.179 Å (441 aa)	0.583 Å (448 aa)
EccD3-conformación extendida	0.716 Å (421 aa)	0.891 Å (434 aa)
EccE3	0.325 Å (257 aa)	1.4812 Å (281 aa)
EccB3	0.768 Å (65 aa)	1.478 Å (77 aa)
EccC3	0.821 Å (300 aa)	1.769 Å (341 aa)
Protómero 2 del sistema de secreción ESX3		
EccD3-conformación corta	0.178 Å (441 aa)	0.586 Å (448 aa)
EccD3-conformación extendida	0.616 Å (421 aa)	0.890 Å (434 aa)
EccE3	0.320 Å (257 aa)	1.481 Å (281 aa)
EccB3	0.751 Å (65 aa)	1.458 Å (77 aa)

Posteriormente se realizó la preparación de cada una de las estructuras agregando cargas, hidrógenos faltantes y minimizando la energía de cada una de las estructuras. Para realizar la minimización de energía se realizó una curva para determinar los parámetros para generar la estructura más estable, por lo tanto, se utilizó la proteína EccB3-dominio periplásmico para realizar la curva de los parámetros de minimización y se observa que la estructura más estable se obtendrá a 1000 conjugated gradient steps y 10,000 steepest descent steps Tabla 22 y Figura 22.

Tabla 22. Valores de la minimización de energía de la estructura 3D de la proteína EccB3-dominio periplásmico.

Steepest descent steps	Potential energy kJ/mol		
	Conjugate gradient steps		
	10	100	1000
100	-6270.1800	-6973.1520	-7868.2530
500	-6570.4640	-6979.4110	-7875.5420
1000	-6742.5870	-7045.5350	-7875.7750
5000	-7162.4830	-7317.3030	-7915.1210
6000	-7202.8310	-7377.6080	-7968.1210
7000	-7262.7120	-7381.6430	-7975.9590
8000	-7322.9440	-7471.5740	-7975.4540
9000	-7351.5660	-7511.0680	-7979.3810
10000	-7498.4250	-7603.3360	-8005.1510

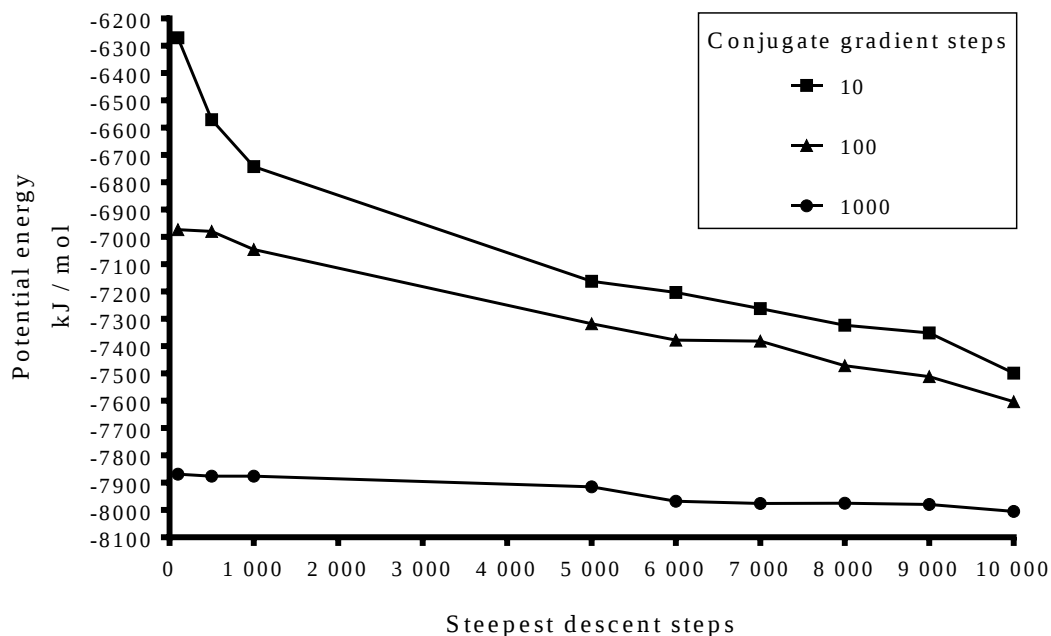


Figura 22. Gráfica de los valores de la minimización de energía de la estructura EccB3-dominio periplásmico.

Posteriormente de obtener las estructuras proteicas mas estables de cada uno de los componentes de los dos protómeros del sistema de secreción ESX3, se generó la estructura del dimero de protómeros de este sistema de *M. tuberculosis* (Figura 23).

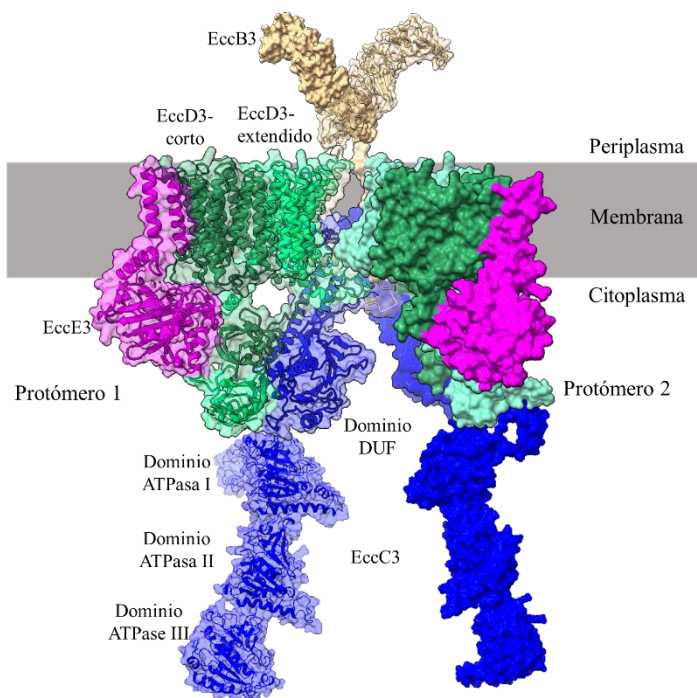


Figura 23. Modelo de proteínas del sistema de secreción ESX3 de *M. tuberculosis*. Estructura cuaternaria del sistema de secreción ESX3, utilizando modelos homólogos de todos sus componentes para generar los dos protómeros que conforman el sistema de secreción.

7.5.2. Selección del sitio de unión de fármacos del sistema de secreción ESX3.

Para la selección del sitio de unión de fármacos en el dominio ATPasa III de la proteína EccC3 se seleccionó el sitio catalítico, en donde se une el ATP el cual ha sido reportado en la literatura y su estructura se obtuvo del PDB 6J17 (Wang et al. 2020) (Figura 24 y Tabla 21). Con la finalidad de inhibir la actividad de secreción del sistema.

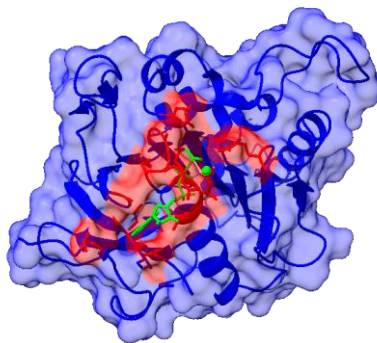


Figura 24. Sitio de unión a fármacos del dominio ATPasa III de la proteína EccD3. Seleccionando los aminoácidos del sitio de unión en color rojo y en color verde la molécula de ATP. Estructura 3D del dominio ATPasa PDB 6J17 (Wang et al. 2020).

Se realizó un análisis de la estructura 3D del sistema de secreción ESX3 propuesta en la literatura (Famelis et al. 2019; Poweleit et al. 2019), con la finalidad de ubicar las regiones de interacción proteína-proteína (PPI) que formen las interfaces de unión, las cuales podrían ser blancos terapéuticos al inhibir la formación cuaternaria del sistema. Para identificar las regiones de interfaces del sistema de secreción ESX3 en donde ocurre la interacción proteína-proteína se utilizó el servidor web PDBePISA y se encontraron tres sitios de interacción proteína-proteína que podrían causar la desestabilización del sistema mostrados en las Figuras 25, 26 y 27.

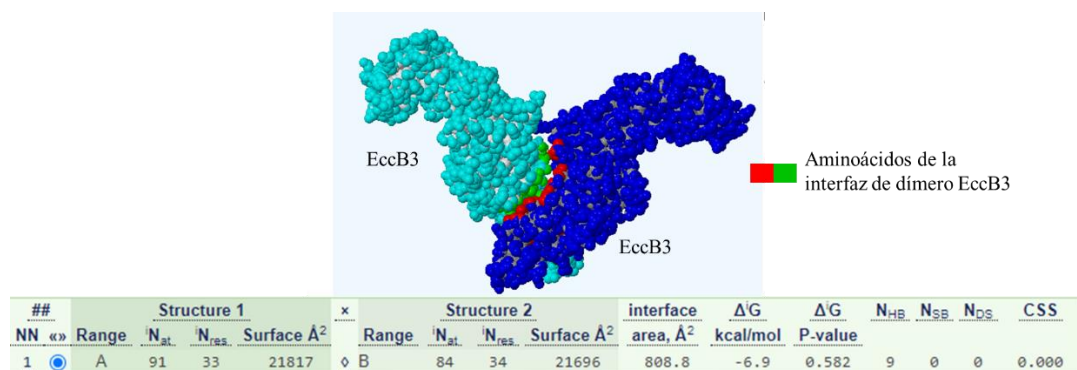


Figura 25. Resultados de PDBePISA del dímero del dominio periplásmico de EccB3 de *M. tuberculosis*. Aminoácidos en la interfaz del dímero de la proteína EccB3 están marcados con color rojo (monómero de EccB3 de la derecha) y verde (monómero de EccB3 de la izquierda).

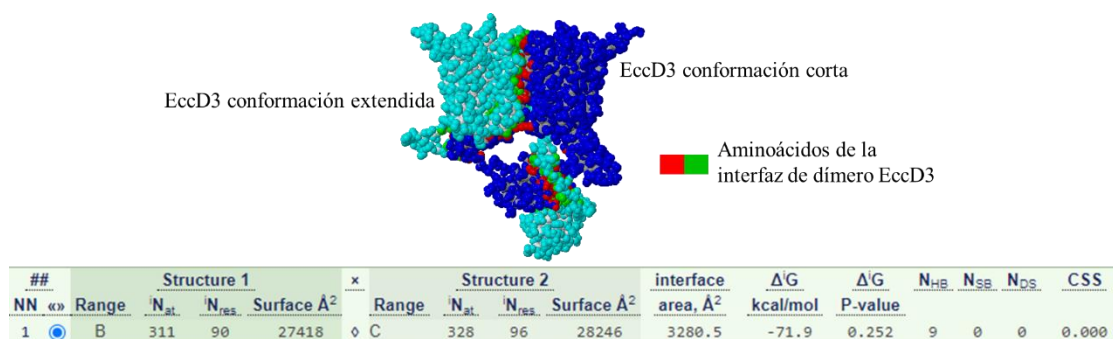


Figura 26. Resultados de PDBePISA del dímero de los monómeros de EccD3 de *M. tuberculosis*. Aminoácidos de la interfaz del dímero de la proteína EccD3 están marcados con color rojo (monómero de EccD3 conformación corta) y verde (monómero de EccD3 conformación extendida).

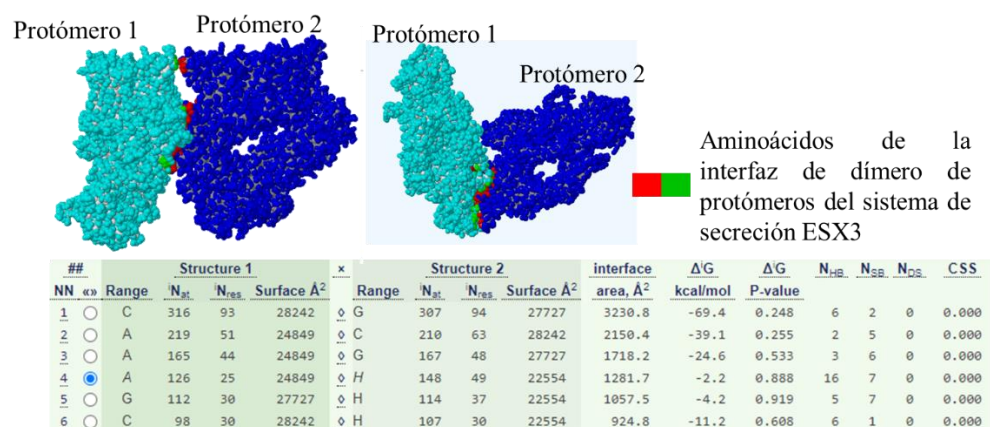


Figura 27. Resultados de PDBePISA del dímero de los protómeros del sistema de secreción ESX3 de *M. tuberculosis*. Aminoácidos de la interfaz del dímero de protómeros del sistema de secreción ESX3 están marcados con color verde (protómero 1) y rojo (protómero 2).

Después de la obtención de los resultados se seleccionaron cinco sitios de unión basándose en los aminoácidos de las interfaces, denominándose EccB3, EccD3-N-terminal, EccD3-C-terminal, Protómero1 y Protómero 2 (Figura 28). Los aminoácidos que corresponden a cada uno de los sitios de unión a fármacos seleccionados se muestran en la Tabla 23.

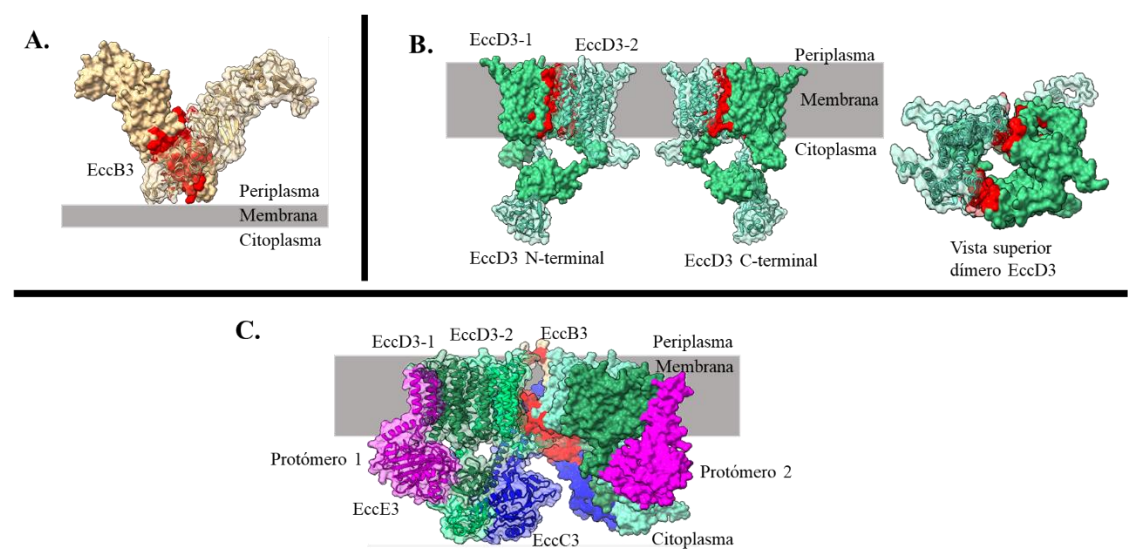


Figura 28. Sitios de unión de fármacos seleccionados en las interfaces del sistema de secreción ESX3 de *M. tuberculosis*. A. Dímero de EccB3. B. Dímero de EccD3 lado N- terminal y C-terminal. EccD3-1, estructura corta de la proteína EccD3, EccD3-2, estructura extendida de la proteína EccD3. C. Protómero 1 y 2 del sistema ESX3. Los aminoácidos del sitio de unión seleccionado se encuentran de color rojo.

Tabla 23.Tabla de los aminoácidos de los sitios de unión seleccionados en el sistema ESX3.

Componente del Sistema ESX3	Aminoácidos del sitio de unión seleccionados
EccB3	ARG 110, SER 111, THR 112, ALA 113, ALA 114, LEU 115, LEU 127, ASN 128, LEU 129, ALA 132, ARG 133, SER 141, PRO 142, THR 144, LEU 158, PRO 162, GLY 163, GLU 166, ARG 167, THR 417, VAL 418, GLU 419, LEU 420, GLY 424, ASN 425, ALA 435, ALA 436, ASP 462, THR 463, VAL 504, PRO 505, GLY 506, PRO 507, LEU 516.
EccD3 N-terminal	ILE 123, HIS 125, ILE 126, GLN 127, GLY 129, ALA 130, ALA 133, VAL 134, ALA 136, VAL 137, LEU 140, ALA 141, LEU 144, THR 145, THR 147, TYR 148, ALA 151, THR 152, ALA 160, ILE 164, ARG 178.
EccD3 C-terminal	ASP 375, ALA 377, LYS 380, ALA 381, LEU 384, TYR 388, GLY 392, LEU 395, VAL 396, THR 399, TYR 404, VAL 405, ALA 407, PHE 408, VAL 411, LEU 414,

	ALA 415, MET 418, TRP 421, VAL 422, VAL 424, ALA 425, LEU 426, PRO 428, ALA 431.
ESX3 protómero 1	EccB3- PHE 1, ALA 2, SER 3, ARG 4, THR 5, PRO 6, VAL 7, ASN 8, ASN 9, ASN 10, PRO 11, ASP 12, LYS 13, VAL 14, TYR 16, ARG 17, ARG 18, GLY 19, PHE 20, VAL 21, THR 22, ARG 23, GLN 25, VAL 26, TRP 29, ARG 30, LEU 78, ILE 79. EccC3- LEU 111, ARG 113, VAL 114, ILE 115, PRO 116, PRO 117, SER 118, LEU 119, ARG 122, LEU 124, ARG 167, ASN 169, MET 173, ARG 174, GLU 260, ASP 262. EccD3-monómero extendido- LEU 1233, LEU 1239, PRO 1240, ILE 1242, ALA 1244, PRO 1245, GLY 1246, ASP 1247.
ESX3 protómero 2	EccB3- LEU 22, HIS 23, ASP 24, THR 25, ARG 26, LEU 28, VAL 29, PRO 31, ARG 37, PHE 56, ILE 59, ARG 60. EccC3- ILE 84, GLU 86, ALA 87, PRO 88, PRO 89, GLU 90, ARG 93, ARG 101, ARG 102, MET 153, ARG 154, GLU 156, GLU 157, ALA 160, GLU 161, ASP 164, TYR 165, ARG 167, TYR 168, SER 170, VAL 171, VAL 172, ASP 174, ASN 175, ILE 176, ARG 177, ALA 178, ALA 181. EccD3-monómero corto- ASP 566, MET 569, ILE 570, THR 573, PRO 578, 579 TRP, GLY 580. EccD3-monómero extendido- ARG 1297, VAL 1298, TRP 1299, ASP 1300, LYS 1305, ALA 1356, SER 1357, PRO 1358, GLU 1359, SER 1360, TYR 1361, SER 1362, LEU 1363, PRO 1364, ARG 1366, ARG 1367, LEU 1368, LEU 1371.
Dominio III ATPasa de la proteína EccC3	THR 1064, ALA 1109, ARG 1110, SER 1111, LYS 1113, THR 1114, THR 1115, ARG 1141, ARG 1245, ALA 1292, LEU 1309, ASN 1311.

7.5.3. Acoplamiento molecular entre las proteínas y los fármacos.

El acoplamiento molecular (docking molecular) de los fármacos con los seis sitios de unión seleccionados en las proteínas del sistema de secreción ESX3 se realizó utilizando el software AutoDock Vina. Como blancos farmacológicos se seleccionaron el dominio III de ATPasa de la proteína EccC3, la interfaz del dominio periplásmico de EccB3, la interfaz de EccD3 el lado N y C terminal de la proteína y la interfaz entre los dos protómeros del sistema (Figura 24 y 28). Se realizaron 10 simulaciones de cada acoplamiento molecular de cada par de proteína-fármaco, observando que la desviación estándar dentro de las 10 simulaciones no presenta diferencias (Figura H1-6, Anexo H).

Posteriormente se seleccionó la menor energía de unión de cada una de las 10 simulaciones de cada par proteína-ligando, mostrando los resultados en la Tabla 24. A partir de estos valores de la menor energía de unión seleccionada, se tomaron los valores y se normalizaron utilizando el valor Z de cada una de las menores energías de unión de cada par de proteína-ligando.

Tabla 24. Menor energía de unión de cada acoplamiento molecular de cada uno del par proteína-ligando evaluados y valores Z-scores.

Fármacos	Energía de unión ΔG kcal/mol / Z-score											
	EccB3		EccD3 N-ter		EccD3 C-ter		ESX3 P1		ESX3 P2		EccC3 ATPase dominio III	
	kcal/mol	Z-score	kcal/mol	Z-score	kcal/mol	Z-score	kcal/mol	Z-score	kcal/mol	Z-score	kcal/mol	Z-score
Isoniazida	-4.90	1.19	-4.00	1.06	-4.80	1.08	-6.1	0.76	-5.7	1.06	-5.0	1.22
Pirazinamida	-4.60	1.41	-3.70	1.30	-4.20	1.46	-5.2	1.43	-4.9	1.63	-5.1	1.12
Etambutol	-4.10	1.78	-3.40	1.54	-4.10	1.52	-5.0	1.58	-5.0	1.56	-4.1	2.06
Rifampicina	-7.10	-0.42	-6.70	-1.11	-6.90	-0.26	-7.8	-0.49	-7.7	-0.34	-6.4	-0.09
Rifapentina	-7.90	-1.00	-7.50	-1.75	-7.80	-0.83	-8.3	-0.86	-8.2	-0.70	-7.0	-0.65
Rifalazil	-8.10	-1.15	-6.20	-0.71	-8.10	-1.02	-8.4	-0.94	-8.6	-0.98	-6.6	-0.28
Rifabutina	-7.60	-0.78	-6.00	-0.55	-6.80	-0.19	-8.3	-0.86	-7.9	-0.48	-6.0	0.28
Amikacina	-6.20	0.24	-4.30	0.82	-5.80	0.44	-6.9	0.17	-6.9	0.22	-6.9	-0.56
Estreptomycin	-6.70	-0.12	-4.60	0.57	-6.90	-0.26	-7.9	-0.57	-7.8	-0.41	-6.8	-0.46
Kanamicina	-6.00	0.39	-5.10	0.17	-6.00	0.31	-7.8	-0.49	-7.1	0.08	-6.6	-0.28
Levofloxacin	-7.80	-0.93	-5.70	-0.31	-7.00	-0.32	-7.9	-0.57	-8.2	-0.70	-7.4	-1.03
Esparfloxacin	-7.90	-1.00	-5.40	-0.07	-7.70	-0.77	-7.5	-0.27	-8.0	-0.56	-6.2	0.10
Pazufloxacin	-7.50	-0.71	-5.50	-0.15	-6.70	-0.13	-7.6	-0.35	-8.0	-0.56	-6.8	-0.46
Etionamida	-4.70	1.34	-3.80	1.22	-4.70	1.14	-5.6	1.13	-5.2	1.42	-4.8	1.41
Pretomanida	-6.80	-0.20	-6.00	-0.55	-7.10	-0.39	-7.2	-0.05	-7.8	-0.41	-7.3	-0.93
Bedaquilina	-7.30	-0.56	-6.00	-0.55	-7.90	-0.89	-7.7	-0.42	-7.0	0.15	-6.4	-0.09
Linezolid	-6.90	-0.27	-5.60	-0.23	-7.10	-0.39	-7.2	-0.05	-7.5	-0.20	-6.6	-0.28
Ácido amino salicílico	-5.20	0.97	-4.40	0.74	-4.90	1.01	-6.1	0.76	-5.7	1.06	-5.6	0.66
Cicloserina	-4.00	1.85	-3.20	1.70	-3.30	2.03	-4.4	2.02	-4.5	1.91	-4.2	1.97
Tioacetazona	-5.80	0.53	-4.50	0.65	-5.90	0.38	-5.9	0.91	-5.9	0.92	-5.2	1.03
Ácido tiosulfúrico	-3.40	2.29	-2.70	2.10	-2.70	2.41	-3.4	2.76	-3.6	2.54	-3.9	2.25
Viomicina	-7.60	-0.78	-5.50	-0.15	-7.50	-0.64	-8.8	-1.23	-7.9	-0.48	-6.6	-0.28
Enviomicina	-7.20	-0.49	-5.20	0.09	-6.00	0.31	-7.6	-0.35	-8.8	-1.12	-7.8	-1.40
Florfenicol	-6.00	0.39	-4.80	0.41	-6.10	0.25	-6.0	0.84	-7.2	0.01	-6.6	-0.28
Vanoxerina	-6.90	-0.27	-6.20	-0.71	-7.80	-0.83	-8.0	-0.64	-8.7	-1.05	-6.7	-0.37
Metformina	-4.80	1.27	-3.70	1.30	-4.10	1.52	-5.8	0.99	-5.3	1.35	-5.6	0.66
Vitamina D	-6.60	-0.05	-6.40	-0.87	-8.10	-1.02	-7.4	-0.20	-8.7	-1.05	-6.3	0.00
Simvastatina	-6.70	-0.12	-5.40	-0.07	-7.70	-0.77	-7.3	-0.12	-8.1	-0.63	-6.9	-0.56
Tamoxifen	-6.50	0.02	-5.50	-0.15	-6.60	-0.07	-7.0	0.10	-7.5	-0.20	-6.1	0.19
Fluvastatina	-7.00	-0.34	-5.70	-0.31	-7.10	-0.39	-7.4	-0.20	-8.0	-0.56	-7.1	-0.75
Avermectina	-7.30	-0.56	-6.40	-0.87	-8.50	-1.28	-8.8	-1.23	-8.3	-0.77	-7.0	-0.65
Ivermectina	-9.00	-1.81	-6.80	-1.19	-8.10	-1.02	-8.7	-1.16	-8.6	-0.98	-7.0	-0.65
Moxidectina	-7.80	-0.93	-7.50	-1.75	-8.40	-1.21	-8.7	-1.16	-8.4	-0.84	-8.8	-2.33
Selamectina	-8.10	-1.15	-7.40	-1.67	-8.40	-1.21	-8.8	-1.23	-8.5	-0.91	-6.9	-0.56
ATP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-9.0	ND

ND, no determinado; EccD3 N-ter, EccD3 N-terminal; EccD3 C-ter, EccD3 C-terminal; ESX3 P1 and ESX3 P2 corresponden al protómero ESX3 1 y 2, respectivamente.

Se generaron dos mapas de calor con los datos normalizados del valor Z, una estrategia analiza los datos de cada columna evaluando que ligando presenta mejor interacción con cada uno de los 6 sitios de unión a fármacos seleccionados (Figura 29). Mientras que la otra estrategia analiza los datos de cada fila evaluando cuál de los 6 sitios de unión a fármacos presenta mejor interacción con el grupo de fármacos seleccionados, observando que los sitios que corresponden a los protómeros 1 y 2 son los que presentan una mejor afinidad con el grupo de los fármacos (Figura 30). Después la selección de los fármacos con la mejor afinidad en cada sitio lo siguiente fue la inspección visual y seleccionar a los fármacos que interactúan con los aminoácidos de la interfaz.

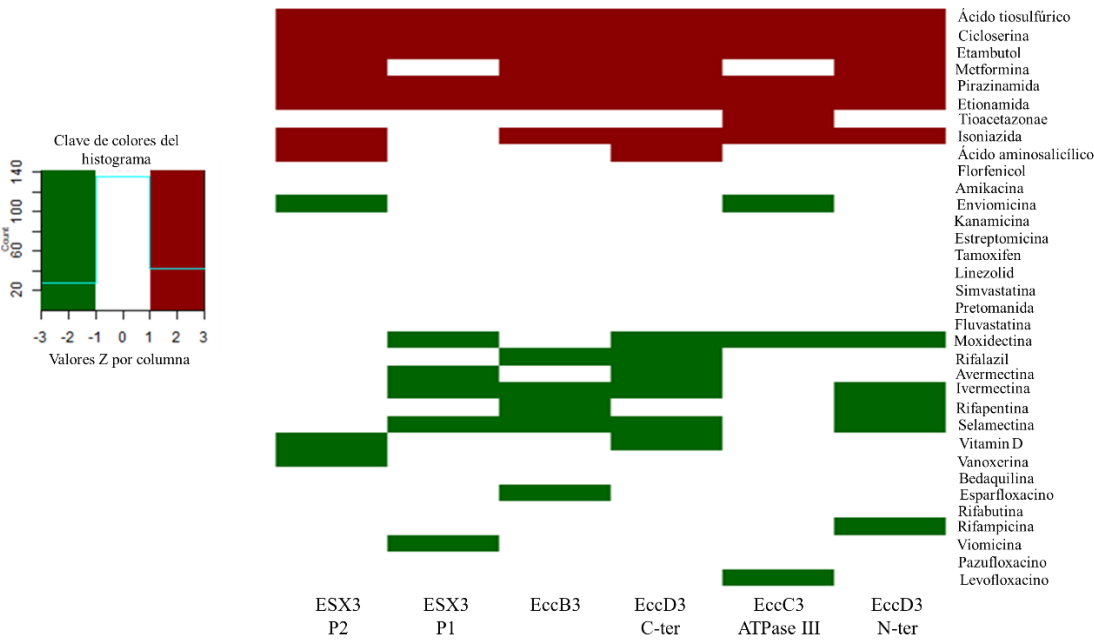


Figura 29. Mapa de calor del análisis por columnas de los valores Z basados en el valor ΔG de la interacción del par proteína-fármaco. Análisis por columnas (análisis estadístico de cada uno de los sitios de unión). Valores Z menores a -1 color verde, valores entre -1 y 1 color blanco y valores mayores a 1 color rojo.



Figura 30. Mapa de calor del análisis por filas de los valores Z basados en el valor ΔG de la interacción del par proteína-fármaco. Análisis por filas (análisis estadístico de cada uno de los sitios de unión). Valores Z menores a -1 color verde, valores entre -1 y 1 color blanco y valores mayores a 1 color rojo.

En el caso del sitio de unión de la interfaz del dímero de la proteína EccB3 se seleccionaron los fármacos ivermectina, rifalazil, selamectina, rifapentina y esparfloxacino (Figura 31A), sin embargo, solo selamectina interactúa con aminoácidos de la interfaz del dímero de EccB3 (Figura 31B). Las interacciones moleculares que se muestran entre la selamectina y los aminoácidos del monómero de la proteína EccB3 en donde ocurre la PPI son tres puentes de hidrógenos y ocho interacciones hidrofóbicas (Figura 31C).

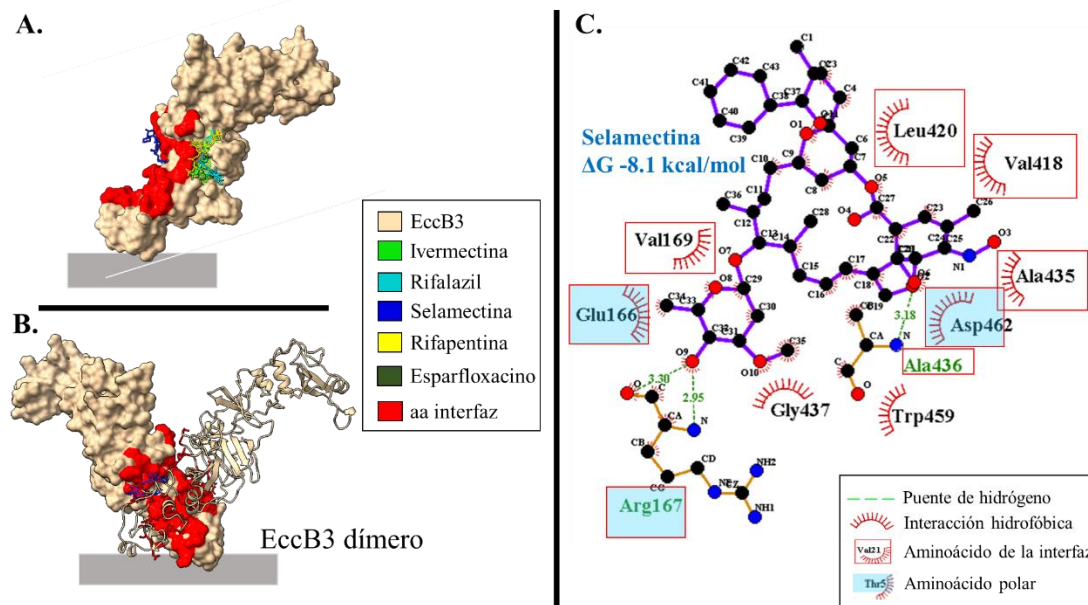


Figura 31. Acoplamiento molecular de EccB3 y fármacos. A. Interacciones de EccB3 con los 5 fármacos seleccionados. B. Interacción del dímtero de EccB3 con selamectina. C. Gráfico de 2D de las interacciones moleculares de EccB3 con selamectina.

En el caso de los sitios de unión a fármacos seleccionados en la proteína EccD3 se realizó el análisis en la conformación corta debido a que tanto la conformación corta como la extendida presentan la misma estructura en su dominio membranar además de la interfaz de PPI.

En el sitio de unión a fármacos denominado N-terminal de EccD3 se seleccionó a rifampicina, selamectina, rifapentina, ivermectina y moxidectina (Figura 32A). Al realizar la inspección visual solo selamectina interactúa con aquellos aminoácidos que se encuentran en la PPI, mostrando ocho interacciones hidrofóbicas entre la selamectina y los aminoácidos de esta área de la proteína EccD3 (Figura 32B). En el sitio de unión a fármacos denominado C-terminal de EccD3 se seleccionaron a la vitamina D, selamectina, ivermectina, avermectina, rifalazil y moxidectina (Figura 32A), pero en este caso al evaluar la interacción de los aminoácidos de la PPI y los fármacos, solo moxidectina y rifalazil se encontraron interactuando con estos aminoácidos (Figura 32C y D).

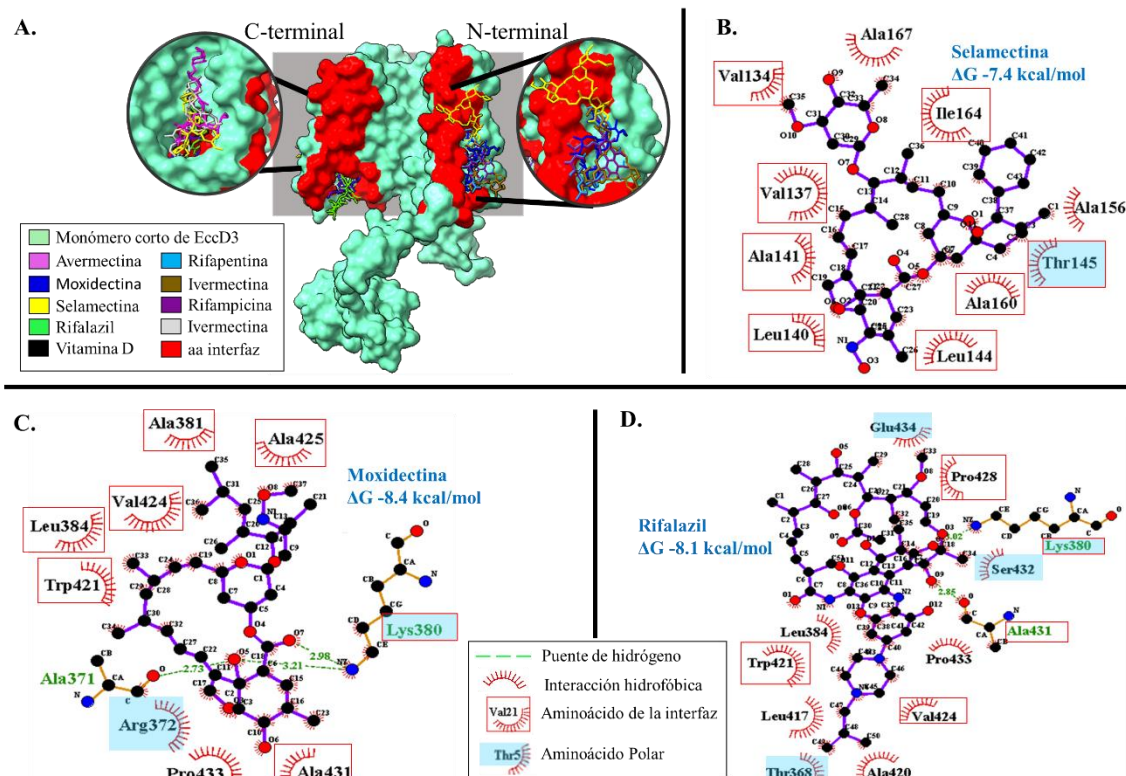


Figura 32. Acoplamiento molecular entre EccD3 y fármacos. A. Interacciones de EccD3 con los fármacos seleccionados. Gráfico de 2D de las interacciones moleculares de EccD3 con B. selamectina, C. moxidectina y D. rifalazil.

En el sitio de unión ESX-3 protómero 1 se seleccionó a viomicina, selamectina, ivermectina, avermectina y moxidectina (Figura 33A). Sin embargo, al realizar la inspección visual solo ivermectina, avermectina y moxidectina interactúan con los aminoácidos que se encuentran en la PPI entre los protómeros que forman el sistema de secreción ESX3 (Figura 33C-E). En el caso del sitio de unión ESX3 protómero 2 se seleccionaron a los fármacos vitamina D, selamectina y viomicina, pero cuando se analizaron las interacciones se encontró que estas se presentaron en aminoácidos que se encuentran dentro del sistema y no en los aminoácidos de la interfaz (Figura 34).

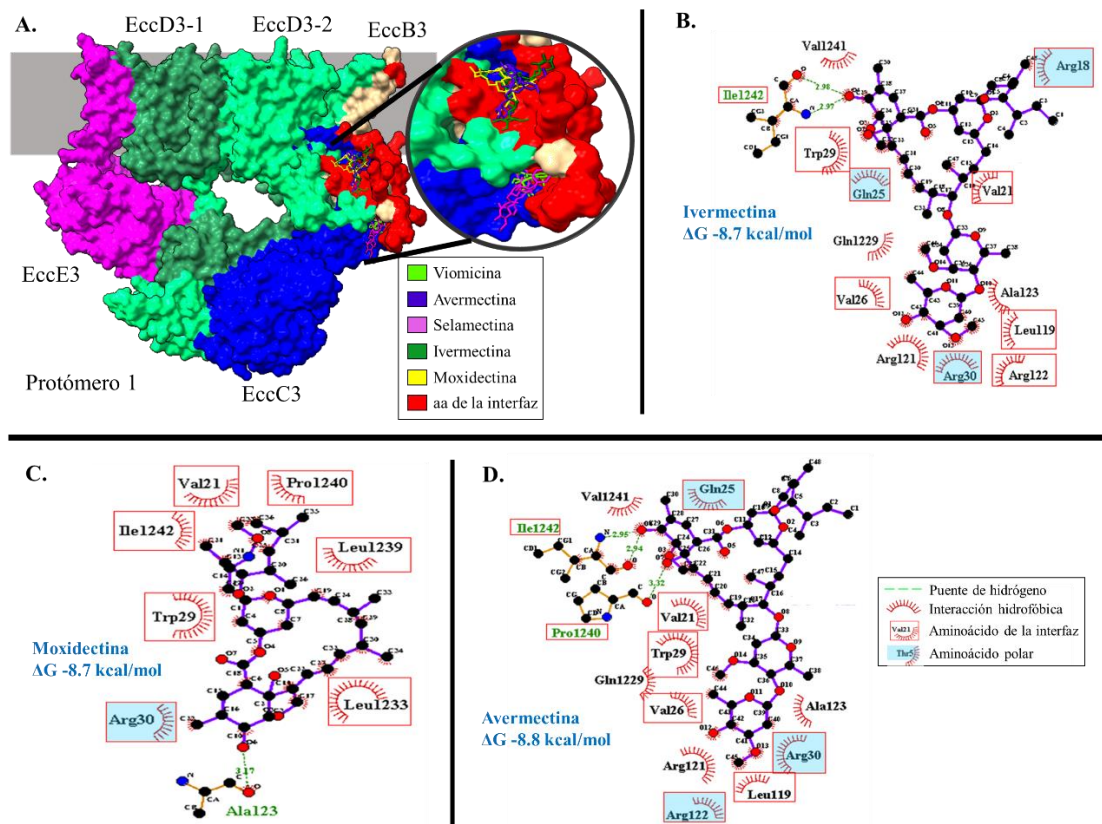


Figura 33. Acoplamiento molecular entre el protómero 1 del sistema de secreción ESX3 y fármacos. A. Interacciones del protómero 1 con los fármacos seleccionados. Gráficos de 2D de las interacciones moleculares entre el protómero 1 y los fármacos B. ivermectina, C. moxidectina y D. avermectina. Color rojo muestra los aminoácidos de la interfaz de la interacción entre los protómeros del sistema de secreción ESX3.

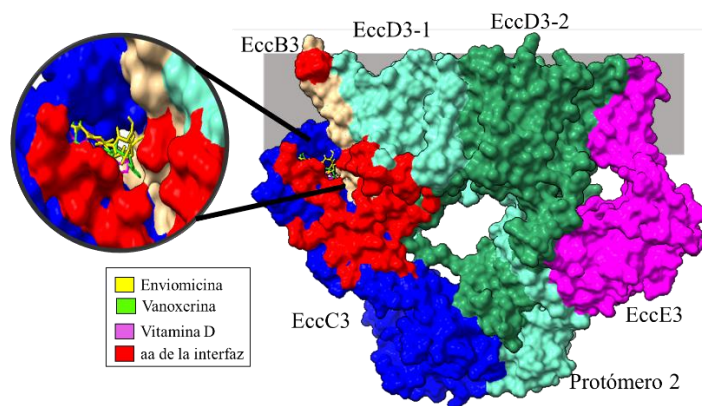


Figura 34. Acoplamiento molecular entre el protómero 2 del sistema de secreción ESX3 y fármacos. Interacciones del protómero 1 con los fármacos seleccionados. Color rojo muestra los aminoácidos de la interfaz de la interacción entre los protómeros del sistema de secreción ESX3.

Finalmente, en el sitio de unión del dominio ATPasa III de la proteína EccC3 se realizó un acoplamiento molecular entre el ATP y el dominio ATPasa, con la finalidad de comparar la interacción obtenida con el método usando el algoritmo de VINA y lo que se encuentra en el PDB 6J17 (Wang et al. 2020) obtenido de manera experimental, por lo tanto, es el control positivo del método de acoplamiento molecular. Se realizaron dos acoplamientos moleculares uno agregando el Magnesio y el ATP y el otro solo el ATP, obteniendo menor energía al agregar el magnesio (Tabla 25). En ambos casos se observa que la mayoría de los aminoácidos del sitio activo que se predijeron que interactúan con la molécula del ATP concuerdan con los datos experimentales (Tabla 25). Además, se evaluó el RMSD entre la molécula de ATP del PDB 6J17 y la molécula obtenida en el acoplamiento molecular mostrando 1.087 Å, lo que demuestra que existe alta similitud entre la posición de las moléculas (Figura 35).

Tabla 25. Aminoácidos del sitio activo del dominio ATPasa III de EccC3 que interactúan con el ATP.

Aminoácidos del sitio activo que interactúan con el ATP		
ATP/Mg PDB: 6J17	ATP -8.8 kcal/mol *	ATP/Mg -10.4 kcal/mol *
THR 5	THR 5	THR 5
ALA 50	ALA 50	ALA 50
ARG 51	ARG 51	ARG 51
SER 52	--	SER 52 **
GLY 53	GLY 53	GLY 53
LYS 54	LYS 54	LYS 54
THR 55	THR 55	THR 55
THR 56	THR 56	THR 56
ARG 82	ARG 82	ARG 82
--	ARG 186 **	ARG 186 **
ALA 233	ALA 233	ALA 233
GLY 234	GLY 234	GLY 234
--	--	GLN 249 **
LEU 250	LEU 250	LEU 250
ILE 251	ILE 251	--
ASN 252	ASN 252	ASN 252

PDB ID: 6J17 (Wang et al. 2020) datos experimentales. * kcal/mol ΔG de la interacción del acoplamiento molecular proteína-ligando. ** Aminoácidos que no se encontraron en la interacción de los datos experimentales.

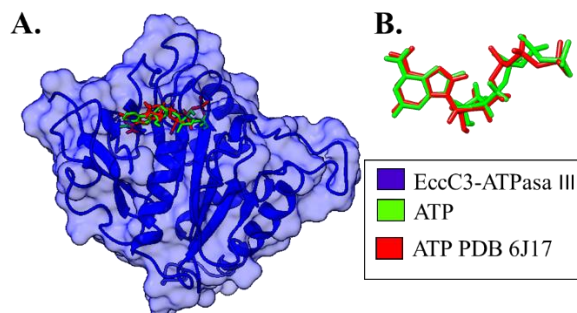


Figura 35. Acoplamiento molecular del ATP con el dominio ATPasa III de la proteína EccC3. A. Interacción de la proteína EccC3 con la molécula de ATP en color rojo la molécula obtenida experimentalmente (PDB 6J17) (Wang et al. 2020) y en color verde la molécula obtenida mediante predicción utilizando el algoritmo de VINA con un ΔG -8-8 kcal/mol.

Continuando con la selección de los fármacos que presentan un valor Z menor a -1 seleccionó a moxidectina, viomicina, levofloxacin, sin embargo, en ninguno de los casos presentó una menor energía en comparación que el control la molécula de ATP utilizada como control, por lo tanto, nos indica que ninguna interacción sería más fuerte que su sustrato original (Figura 36).

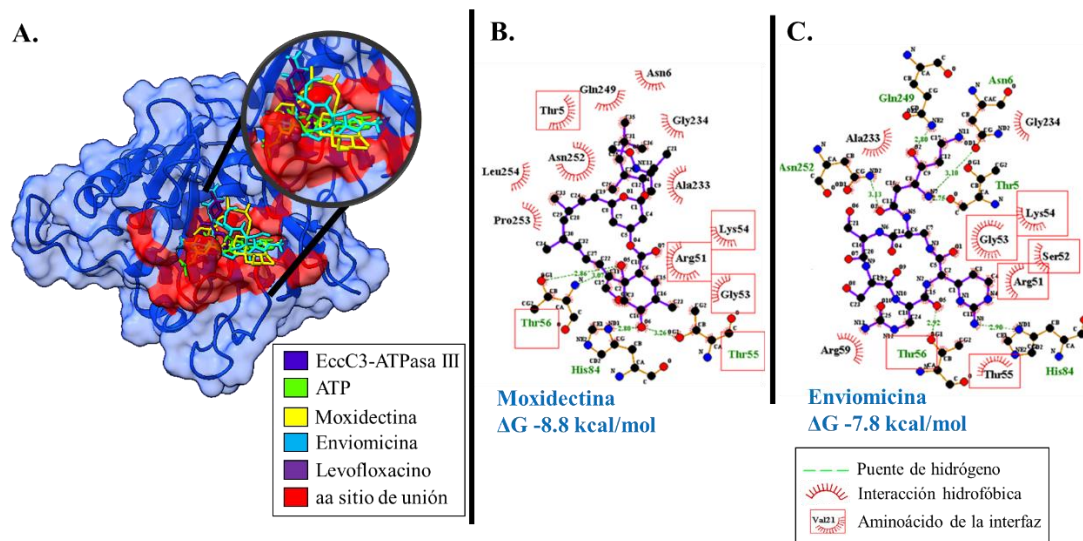


Figura 36. Acoplamiento molecular entre el domino ATPasa III de EccC3 y fármacos. A. Interacciones del domino ATPasa III de EccC3 con los fármacos seleccionados. Gráficos 2D de las interacciones moleculares entre el dominio ATPasa y los fármacos B. moxidectina y C. enviomicina.

De los 6 sitios de unión seleccionados solo 4 de ellos mostraron interacciones con fármacos que podrían desestabilizar la estructura cuaternaria del sistema de secreción ESX3 mediante la interacción con aminoácidos que forman las interacciones proteína-proteína, los fármacos que presentaron estas interacciones pertenecen a la familia de las avermectinas (Figura 31,32 y 33). Por lo tanto, se realizó la búsqueda en la literatura sobre este tipo de fármacos encontrando que existen datos experimentales de la ivermectina y el canal de cloro dependiente de glutamato de *Caenorhabditis elegans* (PDB 3RIF) (Hibbs y Gouaux 2011), realizando el acoplamiento del canal de cloro dependiente de glutamato y la ivermectina observando un ΔG de -9.4 kcal/mol, además se comparó la interacción de la ivermectina predicha con algoritmo de VINA en comparación de los datos experimentales, mostrando un RMSD de 1.2 Å (Figura 37A) y además la ivermectina muestra interacciones con la mayoría de los aminoácidos que se observaron de manera experimental (Figura 37B y C).

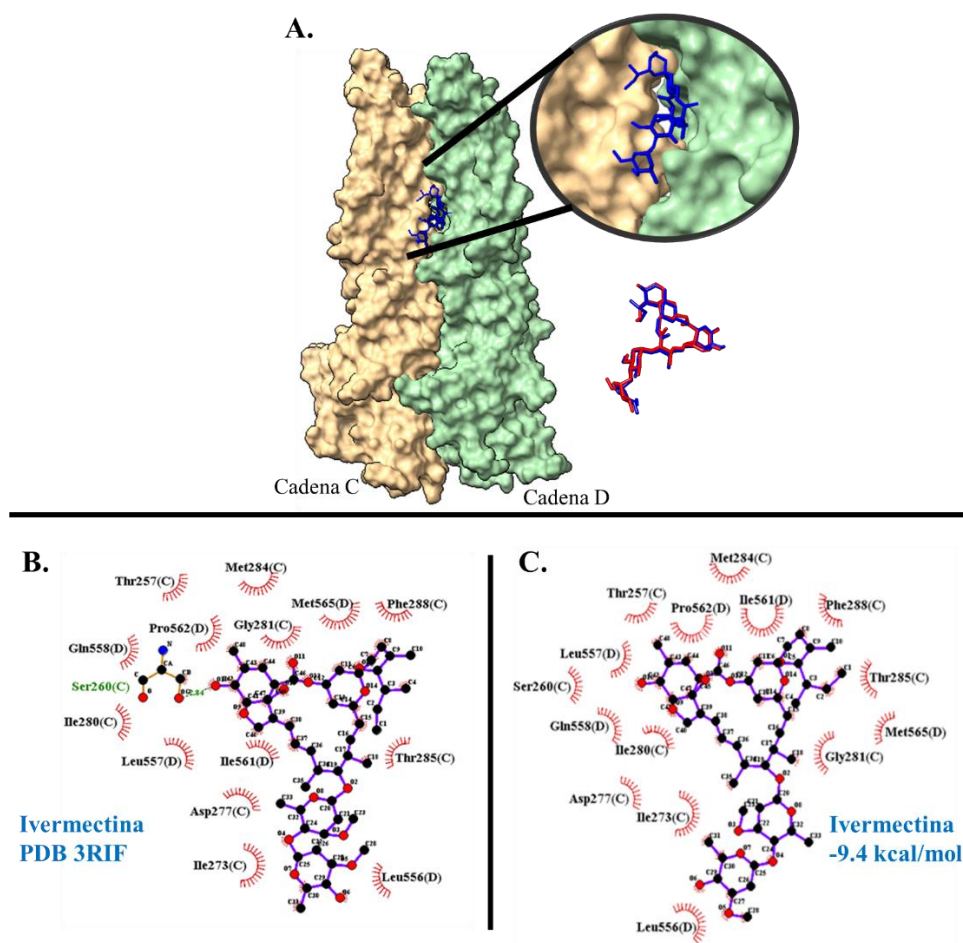


Figura 37. Interacción del canal de cloro con la ivermectina. A. Acoplamiento molecular de las cadenas C y D del canal de cloro y la ivermectina. Gráficos de 2D de las interacciones moleculares entre el canal de cloro de *C. elegans* (PDB 3RIF) (Hibbs y Gouaux 2011) y la molécula de la ivermectina B. obtenida experimental y C. simulación obtenida por medio del algoritmo de VINA.

El análisis de la ivermectina y el canal de cloro de *C. elegans* permite observar de que forma se generan las interacciones moleculares de los fármacos que pertenecen a las avermectinas con aminoácidos que forman parte de la PPI.

7.5.4. Análisis de propiedades de los fármacos de la familia de las avermectinas.

Los fármacos que obtuvieron una mejor interacción con los sitios de unión seleccionados fueron avermectina, ivermectina, moxidectina y selamectina. Por lo tanto, se evaluó la probabilidad de presentar diferentes actividades biológicas (Tabla 26). Observando que la avermectina e ivermectina tienen una probabilidad mayor al 90% de ser antibacteriales mientras que la moxidectina y selamectina presentan una probabilidad arriba del 80% (Tabla 26).

Tabla 26. Actividad biológica de las avermectinas.

Actividad biológica de los fármacos	Valor de Probabilidad (<i>Pa</i>)			
	Avermectina	Ivermectina	Moxidectina	Selamectina
Insecticida	0.990	0.989	0.959	0.956
Antiparasito	0.994	0.994	0.982	0.949
Acaricida	0.978	0.971	0.941	0.939
Antihelmíntico	0.994	0.994	0.984	0.931
Antifúngico	0.915	0.929	0.875	0.880
Antibacterial	0.919	0.921	0.813	0.857
Antibiótico	0.894	0.893	0.734	0.787

Pa representa el valor de probabilidad que la actividad sea active. Las actividades biológicas se obtuvieron mediante PASSonline.

La toxicidad de las avermectinas se evaluó, encontrando que las cuatro avermectinas presentan probabilidad de ser inmunotóxicas (Tablas 27).

Tabla 27.Toxicidad de las avermectinas.

Actividad biológica	Toxicidad			
	Avermectina	Ivermectina	Moxidectina	Selamectina
LD ₅₀	19 mg/kg	27 mg/kg	310 mg/kg	310 mg/kg
Hepatotoxicidad	0.85-I	0.93-I	0.69-I	0.67-I
Carcinogenicidad	0.64-I	0.66-I	0.54-I	0.52-I
Mutagenicidad	0.65-I	0.89-I	0.63-I	0.67-I
Citotoxicidad	0.70-I	0.72-I	0.68-I	0.76-I
Inmunotoxicidad	0.99-A	0.99-A	0.99-A	0.99-A

A and I representan activación o inactivación de la actividad, respectivamente. LD₅₀, dosis letal del 50%. El análisis de toxicidad se obtuvo mediante Pro Tox-II.

En el caso de las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de las avermectinas mostraron que la avermectina e ivermectina son más solubles en agua en comparación de la moxidectina y selamectina que presentan baja solubilidad, concordando con la lipofiliidad en donde la moxidectina y selamectina son más lipofílicas. Las cuatro avermectinas presentan baja absorción en el intestino y son sustratos de la glicoproteína PP, mostrando una permeabilidad en la piel desde 5 cm/s hasta 8 cm/s (Tabla 28).

Tabla 28.Propiedades ADME de las avermectinas.

Actividad biológica	Propiedades ADME			
	Avermectina	Ivermectina	Moxidectina	Selamectina
Solubilidad en agua Log S (SILICOs-IT)	-3.42 soluble	-3.89 soluble	-4.37 moderadamente soluble	-4.07 moderadamente soluble
Lipofiliidad Log $P_{O/W}$	2.31	2.72	4.16	3.09
Absorción GI	Baja	Baja	Baja	Baja
Permeabilidad BHE	No	No	No	No
Sustrato de glicoproteína P	Si	Si	Si	Si
Permeabilidad piel Log K_p	-8.90 cm/s	-7.14 cm/s	-5.59 cm/s	-7.13 cm/s

BHE, barrera hematoencefálica; GI, gastrointestinal. Log S, logaritmo de solubilidad. Log $P_{O/W}$, logaritmo del coeficiente de partición de n-octanol/agua. Log K_p , algoritmo del coeficiente de permeación por la piel. SILICOs-IT, método híbrido de fragmentación/topológico calculado por el programa FILTER-IT. Propiedades ADME obtenidas mediante SwissADME.

De acuerdo con el análisis *in silico* los posibles fármacos de interactuar con los componentes del sistema de secreción ESX3 son avermectina, ivermectina, moxidectina y selamectina. Para continuar con el análisis de estos fármacos, se realizaron ensayos *in*

vitro utilizando la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*, en presencia de ivermectina y así evaluar el efecto de la inhibición del gen *eccD3*.

7.6. Evaluación de la inhibición del gen *eccD3* en presencia de Ivermectina.

Se realizó la evaluación de la CMI del fármaco ivermectina en la cepa silvestre *M. smegmatis* mc² 155 observando una CMI de 256 µg/mL (Figura 38).

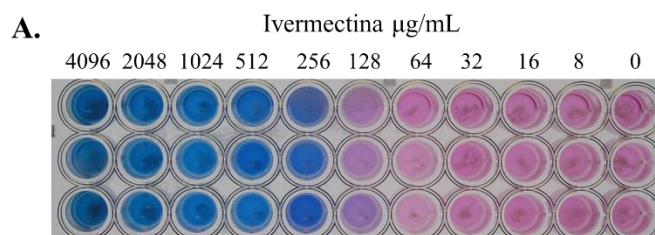


Figura 38. CMI de ivermectina en *M. smegmatis* wild type. Método de microdilución en placa con resazurina (REMA) con diluciones seriadas para ivermectina (4096 µg/mL a 8 µg/mL).

La CMI de la ivermectina en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* se observó en 128 µg/mL en ausencia de ATc (Figura 39 A y 40) mientras que en presencia de ATc es de 64 µg/mL (Figura 39B y 40), mostrando un aumento de la sensibilidad de la bacteria a la ivermectina al inhibir el gen *eccD3*.

En el caso de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble presenta una CMI de 128 µg/mL tanto en ausencia como en presencia de ATc, sin mostrar diferencias en su crecimiento (Figura 41 y 42).

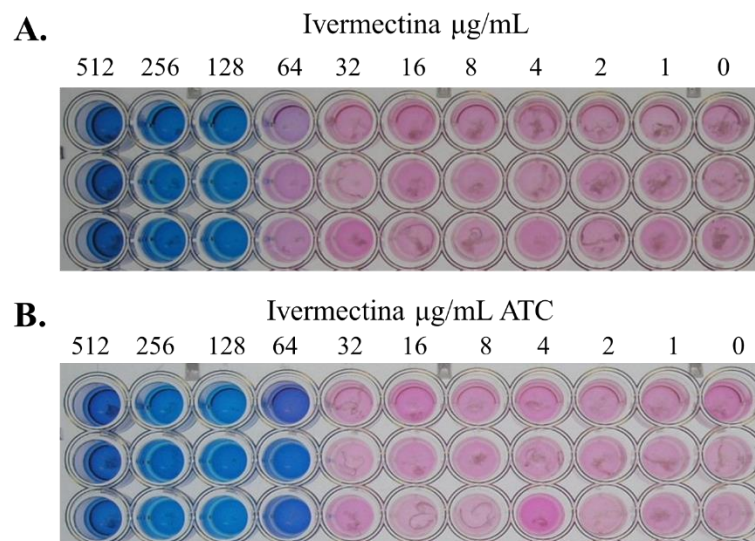


Figura 39. CMI de ivermectina en *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*. Método de microdilución en placa con resazurina (REMA) con diluciones seriadas para ivermectina (512 $\mu\text{g/mL}$ a 1 $\mu\text{g/mL}$) mostrando la CMI de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en ausencia A. y en presencia B. de ATC (anhidrotetraciclina, 100 ng/mL).

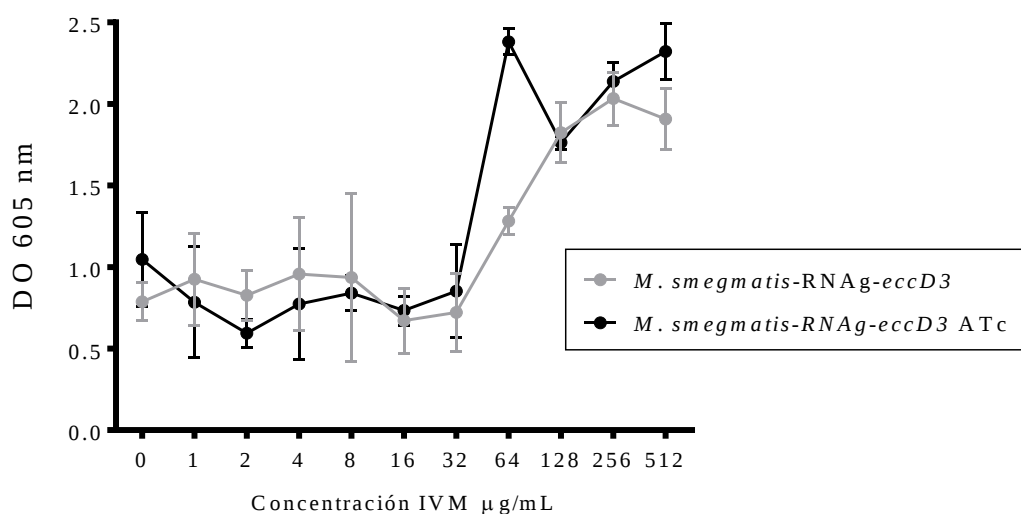


Figura 40. CMI de la ivermectina en *M. smegmatis* PLJR962-RNAg-*eccD3*. Gráfica de la lectura de absorbancia a 605 nm de los pozos del ensayo de microdilución en placa con resazurina, correspondientes al cultivo de la cepa *M. smegmatis* PLJR962-RNAg-*eccD3* en la placa por 40 h a 37°C en agitación constante con resazurina por 6 de horas de incubación, en donde se observa una diferencia en el punto de corte de la CMI obtenida. Utilizando el equipo Synergy HT (BioTek).

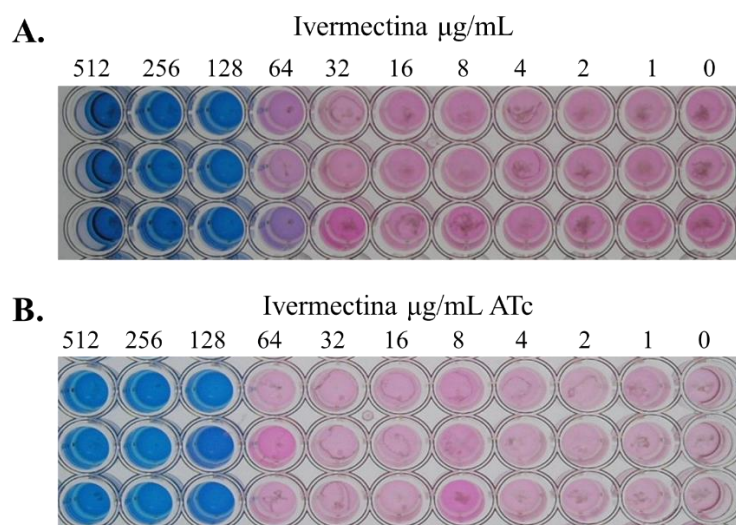


Figura 41. CMI de la ivermectina en *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble. Método de microdilución en placa con resazurina (REMA) con diluciones seriadas para ivermectina (512 $\mu\text{g/mL}$ a 1 $\mu\text{g/mL}$) mostrando la CMI de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble en ausencia A. y en presencia B. de ATc (anhidrotetraciclina, 100 ng/mL).

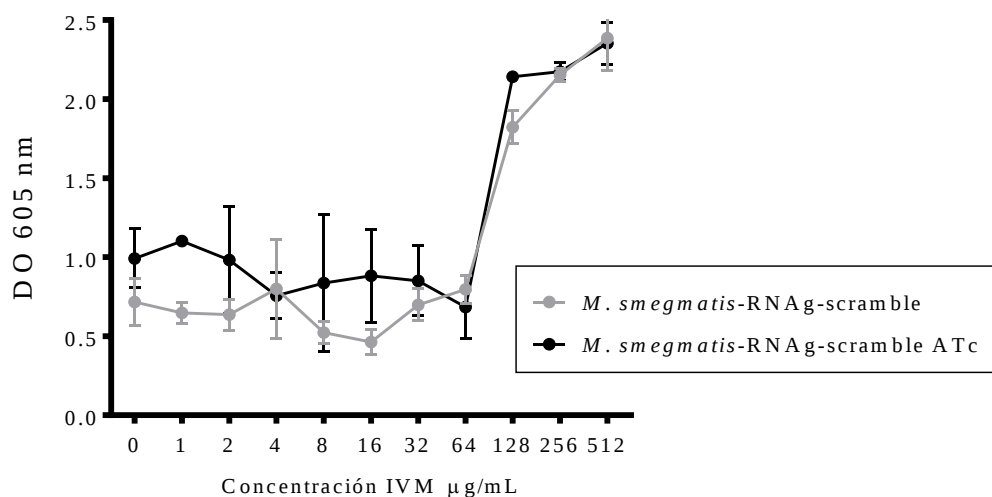


Figura 42. CMI de la ivermectina en *M. smegmatis* PLJR962-RNAg-scramble. Gráfica de la lectura de absorbancia a 605 nm de los pozos del ensayo de microdilución en placa con resazurina, correspondientes al cultivo de la cepa *M. smegmatis* PLJR962-RNAg-scramble en la placa por 40 h a 37°C en agitación constante con resazurina por 6 de horas de incubación. Utilizando el equipo Synergy HT (BioTek).

Con la finalidad de observar los cambios en el crecimiento bacteriano en presencia de ivermectina debido a la inhibición del gen *eccD3* se realizó una curva de crecimiento de las cepas *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* y *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble en presencia y ausencia de ATc a diferentes concentraciones de ivermectina (512 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL y 32 µg/mL). No se observó crecimiento de ninguna de las dos cepas en las concentraciones de 512 µg/mL, 256 µg/mL y 128 µg/mL de la ivermectina (Anexo I, Figura I1). Por otro lado, en las curvas de crecimiento en presencia de 32 µg/mL y 64 µg/mL de ivermectina, se observó una diferencia significativa en el crecimiento de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de ATc al comparar su crecimiento en ausencia de ATc, mostrando una disminución del crecimiento de la cepa al inhibir el gen *eccD3* en presencia de ivermectina a las concentraciones señaladas. Lo anterior indica que la cepa adquirió una mayor sensibilidad a ivermectina (Figura 43 y 44). Mientras que la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble no mostró diferencias significativas en su crecimiento en presencia o ausencia del ATc en ninguna de las dos concentraciones de ivermectina señaladas (Figura 43 y 44).

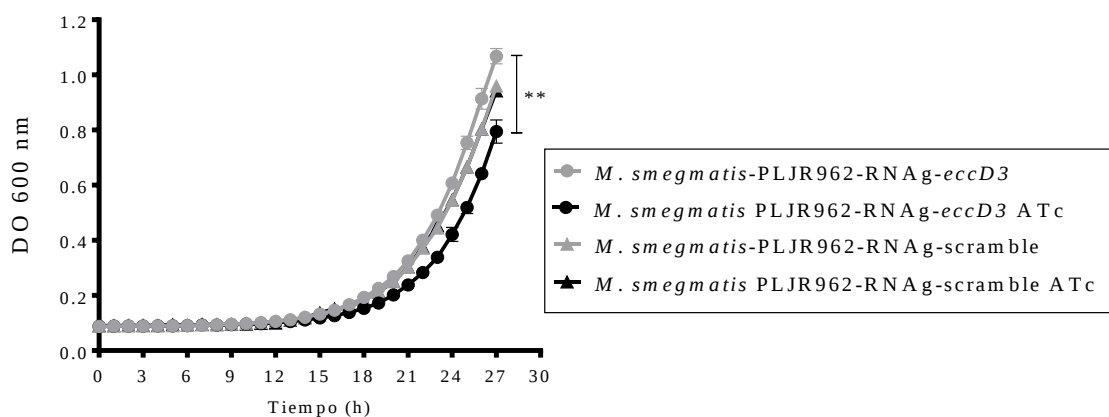


Figura 43. Curva de crecimiento de *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de ivermectina. Curva de crecimiento de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* (marcada con círculos) y de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble (marcada con triángulos) en ausencia (línea color gris) o presencia (línea color negro) de ATc una concentración de 100 ng/mL, una concentración final de 32 µg/mL de ivermectina y 20µg/mL de kanamicina. Se realizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas para comparar el crecimiento en diferentes concentraciones de fármaco entre las cepas y entre la misma cepa en presencia o ausencia de ATc. Las barras con el asterisco muestran las cepas que presentaron diferencias significativas respecto a su crecimiento con un valor significativo de $p = 0.000$.

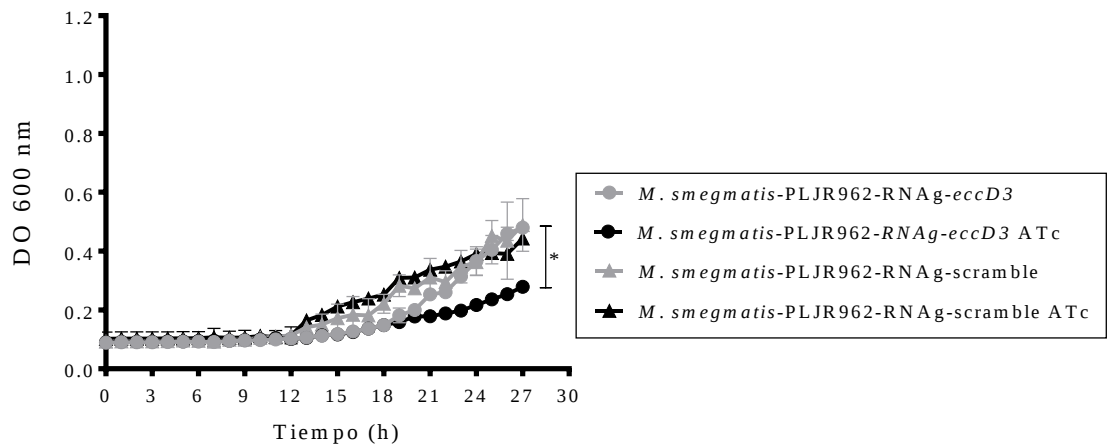


Figura 44. Curva de crecimiento de *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-eccD3 en presencia de ivermectina. Curva de crecimiento de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-eccD3 (marcada con círculos) y de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble (marcada con triángulos) en ausencia (línea color gris) o presencia (línea color negro) de ATc una concentración de 100 ng/mL, una concentración final de 64 μ g/mL de ivermectina y 20 μ g/mL de kanamicina. Se realizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas para comparar el crecimiento en diferentes concentraciones de fármaco entre las cepas y entre la misma cepa en presencia o ausencia de ATc. Las barras con el asterisco muestran las cepas que presentaron diferencias significativas respecto a su crecimiento con un valor significativo de $p = 0.04$.

8. DISCUSIÓN

La tuberculosis es una gran problemática mundial y la resistencia al tratamiento del agente causal aumenta este problema de salud. Debido a lo anterior, la búsqueda de marcadores moleculares de este fenómeno de resistencia y la identificación de nuevos blancos farmacológicos para tratar la TB resistente son necesarios para alcanzar el objetivo de la OMS de ponerle un fin a esta enfermedad (WHO 2022a). La proteína EccD3 componente principal de la estructura del sistema de secreción ESX3 se ha visto relacionada con la resistencia a fármacos de primera línea, además esta proteína y las otras proteínas que forman este sistema de secreción son necesarias para la viabilidad de *M. tuberculosis* (Tinaztepe et al. 2016). Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó la vinculación del gen *eccD3* en el fenómeno de resistencia a fármacos antituberculosis de segunda línea, y se analizó el potencial farmacológico de la proteína EccD3, así como de las proteínas estructurales del sistema de secreción ESX3.

8.1. Efecto de la inhibición del gen *eccD3* en el fenómeno de resistencia a fármacos.

Para evaluar el efecto del gen *eccD3* en el fenómeno de resistencia a fármacos de segunda línea se generó la mutante knock down *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* utilizando el sistema de CRISPRi, además, se generaron dos cepas control, la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*mmpL3* y la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble. Se evaluó fenotípicamente la inhibición producida por cada cepa, observando que al activar el sistema CRISPRi no existen diferencias significativas en el crecimiento tanto en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* como en la cepa control *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble. Lo anterior nos muestra que el gen *eccD3* no es esencial para la viabilidad de *M. smegmatis* concordando con lo demostrado en la literatura (Siegrist et al. 2014). Por otro lado, se reportó que al generar una cepa de *M. smegmatis* con el gen *eccD3* eliminado completamente se observó una alteración en el crecimiento en comparación de la cepa wild type (Nath et al. 2018). En el caso de la cepa control *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble se verifica que el sistema CRISPRi no causa variación en el crecimiento de la bacteria, coincidiendo con lo reportado por otros autores al utilizar este tipo de cepas control (Rock et al. 2017; Xiao et al. 2019; Faulkner et al. 2021). En el caso de la cepa

control *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*mmpL3*, al activar el sistema CRISPRi se observa una diferencia significativa en el crecimiento bacteriano al producir la inhibición del gen *mmpL3*, mostrando que el sistema CRISPRi funciona, ya que es un transportador de un elemento esencial de la membrana de las micobacterias, el lípido monomicólico trehalosa (Varela et al. 2012).

El crecimiento de las cepas *M. smegmatis*-RNAg-*eccD3* y *M. smegmatis*-RNAg-scramble se evaluó en presencia del fármaco de selección kanamicina y del inductor del sistema CRISPRi anhidrotetraciclina (ATc), observando que estos fármacos no modifican el crecimiento de las cepas, concordando con otras investigaciones en donde utilizan 20 µg/mL de kanamicina y 100 ng/mL de ATc (Feng et al. 2020; Samukawa et al. 2022).

La evaluación genotípica de la inhibición del gen *eccD3* en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* con CRISPRi activado muestra una inhibición de 92.19 veces del gen respecto a la misma cepa sin activar el sistema. La secuencia PAM utilizada fue NNAGAAG con un porcentaje de represión reportado de 92.19 %. Al utilizar esta misma secuencia PAM utilizando el sistema reportero *renilla* (en donde se inhibe el gen de la luciferasa) mostró una inhibición de 216.7 veces (Rock et al. 2017). Por otro lado, utilizando el mismo sistema y secuencia PAM para inhibir el gen *mmpL3* en *M. tuberculosis* también se observó una inhibición del gen blanco de hasta 200 veces (McNeil y Cook 2019). No obstante, en otros trabajos utilizando el mismo sistema, pero no la misma secuencia PAM se ha observado una inhibición del 90% al 98% utilizando diferentes RNA guías en diferentes posiciones de los genes blanco (Xiao et al. 2019; Korycka-Machala et al. 2020). Además, en otras investigaciones utilizando el mismo sistema CRISPRi se ha reportado una inhibición del 70% al 80% (Lunge et al. 2020; Feng et al. 2021), del 40% al 60% (Faulkner et al. 2021; Savková et al. 2021) y del 15% o del 20% en los genes blanco (Hecht et al. 2020). La inhibición obtenida del gen *eccD3* utilizando el sistema CRISPRi en el presente estudio se encuentra dentro del rango de inhibición génica generado en la literatura mencionada.

El análisis de la inhibición del gen *eccD3* en el fenómeno de resistencia a fármacos se realizó observando el crecimiento bacteriano en presencia de diferentes fármacos a diferentes concentraciones, tomando como base su CMI en la bacteria. Los análisis con los fármacos de primera línea mostraron un aumento en la resistencia a rifampicina al inhibir el gen *eccD3*, lo que concuerda con la literatura en donde al realizar una mutante del gen *eccD3* se observa resistencia a rifampicina e isoniazida debido a que disminuye la permeabilidad de la membrana celular (Nath et al. 2018). Sin embargo, este aumento de resistencia a isoniazida no se observa en nuestro estudio, este resultado puede deberse a que en el presente estudio se disminuye la expresión del gen y la proteína EccD3 puede encontrarse a bajas concentraciones (Rock et al. 2017), mientras que en el otro estudio eliminan el gen por completo (Nath et al. 2018). Los fármacos rifampicina e isoniazida presentan diferentes propiedades fisicoquímicas. Mientras que la rifampicina presenta un peso molecular de 822.9 g/mol y un coeficiente de partición LogP 3.719 (Rasool et al. 2019), la isoniazida tiene un peso molecular de 137.1 g/mol y un coeficiente de partición de LogP -0.64 que la hace más polar (Mashhadi et al. 2016) lo que produce que tengan un diferente mecanismo de acceso por la membrana de las micobacterias (Stephan et al. 2004).

En el caso de levofloxacino, moxifloxacino y protionamida se observa que al inhibir el gen *eccD3* no existe diferencia significativa en el crecimiento de *M. smegmatis* respecto de la misma cepa sin inhibir el gen.

En el caso de linezolid se observa un aumento de la susceptibilidad a este fármaco al inhibir el gen *eccD3*, observando que la CMI disminuye de 2 µg/mL a 1 µg/mL, además se observa que disminuye el crecimiento de *M. smegmatis* significativamente en la curva de crecimiento al inhibir el gen *eccD3*. Este fármaco tiene un coeficiente de partición LogP 0.232 lo que hace que sea una molécula polar (Piccaro et al. 2015) contrario a la rifampicina, en donde se observa una mayor resistencia. Por lo tanto, este aumento en la susceptibilidad a linezolid puede deberse a que el mecanismo por el cual el fármaco ingresa a la célula se altera ya que las proteínas estructurales de la membrana interna como EccD3 mantienen la forma de la pared celular (Dulberger et al. 2020; Nath et al. 2018),

y podría ocasionar que la molécula ingrese en mayor cantidad a la células provocando la inhibición de la síntesis de proteínas (Piccaro et al. 2015).

8.2. Potencial farmacológico de la proteína EccD3 y de las proteínas estructurales del sistema de secreción ESX3.

Para evaluar el potencial farmacológico de la proteína EccD3 y los demás componentes estructurales del sistema de secreción ESX3 se utilizaron las proteínas de *M. tuberculosis*, se seleccionaron seis sitios de unión a fármacos de los cuales cinco corresponden a las interfaces del sistema de secreción en donde ocurren las PPI, basados en que la inhibición de estas interacciones provoque una alteración en la estructura cuaternaria del sistema de secreción. Mientras que el sexto sitio de unión a fármacos corresponde al dominio ATPasa III de la proteína EccC3, con la finalidad de inhibir el motor de secreción (Poweleit et al. 2019; Famelis et al. 2019). En años reciente estos sitios de PPI han sido utilizados como blancos farmacológicos diseñando moléculas para su inhibición, mostrando gran efectividad como blanco farmacológico en diversas patologías, como el cáncer (Kozakov et al. 2011; Lu et al. 2020).

En este estudio se utilizaron los seis sitios de unión a fármacos seleccionados para realizar el acoplamiento molecular en contra de los 34 fármacos seleccionados, utilizando el método de VINA el cual tiene una precisión de más del 73% siendo uno de los algoritmos con mayor porcentaje que se encuentran en la literatura (Cinaroglu y Timucin 2019).

Para validar la metodología utilizada para el acoplamiento molecular se realizó un acoplamiento molecular entre el sitio ATPasa III de la proteína EccC3 para compararlo con la interacción obtenida experimentalmente, mostrando que el RMSD de la estructura experimental contra la estructura del ATP obtenida en la predicción se encuentra dentro del rango de 0 a 2 Å lo que indica que estas moléculas presentan una similitud arriba del 90% (Carugo y Pongor 2001). Adicionalmente se predijeron interacciones entre el ATP y la mayoría de los aminoácidos con que interactúa experimentalmente el ATP en el sitio de unión de la ATPasa (Wang et al. 2020). Con estos resultados podemos validar la metodología utilizada para realizar los acoplamientos moleculares. En el caso del sitio de

unión a fármacos ATPasa III de la proteína EccC3 no se encontró ningún fármaco que presentara una mejor interacción que la molecular de ATP, por lo tanto, es necesario realizar una búsqueda con otro tipo de fármacos.

En el caso de los cinco sitios de unión a fármacos seleccionados en las PPI del sistema de secreción ESX3 se muestra que los fármacos avermectina, ivermectina, moxidectina y selamectina presentan la mejor interacción en estos cinco sitios de unión; además se observa que el triptófano, la arginina y la tirosina se encuentran ubicados en estos sitios donde ocurre la interacción con los fármacos, mostrando en la literatura que estos aminoácidos se encuentran en los sitios donde existe mayor probabilidad de presentar potencial farmacológico en los sitio de PPI (Moreira et al. 2007).

La avermectina, ivermectina, moxidectina y selamectina pertenecen a la familia de las avermectinas, las cuales se usan como pesticidas, antihelmínticos e insecticidas; la ivermectina y avermectina están aprobadas para el uso en humanos y recientemente se aprobó el uso de la moxidectina para humanos mostrando una mejor eficacia en contra del nemátodo *Onchocerca volvulus* en comparación de la ivermectina (El-Saber Batiha et al. 2020; Milton et al. 2020). Estas moléculas tienen un alto peso molecular cerca de 800 UMA (unidad de masa atómica) y en la literatura se ha encontrado que aquellas moléculas con un UMA mayor a 500 tienen una mayor probabilidad de inhibir aquellas regiones de PPI (Kozakov et al. 2011; Lu et al. 2020; Cesa et al. 2015; Cossar et al. 2020), como las observadas en el presente estudio del sistema de secreción ESX3.

En cuanto al mecanismo de acción de estos fármacos que pertenecen a la familia de las avermectinas, solo se ha descrito el de la ivermectina, en donde el fármaco interactúa en la PPI de dos dominios proteicos que forman el canal de cloro dependiente de glutamato del nemátodo *C. elegans* lo que provoca que aumente el efecto del canal causando parálisis neuromuscular de los invertebrados lo que finaliza en la muerte del nemátodo por inanición (El-Saber Batiha et al. 2020). Concordando con lo que se observa en el presente estudio en donde las avermectinas interactúan en las regiones de PPI de los dominios proteicos que conforman la estructura del sistema de secreción ESX3. Por lo tanto,

utilizando la información descrita experimentalmente sobre la ivermectina y el canal de cloro dependiente de glutamato (Hibbs y Gouaux 2011) se realizó un acoplamiento molecular entre la ivermectina y el dominio proteico del canal de cloro, comparando la predicción obtenida mediante el algoritmo de VINA con la información experimental (PDB 3RIF), mostrando una diferencia de 1 kcal/mol en la energía de unión al compararse con la energía de unión obtenida en los acoplamientos moleculares de las avermectinas con las interfaces del sistema de secreción ESX3. Esta diferencia se encuentra dentro del rango de error definido para el acoplamiento molecular (Tanchuk et al. 2016), mostrando que las interacciones de las avermectinas con el sistema de secreción ESX3 presentan una energía de unión similar a la que muestra la ivermectina con el canal de cloro.

En la literatura existen reportes en donde la avermectina, ivermectina, moxidectina y selamectina inhiben el crecimiento de manera *vitro* de cepas susceptibles y cepas resistentes a fármacos de *M. tuberculosis*, además en estos estudios proponen reposicionar el uso de estos fármacos para el tratamiento de la TB (Lim et al. 2013; Ramón-García et al. 2014; Muhammed Ameen y Drancourt 2013). En otros estudios se ha reportado la inhibición de otras micobacterias, encontrando la inhibición del crecimiento de *M. ulcerans* utilizando ivermectina y moxidectina (Omansen et al. 2015); así como la inhibición del crecimiento de *M. goodii* y *M. intracellulare* utilizando avermectinas y milbemicina (Muñoz-Muñoz et al. 2021). Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo molecular por el cual las avermectinas inhiben el crecimiento de las micobacterias.

Se han reportado diferentes efectos adversos de ivermectina en dosis arriba de 800 µg/kg, sin embargo, están por arriba de las dosis seguras que se usan las cuales van desde 200 µg/kg a 400 µg/kg (Navarro et al. 2020; Shirazi et al. 2022), además la concentración de las avermectinas reportadas para inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* va desde 3 µg/mL a 8 µg/mL (Lim et al. 2013; Ramón-García et al. 2014; Muhammed Ameen y Drancourt 2013). Existen estudios en donde han probado diferentes dosis para evaluar la seguridad de la ivermectina encontrando que es segura (Navarro et al. 2020) concordando con los resultados obtenidos sobre las diferentes actividades biológicas, toxicidad y características ADME de la avermectina, ivermectina, moxidectina y selamectina; sin

embargo, son necesarios análisis *in vitro* y clínicos para poder determinar un tratamiento para humanos en contra de la TB.

8.3. Evaluación del efecto de la inhibición del gen *eccD3* en presencia de ivermectina.

A partir de los resultados *in silico*, en donde se observa que los fármacos de la familia de las avermectinas tienen potencial para interactuar con el sistema de secreción ESX3, se evaluó el efecto de la inhibición del gen *eccD3* en presencia de ivermectina, utilizando la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* para realizar las evaluaciones. La CMI de la ivermectina obtenida en el presente estudio para la cepa *M. smegmatis* wild type fue de 256 µg/mL, sin embargo, en la literatura se ha reportado que la CMI de ivermectina que presenta *M. smegmatis* wild type es de 8 µg/mL (Lim et al. 2013), no obstante, en otro trabajo no encontraron la CMI de diferentes aislados clínicos de *M. smegmatis* obtenidos de gatos infectados con esta bacteria, reportando que estos aislados crecían hasta la concentración de 1024 µg/mL sin encontrar una CMI (Woerde et al. 2015).

Al inhibir el gen *eccD3* se observa un aumento en la sensibilidad a ivermectina en la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* mostrando una CMI de 64 µg/mL, mientras que, en la misma cepa, pero sin el inductor la CMI fue de 128 µg/mL.

Finalmente, para continuar con el estudio de las avermectinas es necesario realizar más análisis *in vitro* e *in vivo* para poder determinar la dosis para el tratamiento de la ivermectina en humanos contra la TB, y además es necesario evaluar a la avermectina, moxidectina y selamectina de manera *in vitro*.

9. CONCLUSIONES

Se generó la cepa *Mycolicibacterium smegmatis* PLRJ962-RNAg-*eccD3*, la cual inhibe un 92.19% la transcripción del gen *eccD3* utilizando el sistema CRISPRi.

Al inhibir el gen *eccD3* se observó resistencia a rifampicina y sensibilidad a linezolid. En el caso de los fármacos isoniazida, levofloxacino, moxifloxacino, bedaquilina o protionamida no se observó ningún efecto al inhibir el gen *eccD3*.

En el análisis *in silico* los fármacos avermectina, ivermectina, moxidectina y selamectina presentan potencial para interactuar con aminoácidos que forman las interacciones proteína-proteína del sistema de secreción ESX3 en *M. tuberculosis*. Estos sitios muestran alto potencial de blancos farmacológicos. Utilizando la cepa modelo *M. smegmatis* se demostró *in vitro* que la inhibición del gen *eccD3* aumenta la sensibilidad a la ivermectina.

10. PERSPECTIVAS

Evaluar *in vitro* el efecto de la inhibición del gen *eccD3* en la sensibilidad/resistencia a los fármacos avermectina, moxidectina y selamectina en la cepa de *M. smegmatis*.

Evaluar en un modelo *in vivo* la eficacia de las avermectinas en contra de la tuberculosis.

Evaluar cómo afecta la inhibición del gen *eccD3* en el transcriptoma global de la cepa *M. smegmatis* para observar que genes modifican su expresión debido a este fenómeno.

Evaluar interacciones moleculares de las avermectinas con los fármacos del tratamiento de la tuberculosis.

Evaluar el potencial farmacológico de las proteínas que son secretadas por el sistema de secreción ESX3.

11. ANEXOS

11.1. Anexo A. Alineamiento de la secuencia del RNAg-scramble con el genoma de *M. smegmatis*.

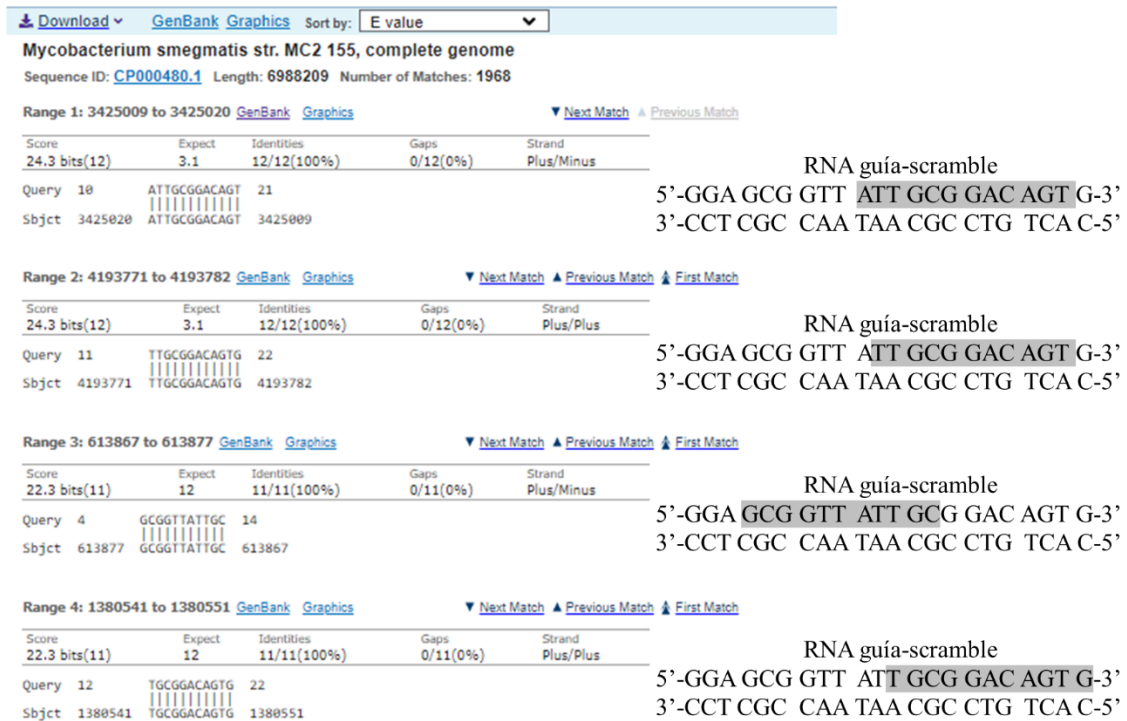


Figura A1. Alineamiento del RNAg-scramble contra el genoma de *M. smegmatis*. Resultados de los posibles sitios en donde alinea la secuencia del RNAg-scramble en el genoma de *M. smegmatis* con número del NCBI CP000480.1, mostrando las regiones en donde se observó mayor alineamiento de la secuencia. Parte izquierda se muestra señalando con color gris y letras en negritas que parte de la secuencia del RNAg-scramble alinea con la región del genoma de *M. smegmatis*. Alineamiento realizado con la herramienta básica para generar un alineamiento local de secuencias nucleotídicas, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) localizada en el NCBI (Camacho et al. 2009).

11.2 Anexo B. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen *eccD3* de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*.

<i>M. smegmatis</i>	1	ATGTCCGAGAACACAGTGTGATGCCGATCGTCCGGGTGGCGTGTGGCCGC	50	473	CCGGGAGATCTGCTCGGACAGTTTCATCGTCAGCGGATCGCGCTGGCCACC	522
<i>M. tuberculosis</i>	1	ATGTCCG---GCACCGTCTATGCAGATCGTCCGGTGCCTATCTTG----	43	455	CCGGTGTGCTGGCCGG-----GCTGC-TGGCGGTGG---CC	486
<i>M. smegmatis</i>	51	CGGAGACGACGGTGGCCGGCTGACCGAGATGGCCCTGCCGTCGAGTTGC	100	523	GTGATCGCGG-----GCGCTGGCCG-----TGCGCAACGGTCCGC	557
<i>M. tuberculosis</i>	44	CGGACA-----GCAGGTTGACCGAGATGGCCCTGCCCGGAGTTGC	85	487	GGGATCGCGGTGGCTAGCGCGCTGGCCGGATTGTTGATCA--CCATCC--	532
<i>M. smegmatis</i>	101	CACTGCGCGAGATCTGCCCGGGTCCAGCGCATCGTGCAGCC---GCC	147	558	GGTGTCTGCGACGT-----CGCTGGCGCTCAACGCATCGTCCCG	597
<i>M. tuberculosis</i>	86	CACTGCGCGAAATCCTGCCCGGGTACACGCTTGGTGGTTCCTCGGCG	135	533	---GTTGCCACGTTCCGGGTATCGCGCTGTGATCGCGCGCTGGTCCCC	579
<i>M. smegmatis</i>	148	CGTGAGAA---CGACGGTGCC---GCCGA-TCCGGCCGACG-GCCGAAC	189	598	GTGGCGCGGGCTTGGCGTGGGTGTGCGAGGTGATTTGCGCGCGCGGAA	647
<i>M. tuberculosis</i>	136	C---AAACGGCGATGGTGGCGCAAGCGACTCCGCG---GCTGCC----	174	580	ATCGGCGCGGCTGCTGGCTGTGGCGGTGCGAGAAAGTTTCGGGCGCGGCA	629
<i>M. smegmatis</i>	190	CCGGTGGCGGCTCAGCCTCGCTCCGATCGGCGGTGC-GCGGTTCACTTTGG	238	648	CGTGTCTGCTGCCCGCGGGCTGTGCGCGGTGGTGGTGTGATCAGC---	693
<i>M. tuberculosis</i>	175	---GTGCAACTGAGTTTGGCGCCCTGCGCGGG-GCAGCGCTTTAGCTTGG	220	630	GGTATTGCTGGGTGACGTGGGTAGGCCGATGGTGGTGGTATC-GCGCTG	678
<i>M. smegmatis</i>	239	ACGCCACGCTGACACGGTCGGCGCTGTCGACGGTGATCTGCTCGCGTG	288	694	---ATGGCCGGCTCGCCCGAC--GACCGCGGATCGCGGTGTTCACCGCG	738
<i>M. tuberculosis</i>	221	ATGCGAGCTTGACACCGTGGTGGTGTGTCGACGGTGATCTGTGGTGTG	270	679	ATGATTTCCAG--CGCCGAACGGGAAAGCGCTGCTGGCTTCTTACCGCA	726
<i>M. smegmatis</i>	289	CAGGCGGT-CCGCTCGGACCGCCGCGCGCGGATCGTGAGGACATCG	337	739	ACCGCGGTGACC--GGCGTGGCGTCTGCTGGTGGCGGGCGGGGCTCG	786
<i>M. tuberculosis</i>	271	CAGCGGTGCCG-CCGGTCCGGCGCGCGGGCATCGTGAAGACATCG	319	727	GGGCGGTGGTGGGGGCTCGGTGGG--GCTGGCGGGCGTGGCGAATTG	774
<i>M. smegmatis</i>	338	CCGACGCCGCGGTCTATCTTCCGAGGACGCG---AGGCGCCAGTGGG	382	787	CTGTGGGTCTATCTGTCGGACGT-----CATCGCTGCGCGCTG---G	826
<i>M. tuberculosis</i>	320	CCGACGCCCGGATGATCTT-TTCGACG-TCGCGGTTAAAGCCC---TGGG	364	775	CTGTGG--CAGCT-----GCCGTGTTGAGCATCGCTGCGGGCTGATTG	817
<i>M. smegmatis</i>	383	GTCCCA---CGACATCGCGCGTGGTGGCGGCTCGCGCTGATCG---G	425	827	TGCTCTCTCGG-TCTGATGTCACGGTGAAGGCGCACAAGTGTGGCGAT	875
<i>M. tuberculosis</i>	365	G---CATAGCGCATATCCAACGAGGAGCGCTGGCGCGGTGATTGCGTG	411	818	TG----GCGGCGCTGTTGGTCAACATCCAGGCGGCTCAGCTTTCGCACT	863
<i>M. smegmatis</i>	426	GCTGATCTCTGTCGGC-ACGGGACTTT---CCGTGCCCCACCGGATGATCA	472	876	GTGGGCGCGGTTTCCGCTGCCGGTATCCGGGCGCCGGGATCCGACGC	925
<i>M. tuberculosis</i>	412	GCT---CT-GCTGGCTACCGG--TTGACGGTGACCTATCGGGTTGCCA	454	864	GTGGGCGCGGTTCCCGTGGCGGTGATCCGGGCGCGGGGATCCCA---	910
<i>M. smegmatis</i>	702737-704164	926	CTGCGCGG-CGGCCCC---TTTCG-GTACTGCGGATCTGCCGCGCCGC	969		
<i>M. tuberculosis</i>	353083-354501	911	---CCCCGTGGCCCCCGCGTGGCGCTGCGGATTTGCTCGGCGG	957		
<i>M. smegmatis</i>	702737-704164	970	GTGCGGGTGAGCGAGGCGCACAGACCGGTGTGATCGCCGCGGGTGTGCT	1019		
<i>M. tuberculosis</i>	353083-354501	958	GTGCGGGTCAGTGACGCCCATCAAAAGCGGCTTCATCGCCGCGGGTGTCT	1007		
<i>M. smegmatis</i>	702737-704164	1020	GTTGGGCTCGCCGGTTGCGGTGGCCCT---GGTGAAGTC---GGCGAACG	1063		
<i>M. tuberculosis</i>	353083-354501	1008	GCTCAGCGTGTGGGGTGGTGGCCATCGCGGTGCGCCAGAGGCG--CT	1055		
<i>M. smegmatis</i>	702737-704164	1064	CCTCGCCGTGGGCTGGTACATCGTGGTGGCGCG---GCGGCGGTGGCG	1110		
<i>M. tuberculosis</i>	353083-354501	1056	CAGCGTTGTGGG-CTGGT--ATC-TGGTGGCGGCGACTGCGGCGGCGC	1101		
<i>M. smegmatis</i>	702737-704164	1111	GCGCTGCGCGCCGGGTCTGGGACTCCGCGGCTGCAAGGCGTGGTGTCT	1160		
<i>M. tuberculosis</i>	353083-354501	1102	ACCTGCGCGCGCGGGTGTGGGATTGCGCGCATGCAAGGCGTGGTGTCT	1151		
<i>M. smegmatis</i>	702737-704164	1161	GGGCGACTCTATCTGCTGGCGGCTGGGACTGCTGGTGGCGTTCGTGATCG	1210		
<i>M. tuberculosis</i>	353083-354501	1152	GGCTCAGCCCTATCTGGTAGCGGGG---TCCTGTTGGTGTTC-TACACC	1197		
<i>M. smegmatis</i>	702737-704164	1211	GCGATCGG---TACCAGGCGCGCTGTGGGCGCTGGCCGCGCTGCCGT	1256		
<i>M. tuberculosis</i>	353083-354501	1198	GCGACCGGACGCTATGTCGCCGCGTTCGGCGGGTGGTGGTGTAGCGGT	1247		
<i>M. smegmatis</i>	702737-704164	1257	GCTGTGCTGGTCTGGATCGTGGCGGCGCTCAACCGAAGATCGCTCGC	1306		
<i>M. tuberculosis</i>	353083-354501	1248	GCTCATGCTGGCTGGGTGTGGTGGCACTGAACCGGGCATCGCTTCGC	1297		
<i>M. smegmatis</i>	702737-704164	1307	CGGACACCTATTGCTGCCGATGCGCGCATGGTGGCTTCTCGCCACC	1356		
<i>M. tuberculosis</i>	353083-354501	1298	CGGAGAGCTACTGCTGCGCGCTGGCGGCTGCTGGGTGGTGGCGGCGC	1347		
<i>M. smegmatis</i>	702737-704164	1357	GGCCTCGACGCTCGCTGATCCCGGTGATGGCGCT-GCTGGTGGCGCTGT	1405		
<i>M. tuberculosis</i>	353083-354501	1348	GGGCTGGATGTTTCGTGATCCCCGTACGGC-CTACCTGGTGGGATTGT	1396		
<i>M. smegmatis</i>	702737-704164	1406	TCAGCCT-CGTGCTCGACAGGTGA	1428		
<i>M. tuberculosis</i>	353083-354501	1397	TC-GCTTGGGTGCTCAACAGATGA	1419		

Figura B1. Alineamiento de las secuencias del gen *eccD3* de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*. Secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI: *M. smegmatis* ID CP000480.1 con coordenadas de la 702,737 pb a la 704,164 pb y *M. tuberculosis* ID NC_000962.3 con coordenadas de la 352,083 pb a la 354,501 pb.

11.3. Anexo C. Ensayo de microdilución en placa con resazurina de diferentes fármacos.

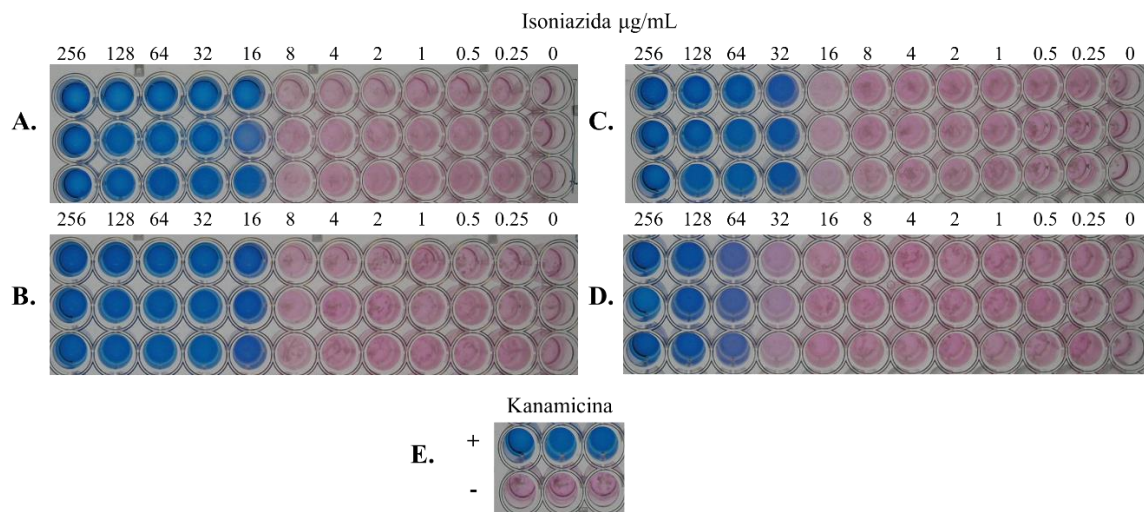


Figura C1. CMI de isoniazida *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*. Método de microdilución en placa con resazurina (REMA) utilizando diluciones seriadas para isoniazida (256 $\mu\text{g/mL}$ a 0.25 $\mu\text{g/mL}$). A. y B. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*; C. y D. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble; ambas cepas en ausencia A. y C. y presencia B. y D. de anhidrotetraciclina (ATc) a una concentración de 100 ng/mL. E. Cepa *M. smegmatis* mc² 155 wild type en presencia (signo positivo +) o ausencia (signo negativo -) de kanamicina a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$.

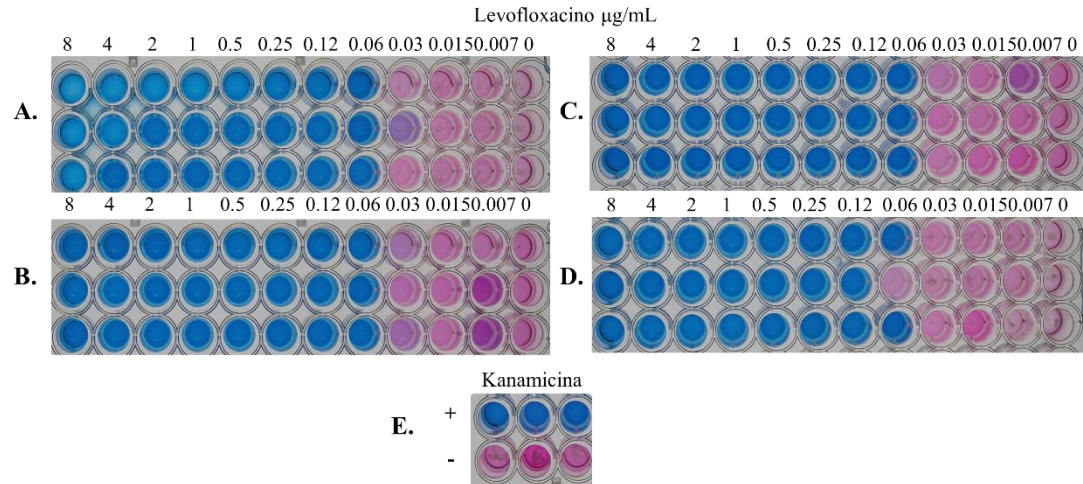


Figura C2. CMI de levofloxacin *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*. Método de microdilución en placa con resazurina (REMA) utilizando diluciones seriadas para isoniazida (8 $\mu\text{g/mL}$ a 0.007 $\mu\text{g/mL}$). A. y B. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*; C. y D. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble; ambas cepas en ausencia A. y C. y presencia B. y D. de anhidrotetraciclina (ATc) a una concentración de 100 ng/mL. E. Cepa *M. smegmatis* mc² 155 wild type en presencia (signo positivo +) o ausencia (signo negativo -) de kanamicina a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$.

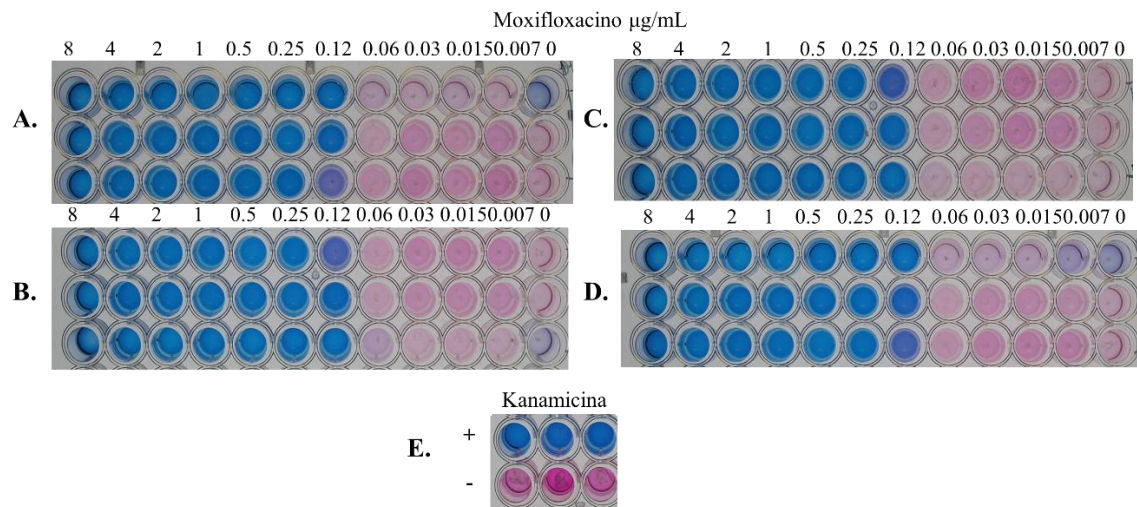


Figura C3. CMI de moxifloxacino *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*. Método de microdilución en placa con resazurina (REMA) utilizando diluciones seriadas para isoniazida (8 µg/mL a 0.007 µg/mL). A. y B. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*; C. y D. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble; ambas cepas en ausencia A. y C. y presencia B. y D. de anhidrotetraciclina (ATc) a una concentración de 100 ng/mL. E. Cepa *M. smegmatis* mc² 155 wild type en presencia (signo positivo +) o ausencia (signo negativo -) de kanamicina a una concentración de 20 µg/mL.

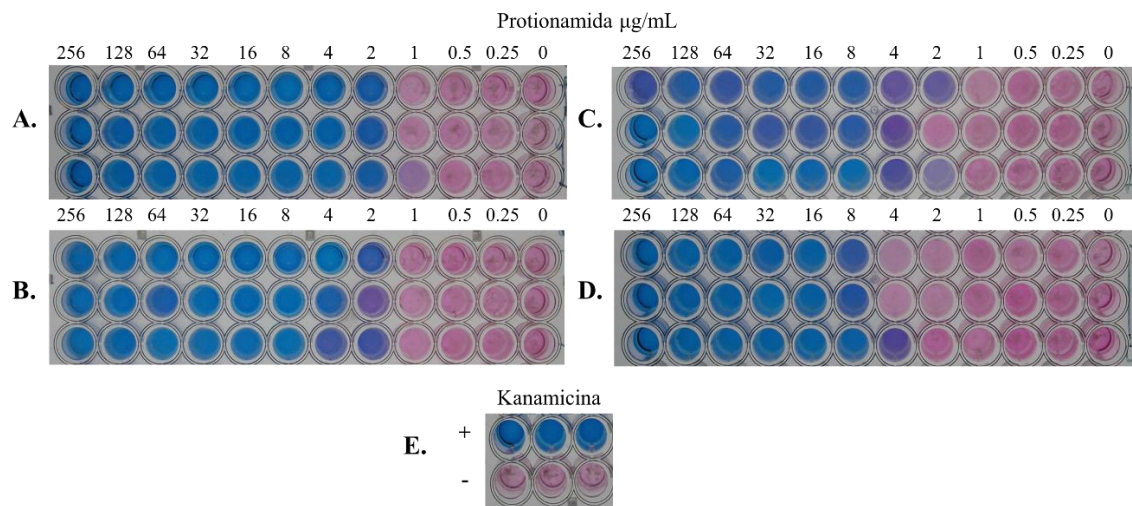


Figura C4. CMI de protonamida *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*. Método de microdilución en placa con resazurina (REMA) utilizando diluciones seriadas para isoniazida (256 $\mu\text{g/mL}$ a 0.25 $\mu\text{g/mL}$). A. y B. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3*; C. y D. cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble; ambas cepas en ausencia A. y C. y presencia B. y D. de anhidrotetraciclina (ATc) a una concentración de 100 ng/mL. E. Cepa *M. smegmatis* mc² 155 wild type en presencia (signo positivo +) o ausencia (signo negativo -) de kanamicina a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$.

11.4. Anexo D. Curvas de crecimiento de la cepa de *M. smegmatis* PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de diferentes concentraciones de rifampicina.

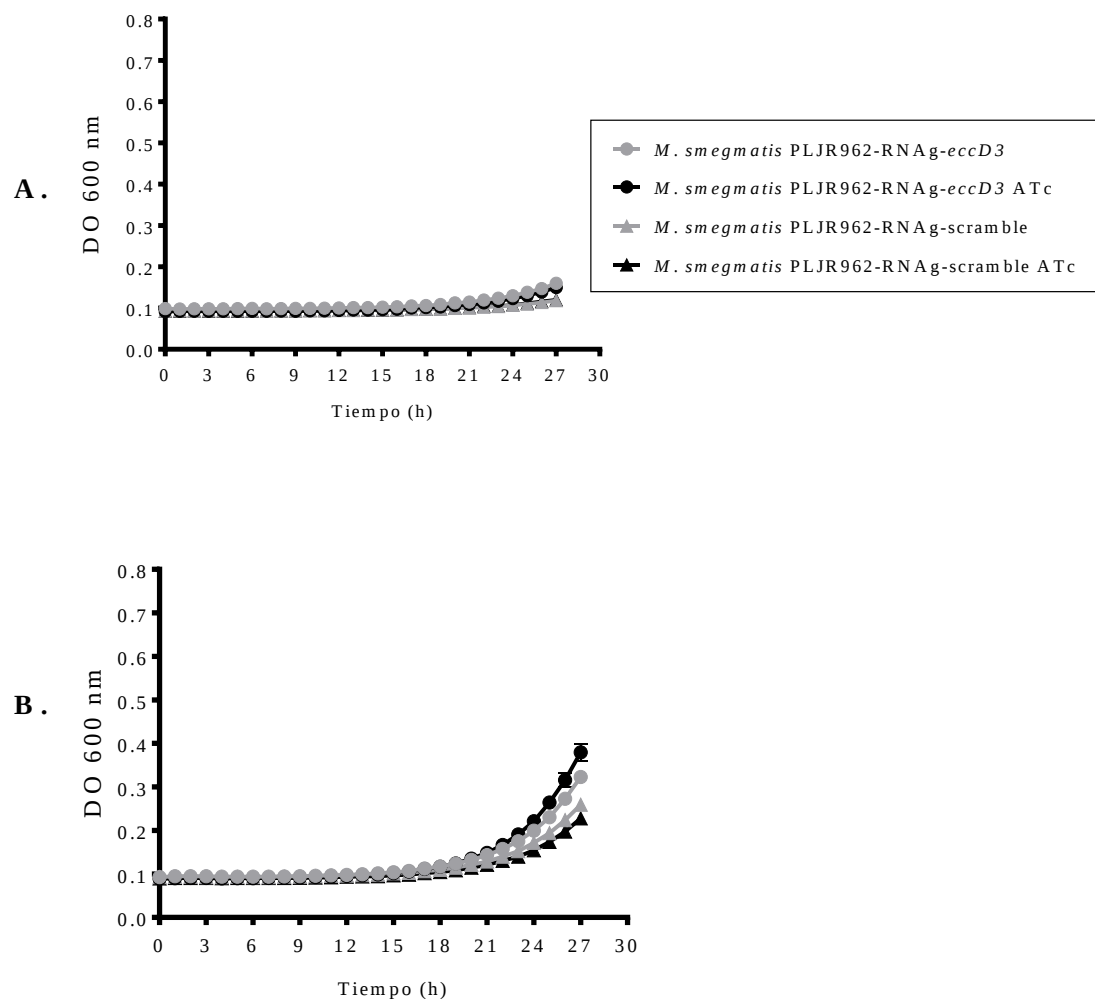


Figura D1. Curva de crecimiento de *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de rifampicina. Curva de crecimiento de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* (marcada con círculos) y de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble (marcada con triángulos) en ausencia (línea color gris) o presencia (línea color negro) de ATc una concentración de 100 ng/mL, una concentración final de A. 3.2 µg/mL y B. 1.6 µg/mL y 20µg/mL de kanamicina. Se realizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas para comparar el crecimiento en diferentes concentraciones de fármaco entre las cepas y entre la misma cepa en presencia o ausencia de ATc. Las barras con el asterisco muestran las cepas que presentaron diferencias significativas respecto a su crecimiento con un valor significativo de menor de $p = 0.05$.

11.5. Anexo E. Curva de crecimiento de la cepa de *M. smegmatis* PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de diferentes concentraciones de linezolid.

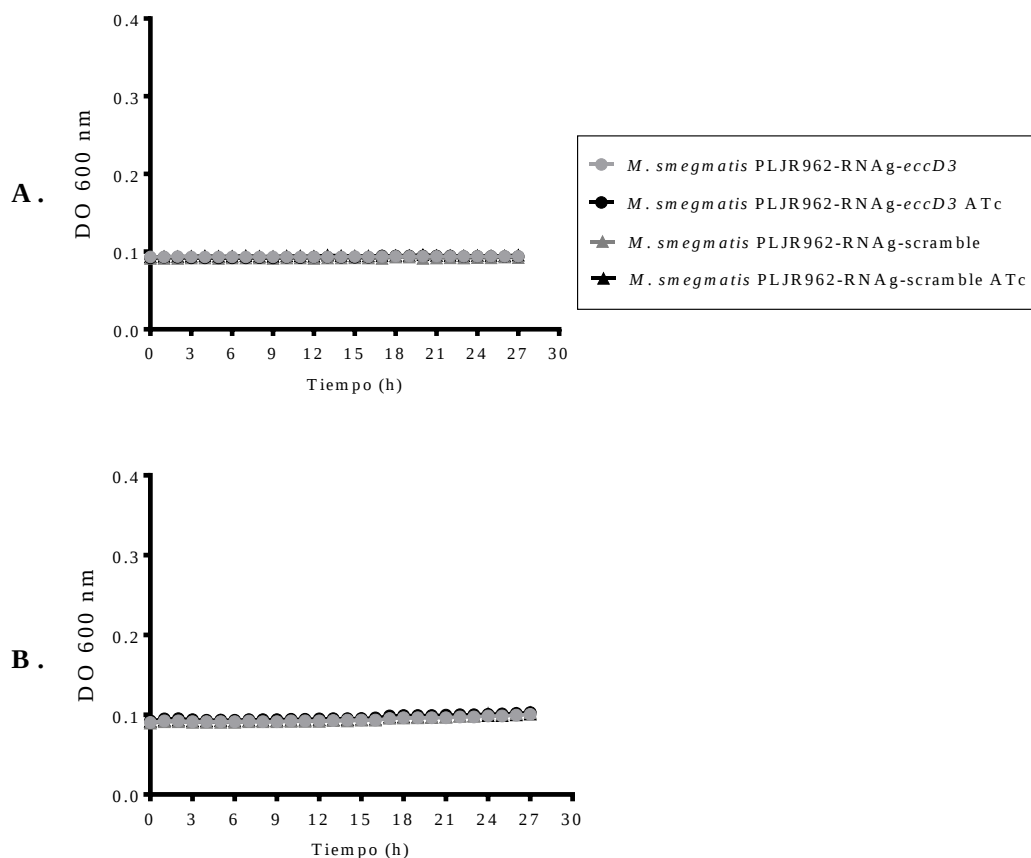


Figura E1. Curva de crecimiento de *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de linezolid. Curva de crecimiento de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* (marcada con círculos) y de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble (marcada con triángulos) en ausencia (línea color gris) o presencia (línea color negro) de ATc una concentración de 100 ng/mL, una concentración final de A. 2 µg/mL y B. 1 µg/mL y 20µg/mL de kanamicina. Se realizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas para comparar el crecimiento en diferentes concentraciones de fármaco entre las cepas y entre la misma cepa en presencia o ausencia de ATc. Las barras con el asterisco muestran las cepas que presentaron diferencias significativas respecto a su crecimiento con un valor significativo de menor de $p = 0.05$.

11.6. Anexo F. Curva de crecimiento de la cepa *M. smegmatis* PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de diferentes concentraciones de bedaquilina.

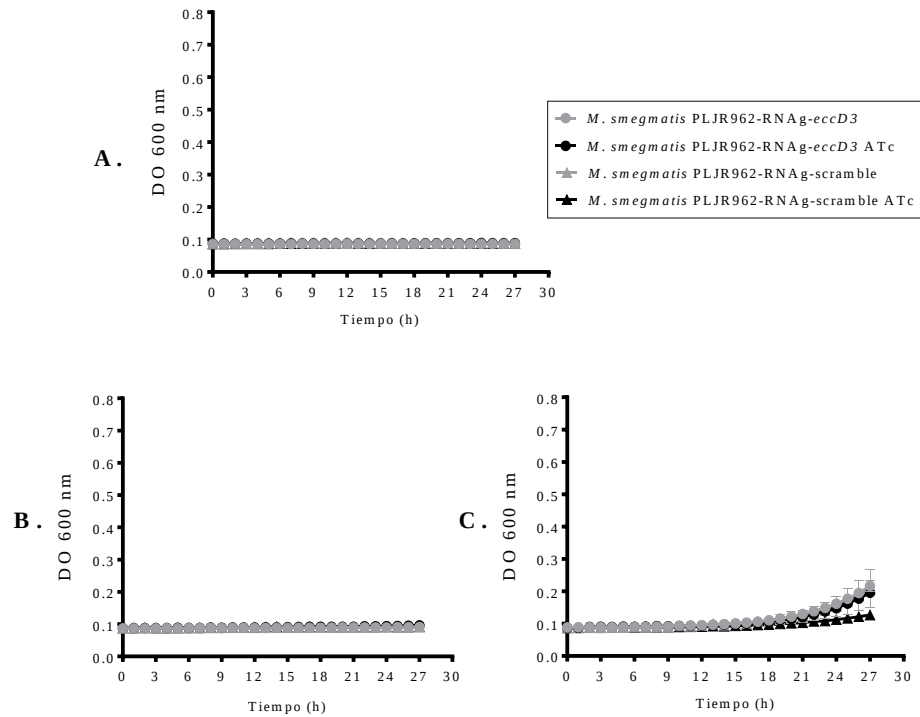


Figura F1. Curva de crecimiento de *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de bedaquilina. Curva de crecimiento de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* (marcada con círculos) y de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble (marcada con triángulos) en ausencia (línea color gris) o presencia (línea color negro) de ATc una concentración de 100 ng/mL, una concentración final de A. 0.192 µg/mL, B. 0.096 µg/mL y C. 0.048 µg/mL de bedaquilina y 20µg/mL de kanamicina. Se realizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas para comparar el crecimiento en diferentes concentraciones de fármaco entre las cepas y entre la misma cepa en presencia o ausencia de ATc. Las barras con el asterisco muestran las cepas que presentaron diferencias significativas respecto a su crecimiento con un valor significativo de menor de $p = 0.05$.

11.7. Anexo G. Tablas comparativas sobre la calidad de los modelos 6UMM y 6SGW obtenidos de las proteínas del sistema de secreción ESX3.

Tabla G1.1. Calidad de los modelos de las proteínas del protómero 1 del sistema de secreción ESX3.

Protómero 1 del sistema de secreción ESX3								
Proteína	Modelado a partir del PDB	Mol Clash Probity Score	Clash Score	Ramachandran outliers	Similitud de favoured secuencia	Identidad de secuencia	Cobertura	
EccE3	6UMM	1.87	9.31	1.38 %	94.48 %	0.41	46.62%	0.85
EccE3	6SGW	2.33	7.52	2.41 %	87.97 %	0.42	50.21 %	0.72
EccD3_1	6UMM	1.77	6.64	1.94 %	93.98 %	0.47	62.24%	0.93
EccD3_1	6SGW	2.12	5.30	4.15 %	88.43 %	0.47	62.14 %	0.89
EccD3_2	6UMM	1.21	1.88	0.65 %	96.13 %	0.47	63.39%	0.95
EccD3_2	6SGW	1.68	3.95	1.74 %	91.74 %	0.47	63.27 %	0.93
EccB3 *	6UMM	1.00	0.75	0 %	96.20 %	0.56	81.48 %	0.15
EccB3 *	6SGW	1.16	0.76	0 %	93.67 %	0.56	82.72 %	0.15
EccC3 **	6UMM	1.93	5.89	3.75 %	87.75 %	0.51	67.84 %	0.26
EccC3**	6SGW	2.09	6.39	2.51 %	84.42 %	0.51	69.05 %	0.25

EccD_1, es la conformación corta, EccD3_2, es la conformación extendida. * EccB3, es solo el dominio transmembranal de la proteína. ** EccC3, se refiere al dominio de tallo y dominio sin función conocida.

Tabla G1.2. Calidad de los modelos de las proteínas del protómero 1 del sistema de secreción ESX3.

Valores Z- QMEAN de las proteínas del protómero 1							
Proteína	Modelado a partir del PDB	QMEANDis Co Global	QMEAN	CB	Todos los átomos	Solvatación	Torsión
EccE3	6UMM	0.72 ± 0.05	-2.60	-1.71	-0.25	-0.37	-2.30
EccE3	6SGW	0.62 ± 0.05	-5.81	-1.54	-1.25	-1.95	-5.17
EccD3_1	6UMM	0.63 ± 0.05	-4.82	-3.69	1.17	-0.54	-4.23
EccD3_1	6SGW	0.62 ± 0.05	-6.58	-4.07	0.36	-2.47	-5.35
EccD3_2	6UMM	0.69 ± 0.05	-2.84	-3.03	1.87	-0.44	-2.35
EccD3_2	6SGW	0.65 ± 0.05	-4.49	-4.13	0.08	-1.79	-3.36
EccB3 *	6UMM	0.62 ± 0.10	-2.29	-1.34	1.58	-1.47	-1.58
EccB3 *	6SGW	0.62 ± 0.10	-3.59	-2.61	0.75	-1.86	-2.40
EccC3 **	6UMM	0.64 ± 0.05	-4.16	-1.93	-2.64	-2.68	-3.09
EccC3**	6SGW	0.61 ± 0.05	-6.07	-3.91	-2.95	-4.31	-4.19

EccD_1, es la conformación corta, EccD3_2, es la conformación extendida. * EccB3, es solo el dominio transmembranal de la proteína. ** EccC3, se refiere al dominio de tallo y dominio sin función conocida.

Tabla G2.1. Calidad de los modelos de las proteínas del protómero 2 del sistema de secreción ESX3.

Protómero 2 del sistema de secreción ESX3							
Proteína	Modelado a partir del PDB	Mol Probity Score	Clash Score	Ramachandran outliers	Similitud favoured de secuencia	Identidad de secuencia	Cobertura
EccE3	6UMM	1.15	0.66	2.07 %	95.17 %	0.41	46.62 %
EccE3	6SGW	2.09	7.07	2.75 %	87.63 %	0.42	50.21 %
EccD3_1	6UMM	1.82	6.64	2.15 %	92.90 %	0.47	62.24 %
EccD3_1	6SGW	1.90	4.86	3.28 %	91.27 %	0.47	62.14 %
EccD3_2	6UMM	1.61	3.32	0.86 %	94.84 %	0.47	63.39 %
EccD3_2	6SGW	1.63	3.51	1.30 %	93.48 %	0.47	63.27 %
EccB3 *	6UMM	0.72	0	0 %	98.31 %	0.56	81.97 %
EccB3 *	6SGW	0.50	0	0 %	100 %	0.56	81.36 %
EccC3 **	6UMM	1.90	4.77	2.75 %	88.50 %	0.51	67.84 %
EccC3**	6SGW	2.19	5.91	4.27 %	84.42 %	0.51	67.80 %

EccD_1, es la conformación corta, EccD3_2, es la conformación extendida. * EccB3, es solo el dominio transmembranal de la proteína. ** EccC3, se refiere al dominio de tallo y dominio sin función conocida.

Tabla G2.2. Calidad de los modelos de las proteínas del protómero 2 del sistema de secreción ESX3.

Valores Z- QMEAN de las proteínas del protómero 2							
Proteína	Modelado a partir del PDB	QMEANDis Co Global	QMEAN	CB	Todos los átomos	Solvatación	Torsión
EccE3	6UMM	0.71 ± 0.05	-2.93	-1.27	-0.35	-0.56	-2.67
EccE3	6SGW	0.61 ± 0.05	-5.41	-2.15	-2.20	-2.38	-4.43
EccD3_1	6UMM	0.65 ± 0.05	-4.32	-3.38	1.02	-0.25	-3.85
EccD3_1	6SGW	0.63 ± 0.05	-5.55	-4.00	-0.29	-3.07	-4.06
EccD3_2	6UMM	0.68 ± 0.05	-3.50	-3.64	1.68	-0.78	-2.81
EccD3_2	6SGW	0.65 ± 0.05	-4.62	-3.41	-0.10	-2.08	-3.53
EccB3 *	6UMM	0.78 ± 0.11	-2.05	-1.60	1.65	-0.82	-1.60
EccB3 *	6SGW	0.68 ± 0.11	-2.24	-1.92	1.27	-0.72	-1.73
EccC3 **	6UMM	0.65 ± 0.05	-4.92	-2.63	-1.90	-3.48	-3.55
EccC3**	6SGW	0.61 ± 0.05	-6.75	-4.43	-2.72	-4.47	-4.78

EccD_1, es la conformación corta, EccD3_2, es la conformación extendida. * EccB3, es solo el dominio transmembranal de la proteína. ** EccC3, se refiere al dominio de tallo y dominio sin función conocida.

11.8. Anexo H. Gráficas de los resultados del ΔG obtenido del acoplamiento molecular de la interacción fármaco-proteína.

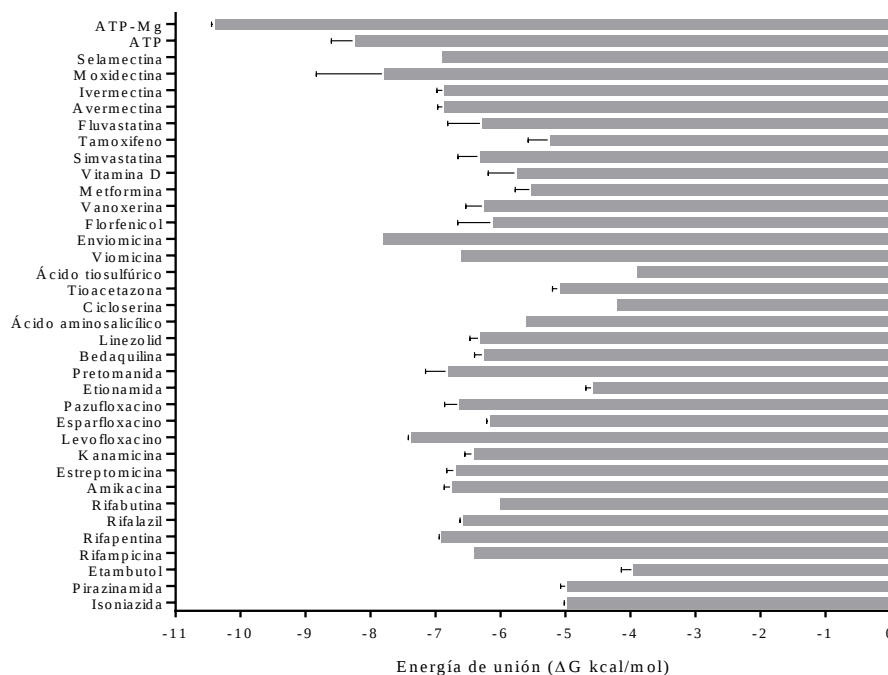


Figura H1. Acoplamiento molecular entre el sitio del dominio ATPasa III de la proteína EccC3 *M. tuberculosis* y los fármacos seleccionados. Gráfica que representa el promedio del cambio de energía libre (ΔG kcal/mol) de 10 repeticiones de cada simulación de la interacción del fármaco con la proteína y su desviación estándar. Se agregó como control del método la molécula de ATP más el magnesio y otro control con únicamente la molécula de ATP. El acoplamiento molecular se realizó contra los 34 fármacos seleccionados.

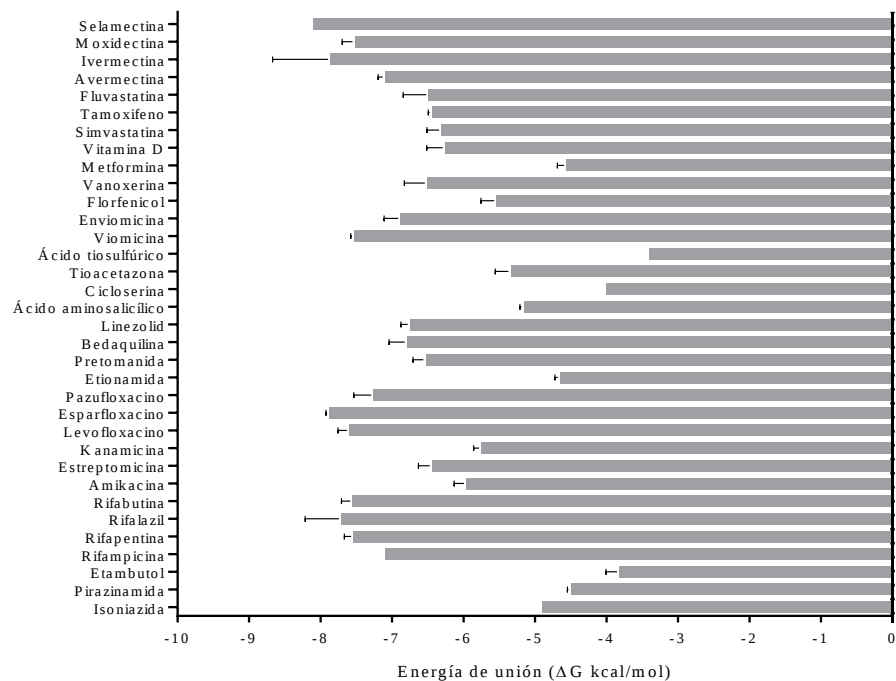


Figura H2. Acoplamiento molecular entre el sitio EccB3 de *M. tuberculosis* y los fármacos seleccionados. Gráfica que representa el promedio del cambio de energía libre (ΔG kcal/mol) de 10 repeticiones de cada simulación de la interacción del fármaco con la proteína y su desviación estándar. El acoplamiento molecular se realizó contra los 34 fármacos seleccionados.

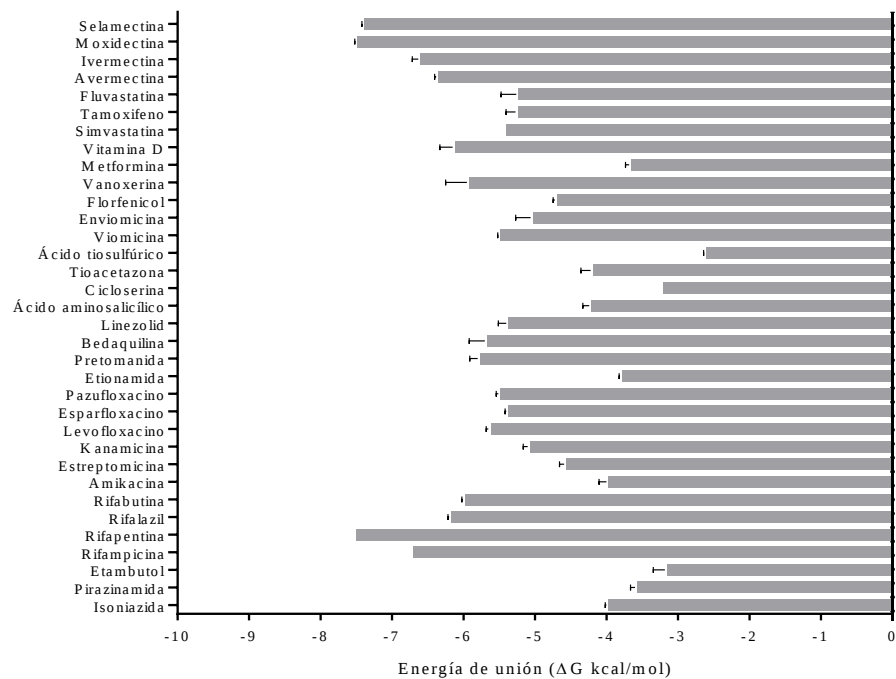


Figura H3. Acoplamiento molecular entre el sitio EccD3 N-terminal de *M. tuberculosis* y los fármacos seleccionados. Gráfica que representa el promedio del cambio de energía libre (ΔG kcal/mol) de 10 repeticiones de cada simulación de la interacción del fármaco con la proteína y su desviación estándar. El acoplamiento molecular se realizó contra los 34 fármacos seleccionados.

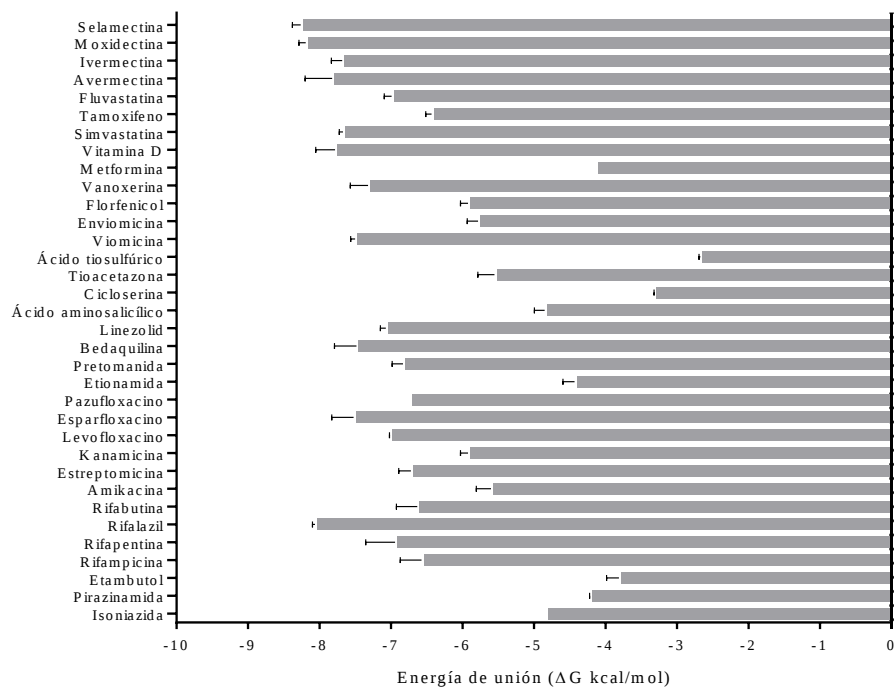


Figura H4. Acoplamiento molecular entre el sitio EccD3 C-terminal de *M. tuberculosis* y los fármacos seleccionados. Gráfica que representa el promedio del cambio de energía libre (ΔG kcal/mol) de 10 repeticiones de cada simulación de la interacción del fármaco con la proteína y su desviación estándar. El acoplamiento molecular se realizó contra los 34 fármacos seleccionados.

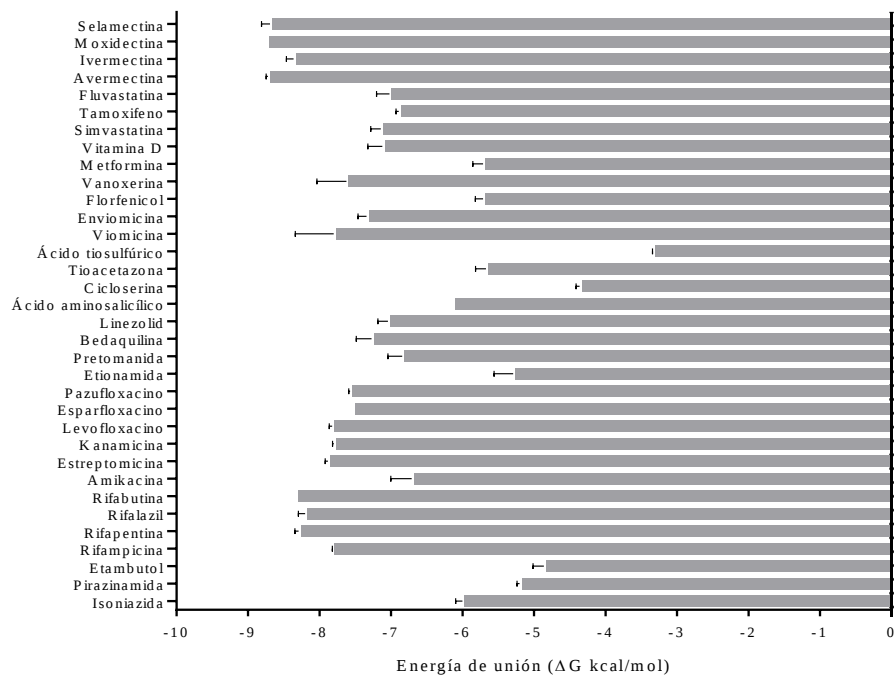


Figura H5. Acoplamiento molecular entre el sitio ESX3 protómero 1 de *M. tuberculosis* y los fármacos seleccionados. Gráfica que representa el promedio del cambio de energía libre (ΔG kcal/mol) de 10 repeticiones de cada simulación de la interacción del fármaco con la proteína y su desviación estándar. El acoplamiento molecular se realizó contra los 34 fármacos seleccionados.

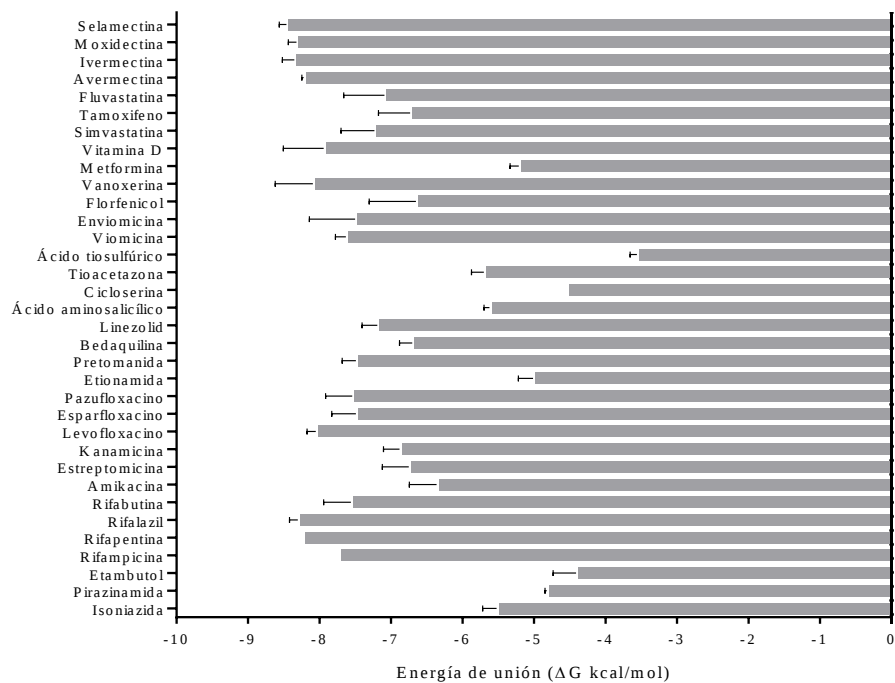


Figura H6. Acoplamiento molecular entre el sitio ESX3 protómero 2 de *M. tuberculosis* y los fármacos seleccionados. Gráfica que representa el promedio del cambio de energía libre (ΔG kcal/mol) de 10 repeticiones de cada simulación de la interacción del fármaco con la proteína y su desviación estándar. El acoplamiento molecular se realizó contra los 34 fármacos seleccionados.

11.9. Anexo I. Curvas de crecimiento de la cepa *M. smegmatis* PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de diferentes concentraciones de ivermectina.

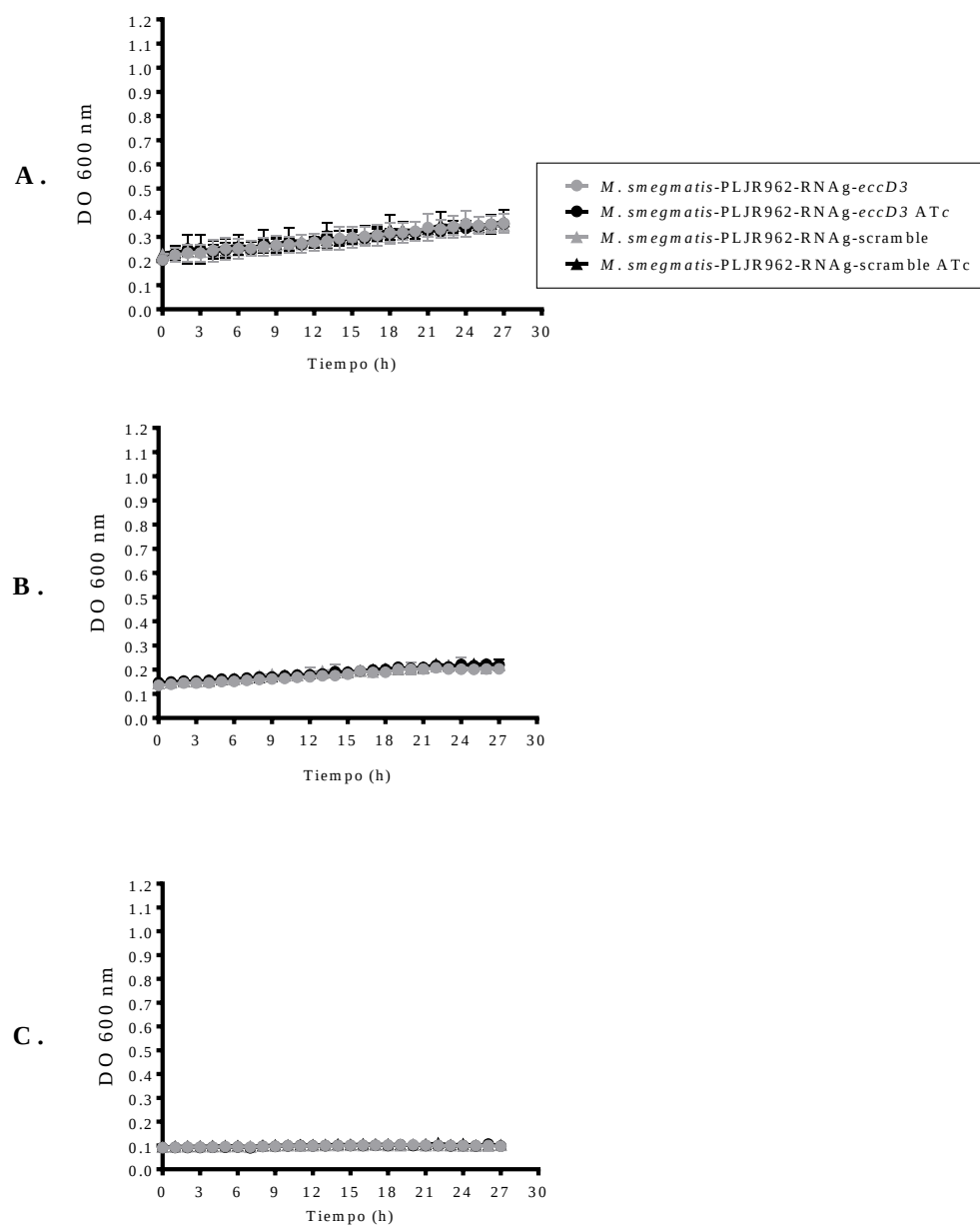


Figura I1. Curva de crecimiento de *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* en presencia de ivermectina. Curva de crecimiento de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-*eccD3* (marcada con círculos) y de la cepa *M. smegmatis*-PLJR962-RNAg-scramble (marcada con triángulos) en ausencia (línea color gris) o presencia (línea color negro) de ATc una concentración de 100 ng/mL, una concentración final de A. 512 µg/mL, B. 256 µg/mL y C. 128 µg/mL de ivermectina y 20 µg/mL de kanamicina. Se realizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas para comparar el crecimiento en diferentes concentraciones de fármaco entre las cepas y entre la misma cepa en presencia o ausencia de ATc.

11.10. Anexo J. Productos de difusión de la ciencia. Asistencia a congresos y publicaciones.



Presentación de cartel XXIII Foro Delegacional de Investigación del IMSS, Monterrey, Nuevo León, 2019.



CERTIFICATE

The study **EccD3 in silico analysis as a potential Mycobacterium drug target** was presented in a video format by **Ana Laura Granados Tristan** in the poster session of X Meeting of the Latin American Society of Tuberculosis and other Mycobacteriosis. The X SLAM-TB meeting held in the ZOOM virtual platform from April 28 to 30, 2021.

Mexico city, May 3, 2021.

Rogelio Hernández Pando
 President of SLAM-TB

INSTITUTIONAL SUPPORTERS:



UNIVERSIDAD
NACIONAL
 DE COLOMBIA

Print - FURG

Projeto Institucional de Internacionalização
 da Universidade Federal do Rio Grande - FURG



CAPES/Print - FURG



INSTITUTO NACIONAL DE
 CIENCIAS MÉDICAS
 Y NUTRICIÓN
 SALVADOR ZUBIRÁN



UANL
 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Presentación de cartel en la Decimo Reunión de la Sociedad Latinoamérica de Tuberculosis y otras Micobacteriosis, Virtual, 2021.



Presentación de cartel en el World Microbe Forum, de la Sociedad Americana de Microbiología, Virtual, 2021.



Certificate of Participation & Presentation

INTERNATIONAL SOCIETY FOR COMPUTATIONAL BIOLOGY

July 14, 2022

Ana Laura Granados Tristán
Monterrey, Nuevo León, México

Subject: CERTIFICATION OF PARTICIPATION AND PRESENTATION

On behalf of the Organizing Committee for ISMB 2022 held in Madison, Wisconsin, USA, thank you for your participation and presentation of "*Analysis of EccD3, ESX3 secretion system component as Mycobacterium tuberculosis drug target*"

This letter certifies that Ana Laura Granados Tristán was a participant at ISMB 2022 and presented the above research.

ISMB 2022, the 30th annual conference, was hosted by the International Society for Computational Biology (ISCB) July 10 - 14, 2022. The ISMB conference has grown to become the world's largest bioinformatics/computational biology conference.

Please visit <https://www.iscb.org/ismb2022> for additional conference information.

Yours sincerely,

A handwritten signature in black ink that reads 'Diane E Kovats'.

Diane E. Kovats, CAE, CMP, DES
Chief Executive Officer
International Society for Computational Biology (ISCB)
e: dkovats@iscb.org
www.iscb.org

Presentación de cartel en el Treintava Conferencia Anual de Sistemas Inteligentes para Biología Molecular (ISMB), de la Sociedad Internacional de Biología Computacional (ISCB), Virtual, 2022.



Sociedad Mexicana de
Bioquímica A.C.

65
años
1957-2022

SACRAMENTO NO. 413
COL. INSURGENTES BORJA
DEL BENITO JUÁREZ
CP. 03100
CDMX
TEL. (55) 98225742
WWW.SMB.ORG.MX
FACEBOOK:
facebook.com/RedSMB

MEMORIA DIRECTIVA 2021-2023

PRESIDENTA

Dra. Suselad María Teresa Hernández
Sotomayor

VICEPRESIDENTE

Dra. Agustín Guerrero Hernández

SECRETARÍA TECNICA

Dra. Bertha María Josefina González Pedraza

SUBSECRETARÍA TECNICA

Dra. María de Lourdes David Cortez

EDICIÓN FUNDACIONES

Dra. Bárbara Aránguez Lucero

Dra. Edmundo Calva Cuatrecasas

Dra. Guillermo Carvajal Sandoval

Dra. Joaquín Cervantes

Dra. Carlos del Río Estrella

Dra. Silvestre Frías Fournier

Dra. Mario García Hernández

Dra. Jesús Guzmán García

Dra. Jesús Karam Rodríguez

Dra. José Leguía García

Dra. Guillermo Macías Rodríguez

Dra. Raúl Orobosa Velazquez

Dra. Silvestre G. Pardo Córdova

Dra. Guillermo Salazar Arredondo

Se otorga la presente

CONSTANCIA a:

Ana Laura Granados Tristán

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Analysis of EccD3, ESX3 secretion system component
as *Mycobacterium tuberculosis* drug target**

Por: Ana Laura Granados Tristán, Mauricio Carrillo Tripp,
Carlos Eduardo Hernández Luna, Aldo Herrera Rodolfo,
Laura Adiene González Escalante, Beatriz Silva Ramírez,
Brenda Leticia Escobedo Guajardo, Mario Bermúdez de León,
Katia Peñuelas Urquides

En la modalidad de cartel durante el
XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica
16 - 21 de octubre de 2022, Mérida, Yucatán

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dra. Teresa Hernández Sotomayor
Presidenta



Presentación de cartel en el XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica, Mérida, Yucatán, 2022.



Presentación de cartel en el Foro Delegacional de Investigación del IMSS, Virtual, 2023.

Role of *esxG* and *esxH* Genes in Drug-Resistant *Mycobacterium*

Ana Laura Granados-Tristán,^{1,2,*} Alejandra Borrego-Loya,^{1,2,*} Laura Adlene González-Escalante,¹
Gladis Janeth Esquivel-Lucio,^{1,2} Dulce Yesenia Márquez-Urbe,^{1,2} Joyce Rigal-Leal,^{1,2}
Rene J. Robles-González,² Ana Leticia Arriaga-Guerrero,^{1,2} Beatriz Silva-Ramírez,³
Carlos Eduardo Hernández-Luna,² Juan Francisco Contreras-Cordero,² Licet Villarreal-Treviño,²
Roberto Mercado Hernández,² Mario Bermúdez De León,¹ and Katia Peñuelas-Urquides¹

Tuberculosis drug resistance (DR) is a global problem that is not fully elucidated. Previously, overexpression of *esxG* and *esxH* genes was reported in a multidrug-resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* isolate compared with a reference H37Rv strain. To evaluate the roles of *esxG* and *esxH* in DR, analysis of their regulatory and coding sequences in sensitive and resistant strains was performed, and the expression levels of their transcriptional regulators IdeR, Zur, and MntR were evaluated. *esxG* and *esxH* were expressed heterologously using mycobacterial constructs, and the orthologs *Msmeg_0620* and *Msmeg_0621* were attenuated in *Mycobacterium smegmatis* by antisense knockdown. We found no differences in the regulatory and coding sequences of *esxG* and *esxH* between the sensitive strain and the MDR isolate. Expression analysis of transcriptional regulators showed that *ideR* was upregulated in isoniazid (INH)-resistant isolates; in addition, growth inhibition of the *M. smegmatis* strain was observed in the presence of rifampicin (RIF) and INH when *esxG* and *esxH* were expressed heterologously, while faster growth in the presence of RIF was observed when the orthologs were attenuated. In conclusion, the expression of *esxG* and *esxH* altered the growth of *Mycobacterium* in the presence of INH and RIF, suggesting a potential association with DR.

Keywords: *esxG-esxH*, *Mycobacterium*, drug resistance, *M. smegmatis*

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahams, K. A. & Besra, G. S. 2021. Synthesis and recycling of the mycobacterial cell envelope. *Current Opinion in Microbiology*, 60, 58-65.
- Almeida Da Silva, P. E. & Palomino, J. C. 2011. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother*, 66, 1417-30.
- Ashford, D., Whitney, E., Raghunathan, P. & Cosivi, O. 2001. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 20, 325-337.
- Bolscher, N., Hoppenbrouwers, K. & Burgmeijer, R. 2007. Tuberculosis.
- Bottai, D., Serafini, A., Cascioferro, A., Brosch, R. & Manganeli, R. 2014. Targeting type VII/ESX secretion systems for development of novel antimycobacterial drugs. *Curr Pharm Des*, 20, 4346-56.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G. & Kremer, K. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 99, 3684-3689.
- Brown-Elliott, B. A. & Wallace Jr, R. J. 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical microbiology reviews*, 15, 716-746.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. & Madden, T. L. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10, 1-9.
- Carugo, O. & Pongor, S. 2001. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein science*, 10, 1470-1473.
- Cave, A. & Demonstrator, A. 1939. The evidence for the incidence of tuberculosis in ancient Egypt. *British Journal of Tuberculosis*, 33, 142-152.
- Cesa, L. C., Mapp, A. K. & Gestwicki, J. E. 2015. Direct and propagated effects of small molecules on protein-protein interaction networks. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 119.

- Chaturvedi, V., Dwivedi, N., Tripathi, R. P. & Sinha, S. 2007. Evaluation of *Mycobacterium smegmatis* as a possible surrogate screen for selecting molecules active against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of general and applied microbiology*, 53, 333-337.
- Chhotaray, C., Tan, Y., Mugweru, J., Islam, M. M., Hameed, H. A., Wang, S., Lu, Z., Wang, C., Li, X. & Tan, S. 2018. Advances in the development of molecular genetic tools for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Genetics and Genomics*, 45, 281-297.
- Cinaroglu, S. S. & Timucin, E. 2019. Comparative Assessment of Seven Docking Programs on a Nonredundant Metalloprotein Subset of the PDBbind Refined. *J Chem Inf Model*, 59, 3846-3859.
- Cossar, P. J., Lewis, P. J. & Mccluskey, A. 2020. Protein-protein interactions as antibiotic targets: A medicinal chemistry perspective. *Medicinal research reviews*, 40, 469-494.
- Delogu, G., Sali, M. & Fadda, G. 2013. The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 5.
- Dippenaar, A., Goossens, S. N., Grobbelaar, M., Oostvogels, S., Cuypers, B., Laukens, K., Meehan, C. J., Warren, R. M. & Van Rie, A. 2022. Nanopore sequencing for mycobacterium tuberculosis: A critical review of the literature, new developments, and future opportunities. *Journal of Clinical Microbiology*, 60, e00646-21.
- Do, T. T., Rodríguez-Beltrán, J., Cebrián-Sastre, E., Rodríguez-Rojas, A., Castañeda-García, A. & Blázquez, J. 2022. Inactivation of a New Potassium Channel Increases Rifampicin Resistance and Induces Collateral Sensitivity to Hydrophilic Antibiotics in *Mycobacterium smegmatis*. *Antibiotics*, 11, 509.
- Donoghue, H. D. 2009. Human tuberculosis—an ancient disease, as elucidated by ancient microbial biomolecules. *Microbes and infection*, 11, 1156-1162.
- Dragset, M. S., Poce, G., Alfonso, S., Padilla-Benavides, T., Ioerger, T. R., Kaneko, T., Sacchettini, J. C., Biava, M., Parish, T., Arguello, J. M., Steigedal, M. & Rubin, E. J. 2015. A novel antimycobacterial compound acts as an intracellular iron chelator. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 2256-64.

- Dulberger, C. L., Rubin, E. J. & Boutte, C. C. 2020. The mycobacterial cell envelope—a moving target. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 47-59.
- El-Saber Batiha, G., Alqahtani, A., Ilesanmi, O. B., Saati, A. A., El-Mleeh, A., Hetta, H. F. & Magdy Beshbishy, A. 2020. Avermectin derivatives, pharmacokinetics, therapeutic and toxic dosages, mechanism of action, and their biological effects. *Pharmaceuticals*, 13, 196.
- Famelis, N., Rivera-Calzada, A., Degliesposti, G., Wingender, M., Mietrach, N., Skehel, J. M., Fernandez-Leiro, R., Bottcher, B., Schlosser, A., Llorca, O. & Geibel, S. 2019. Architecture of the mycobacterial type VII secretion system. *Nature*, 576, 321-325.
- Faulkner, V., Cox, A. A., Goh, S., Van Bohemen, A., Gibson, A. J., Liebster, O., Wren, B. W., Willcocks, S. & Kendall, S. L. 2021. Re-sensitization of Mycobacterium smegmatis to Rifampicin Using CRISPR Interference Demonstrates Its Utility for the Study of Non-essential Drug Resistance Traits. *Frontiers in microbiology*, 11, 619427.
- Feng, S., Hong, Z., Zhang, G., Li, J., Tian, G.-B., Zhou, H. & Huang, X. 2021. Mycobacterium PPE31 contributes to host cell death. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 629836.
- Feng, S., Liu, Y., Liang, W., El-Sayed Ahmed, M. a. E.-G., Zhao, Z., Shen, C., Roberts, A. P., Liang, L., Liao, L. & Zhong, Z. 2020. Involvement of transcription elongation factor GreA in Mycobacterium viability, antibiotic susceptibility, and intracellular fitness. *Frontiers in microbiology*, 11, 413.
- Gey Van Pittius, N. C., Gamielien, J., Hide, W., Brown, G. D., Siezen, R. J. & Beyers, A. D. 2001. The ESAT-6 gene cluster of Mycobacterium tuberculosis and other high G+ C Gram-positive bacteria. *Genome biology*, 2, 1-18.
- Golden, M. P. & Vikram, H. R. 2005. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *American family physician*, 72, 1761-1768.
- Gonzalez-Escalante, L., Penuelas-Urquides, K., Said-Fernandez, S., Silva-Ramirez, B. & Bermudez De Leon, M. 2015. Differential expression of putative drug resistance genes in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 362, fnv194.

- Gordien, A. Y., Gray, A. I., Franzblau, S. G. & Seidel, V. 2009. Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L.(Cupressaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 126, 500-505.
- Granados-Tristán, A. L., Borrego-Loya, A., González-Escalante, L. A., Esquivel-Lucio, G. J., Márquez-Urbe, D. Y., Rigal-Leal, J., Robles-González, R. J., Arriaga-Guerrero, A. L., Silva-Ramírez, B. & Hernández-Luna, C. E. 2020. Role of *esxG* and *esxH* Genes in Drug-Resistant Mycobacterium. *Microbial Drug Resistance*, 26, 1279-1290.
- Guedes, I. A., De Magalhaes, C. S. & Dardenne, L. E. 2014. Receptor-ligand molecular docking. *Biophys Rev*, 6, 75-87.
- Gupta, R. S., Lo, B. & Son, J. 2018. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus Mycobacterium into an emended genus Mycobacterium and four novel genera. *Frontiers in microbiology*, 9, 67.
- Gygli, S. M., Borrell, S., Trauner, A. & Gagneux, S. 2017. Antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS microbiology reviews*, 41, 354-373.
- Hamada, M., Shibata, C., Sakurai, K., Hosoyama, A., Oji, S., Teramoto, K. & Tamura, T. 2016. Reclassification of *Amycolicococcus subflavus* as *Hoyosella subflava* comb. nov. and emended descriptions of the genus *Hoyosella* and *Hoyosella altamirensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 4711-4715.
- Hecht, N., Becher, M., Korman, M., Vishkautzan, M. & Gur, E. 2020. Inter-and intramolecular regulation of protein depupylation in Mycobacterium smegmatis. *The FEBS Journal*, 287, 4389-4400.
- Hibbs, R. E. & Gouaux, E. 2011. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*, 474, 54-60.
- Houben, E. N., Bestebroer, J., Ummels, R., Wilson, L., Piersma, S. R., Jimenez, C. R., Ottenhoff, T. H., Luirink, J. & Bitter, W. 2012. Composition of the type VII secretion system membrane complex. *Mol Microbiol*, 86, 472-84.
- Iacobino, A., Fattorini, L. & Giannoni, F. 2020. Drug-resistant tuberculosis 2020: where we stand. *Applied Sciences*, 10, 2153.

- Jeong, B., Kim, J. K., Bae, T. & Park, I. 2020. Effect of Photodynamic Therapy Enhanced by Methylene Blue on Drug-resistant *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology and Virology*, 50, 235-245.
- Khan, A. & Sarkar, D. 2008. A simple whole cell based high throughput screening protocol using *Mycobacterium bovis* BCG for inhibitors against dormant and active tubercle bacilli. *Journal of microbiological methods*, 73, 62-68.
- Korycka-Machała, M., Pawełczyk, J., Borówka, P., Dziadek, B., Brzostek, A., Kawka, M., Bekier, A., Rykowski, S., Olejniczak, A. B. & Strapagiel, D. 2020. PPE51 is involved in the uptake of disaccharides by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cells*, 9, 603.
- Kozakov, D., Hall, D. R., Chuang, G. Y., Cencic, R., Brenke, R., Grove, L. E., Beglov, D., Pelletier, J., Whitty, A. & Vajda, S. 2011. Structural conservation of druggable hot spots in protein-protein interfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 13528-33.
- Landick, R., Krek, A., Glickman, M. S., Socci, N. D. & Stallings, C. L. 2014. Genome-wide mapping of the distribution of CarD, RNAP σ A, and RNAP β on the *Mycobacterium smegmatis* chromosome using chromatin immunoprecipitation sequencing. *Genomics Data*, 2, 110-113.
- Lelovic, N., Mitachi, K., Yang, J., Lemieux, M. R., Ji, Y. & Kurosu, M. 2020. Application of *Mycobacterium smegmatis* as a surrogate to evaluate drug leads against *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of antibiotics*, 73, 780-789.
- Li, X.-J., Liu, S.-W., Jiang, Z.-K., Wu, G. & Sun, C.-H. 2016. *Hoyosella rhizosphaerae* sp. nov., a halotolerant actinobacterium isolated from rhizosphere soil of *Suaeda salsa*, and emended description of the genus *Hoyosella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 4716-4722.
- Lim, L. E., Vilcheze, C., Ng, C., Jacobs, W. R., Jr., Ramon-Garcia, S. & Thompson, C. J. 2013. Anthelmintic avermectins kill *Mycobacterium tuberculosis*, including multidrug-resistant clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 1040-6.
- Loerger, T. R., O'malley, T., Liao, R., Guinn, K. M., Hickey, M. J., Mohaideen, N., Murphy, K. C., Boshoff, H. I., Mizrahi, V., Rubin, E. J., Sassetti, C. M., Barry, C. E., 3rd, Sherman, D. R., Parish, T. & Sacchettini, J. C. 2013. Identification of new

- drug targets and resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 8, e75245.
- Lu, H., Zhou, Q., He, J., Jiang, Z., Peng, C., Tong, R. & Shi, J. 2020. Recent advances in the development of protein-protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct Target Ther*, 5, 213.
- Lunge, A., Gupta, R., Choudhary, E. & Agarwal, N. 2020. The unfoldase ClpC1 of *Mycobacterium tuberculosis* regulates the expression of a distinct subset of proteins having intrinsically disordered termini. *Journal of Biological Chemistry*, 295, 9455-9473.
- Lyon, S. M. & Rossman, M. D. 2017. Pulmonary tuberculosis. *Microbiology spectrum*, 5, 5.1. 24.
- Maciąg, A., Piazza, A., Riccardi, G. & Milano, A. 2009. Transcriptional analysis of ESAT-6 cluster 3 in *Mycobacterium smegmatis*. *BMC microbiology*, 9, 1-11.
- Marras, T. K. & Daley, C. L. 2002. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clinics in chest medicine*, 23, 553-568.
- Mashhadi, S. M. A., Yunus, U., Bhatti, M. H., Ahmed, I. & Tahir, M. N. 2016. Synthesis, characterization, solubility and stability studies of hydrate cocrystal of antitubercular Isoniazid with antioxidant and anti-bacterial Protocatechuic acid. *Journal of Molecular Structure*, 1117, 17-21.
- Mcneil, M. B. & Cook, G. M. 2019. Utilization of CRISPR interference to validate MmpL3 as a drug target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63, e00629-19.
- Meehan, C. J., Barco, R. A., Loh, Y.-H. E., Cogneau, S. & Rigouts, L. 2021. Reconstituting the genus *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71.
- Mi, Y., Bao, L., Gu, D., Luo, T., Sun, C. & Yang, G. 2017. *Mycobacterium tuberculosis* PPE25 and PPE26 proteins expressed in *Mycobacterium smegmatis* modulate cytokine secretion in mouse macrophages and enhance mycobacterial survival. *Research in Microbiology*, 168, 234-243.

- Milton, P., Hamley, J. I., Walker, M. & Basáñez, M.-G. 2020. Moxidectin: an oral treatment for human onchocerciasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 18, 1067-1081.
- Mohan, A., Padiadpu, J., Baloni, P. & Chandra, N. 2015. Complete genome sequences of a *Mycobacterium smegmatis* laboratory strain (MC2 155) and isoniazid-resistant (4XR1/R2) mutant strains. *Genome announcements*, 3, e01520-14.
- Moreira, I. S., Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. 2007. Hot spots--a review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins*, 68, 803-12.
- Muhammed Ameen, S. & Drancourt, M. 2013. Ivermectin lacks antituberculous activity. *J Antimicrob Chemother*, 68, 1936-7.
- Muñoz-Muñoz, L., Shoen, C., Sweet, G., Vitoria, A., Bull, T. J., Cynamon, M., Thompson, C. J. & Ramón-García, S. 2021. Repurposing avermectins and milbemycins against mycobacteroides abscessus and other nontuberculous mycobacteria. *Antibiotics*, 10, 381.
- Nath, Y., Ray, S. K. & Buragohain, A. K. 2018. Essential role of the ESX-3 associated eccD3 locus in maintaining the cell wall integrity of *Mycobacterium smegmatis*. *Int J Med Microbiol*, 308, 784-795.
- Navarro, M., Camprubí, D., Requena-Méndez, A., Buonfrate, D., Giorli, G., Kamgno, J., Gardon, J., Boussinesq, M., Muñoz, J. & Krolewiecki, A. 2020. Safety of high-dose ivermectin: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75, 827-834.
- O'donnell, G. & Gibbons, S. 2007. Antibacterial activity of two canthin-6-one alkaloids from *Allium neapolitanum*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21, 653-657.
- Omansen, T. F., Porter, J. L., Johnson, P. D., Van Der Werf, T. S., Stienstra, Y. & Stinear, T. P. 2015. In-vitro activity of avermectins against *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003549.
- Oren, A. & Garrity, G. M. 2018. Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared in volume 68, part 1, of the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol*, 68, 979-981.

- Padda, I. S. & Reddy, K. M. 2021. Antitubercular medications. *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Pandey, R., Russo, R., Ghanny, S., Huang, X., Helmann, J. & Rodriguez, G. M. 2015. MntR(Rv2788): a transcriptional regulator that controls manganese homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 98, 1168-83.
- Penuelas-Urquides, K., Gonzalez-Escalante, L., Villarreal-Trevino, L., Silva-Ramirez, B., Gutierrez-Fuentes, D., Mojica-Espinosa, R., Rangel-Escareno, C., Uribe-Figueroa, L., Molina-Salinas, G. & Davila-Velderrain, J. 2013. Comparison of gene expression profiles between pansensitive and multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Current microbiology*, 67, 362-371.
- Piccaro, G., Poce, G., Biava, M., Giannoni, F. & Fattorini, L. 2015. Activity of lipophilic and hydrophilic drugs against dormant and replicating *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Antibiotics*, 68, 711-714.
- Poweleit, N., Czudnochowski, N., Nakagawa, R., Trinidad, D. D., Murphy, K. C., Sassetti, C. M. & Rosenberg, O. S. 2019. The structure of the endogenous ESX-3 secretion system. *Elife*, 8.
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Williams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D. & Pirmohamed, M. 2019. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*, 18, 41-58.
- Raman, K., Yeturu, K. & Chandra, N. 2008. targetTB: a target identification pipeline for *Mycobacterium tuberculosis* through an interactome, reactome and genome-scale structural analysis. *BMC Syst Biol*, 2, 109.
- Ramón-García, S., Vilchèze, C., Lim, L. E., Ng, C., Jacobs Jr, W. R. & Thompson, C. J. 2014. Measurements of the in vitro anti-mycobacterial activity of ivermectin are method-dependent. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, 1723-1724.
- Ranjitha, J., Rajan, A. & Shankar, V. 2020. Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infection and Public Health*, 13, 1255-1264.
- Rasool, M. F., Khalid, S., Majeed, A., Saeed, H., Imran, I., Mohany, M., Al-Rejaie, S. S. & Alqahtani, F. 2019. Development and evaluation of physiologically based

- pharmacokinetic drug–disease models for predicting rifampicin exposure in tuberculosis and cirrhosis populations. *Pharmaceutics*, 11, 578.
- Reyrat, J.-M. & Kahn, D. 2001. *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis? *Trends in microbiology*, 9, 472-473.
- Riojas, M. A., Mcgough, K. J., Rider-Riojas, C. J., Rastogi, N. & Hazbón, M. H. 2018. Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, 324-332.
- Rock, J. M., Hopkins, F. F., Chavez, A., Diallo, M., Chase, M. R., Gerrick, E. R., Pritchard, J. R., Church, G. M., Rubin, E. J. & Sassetti, C. M. 2017. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nature microbiology*, 2, 16274.
- Rodriguez, G. M., Voskuil, M. I., Gold, B., Schoolnik, G. K. & Smith, I. 2002. *ideR*, An essential gene in mycobacterium tuberculosis: role of *IdeR* in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infect Immun*, 70, 3371-81.
- Sabe, V. T., Ntombela, T., Jhamba, L. A., Maguire, G. E. M., Govender, T., Naicker, T. & Kruger, H. G. 2021. Current trends in computer aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review. *Eur J Med Chem*, 224, 113705.
- Saffo, Z. & Ognjan, A. 2016. *Mycobacterium smegmatis* infection of a prosthetic total knee arthroplasty. *IDCases*, 5, 80-82.
- Samukawa, N., Yamaguchi, T., Ozeki, Y., Matsumoto, S., Igarashi, M., Kinoshita, N., Hatano, M., Tokudome, K., Matsunaga, S. & Tomita, S. 2022. An efficient CRISPR interference-based prediction method for synergistic/additive effects of novel combinations of anti-tuberculosis drugs. *Microbiology*, 168, 001285.
- Savková, K., Huszár, S., Baráth, P., Pakanová, Z., Kozmon, S., Vancová, M., Tesařová, M., Blaško, J., Kaliňák, M. & Singh, V. 2021. An ABC transporter Wzm–Wzt catalyzes translocation of lipid-linked galactan across the plasma membrane in

- mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118, e2023663118.
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 1101-8.
- Serafini, A., Boldrin, F., Palu, G. & Manganelli, R. 2009. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 conditional mutant: essentiality and rescue by iron and zinc. *J Bacteriol*, 191, 6340-4.
- Serafini, A., Pisu, D., Palu, G., Rodriguez, G. M. & Manganelli, R. 2013. The ESX-3 secretion system is necessary for iron and zinc homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 8, e78351.
- Shiloh, M. U. & Champion, P. a. D. 2010. To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? *Current opinion in microbiology*, 13, 86-92.
- Shirazi, F. M., Mirzaei, R., Nakhaee, S., Nejatian, A., Ghafari, S. & Mehrpour, O. 2022. Repurposing the drug, ivermectin, in COVID-19: toxicological points of view. *European Journal of Medical Research*, 27, 1-11.
- Siegrist, M. S., Steigedal, M., Ahmad, R., Mehra, A., Dragset, M. S., Schuster, B. M., Philips, J. A., Carr, S. A. & Rubin, E. J. 2014. Mycobacterial Esx-3 requires multiple components for iron acquisition. *mBio*, 5, e01073-14.
- Siegrist, M. S., Unnikrishnan, M., McConnell, M. J., Borowsky, M., Cheng, T. Y., Siddiqi, N., Fortune, S. M., Moody, D. B. & Rubin, E. J. 2009. Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 18792-7.
- Sinave 2022. Boletín Epidemiológico: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información 2022. *Semana Epidemiológica* 52., 39.
- Singh, A. K., Carette, X., Potluri, L.-P., Sharp, J. D., Xu, R., Pristic, S. & Husson, R. N. 2016. Investigating essential gene function in *Mycobacterium tuberculosis* using an efficient CRISPR interference system. *Nucleic acids research*, 44, e143-e143.
- Singh, R., Dwivedi, S. P., Gaharwar, U. S., Meena, R., Rajamani, P. & Prasad, T. 2020. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of applied microbiology*, 128, 1547-1567.

- Snapper, S., Melton, R., Mustafa, S., Kieser, T. & Jr, W. J. 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular microbiology*, 4, 1911-1919.
- Stephan, J., Mailaender, C., Etienne, G., Daffé, M. & Niederweis, M. 2004. Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48, 4163-4170.
- Tanchuk, V. Y., Tanin, V. O., Vovk, A. I. & Poda, G. 2016. A new, improved hybrid scoring function for molecular docking and scoring based on AutoDock and AutoDock Vina. *Chemical biology & drug design*, 87, 618-625.
- Tinaztepe, E., Wei, J. R., Raynowska, J., Portal-Celhay, C., Thompson, V. & Philips, J. A. 2016. Role of Metal-Dependent Regulation of ESX-3 Secretion in Intracellular Survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 84, 2255-2263.
- Tufariello, J. M., Chapman, J. R., Kerantzas, C. A., Wong, K. W., Vilcheze, C., Jones, C. M., Cole, L. E., Tinaztepe, E., Thompson, V., Fenyo, D., Niederweis, M., Ueberheide, B., Philips, J. A. & Jacobs, W. R., Jr. 2016. Separable roles for *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 effectors in iron acquisition and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E348-57.
- Tycko, J., Myer, V. E. & Hsu, P. D. 2016. Methods for optimizing CRISPR-Cas9 genome editing specificity. *Molecular cell*, 63, 355-370.
- Udwadia, Z. F., Amale, R. A., Ajbani, K. K. & Rodrigues, C. 2012. Totally drug-resistant tuberculosis in India. *Clinical Infectious Diseases*, 54, 579-581.
- Varela, C., Rittmann, D., Singh, A., Krumbach, K., Bhatt, K., Eggeling, L., Besra, G. S. & Bhatt, A. 2012. MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria. *Chemistry & biology*, 19, 498-506.
- Wang, S., Zhou, K., Yang, X., Zhang, B., Zhao, Y., Xiao, Y., Yang, X., Yang, H., Guddat, L. W. & Li, J. 2020. Structural insights into substrate recognition by the type VII secretion system. *Protein & cell*, 11, 124-137.
- Wang, Y., Zhang, Z.-T., Seo, S.-O., Lynn, P., Lu, T., Jin, Y.-S. & Blaschek, H. P. 2016. Bacterial genome editing with CRISPR-Cas9: deletion, integration, single nucleotide modification, and desirable “clean” mutant selection in *Clostridium beijerinckii* as an example. *ACS synthetic biology*, 5, 721-732.

- Who 2022a. Global Tuberculosis Report 2022. 68.
- Who 2022b. *WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment-drug-resistant tuberculosis treatment, 2022 update*, World Health Organization.
- Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Béguec, C., Wölbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., Van Soolingen, D., Rüsch-Gerdes, S., Locht, C. & Brisse, S. 2008. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS pathogens*, 4, e1000160.
- Woerde, D. J., Martin, P. A. & Govendir, M. 2015. Susceptibility of rapidly growing mycobacteria isolated from Australian cats to ivermectin, moxidectin, ceftiofur and florfenicol. *Journal of feline medicine and surgery*, 17, 1065-1068.
- Wouters, O. J., Mckee, M. & Luyten, J. 2020. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *JAMA*, 323, 844-853.
- Xiao, J., Jia, H., Pan, L., Li, Z., Lv, L., Du, B., Zhang, L., Du, F., Huang, Y. & Cao, T. 2019. Application of the CRISPRi system to repress *sepF* expression in *Mycobacterium smegmatis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 72, 183-190.