# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



Bases para el Desarrollo de una Técnica Molecular de Detección Rápida de *Mycobacterium tuberculosis* Resistente a Estreptomicina: Análisis Molecular de los Genes *rpsL*, *rrs* y *gidB* en Aislados Clínicos y Análisis Bioinformático de la Variante *Mt*GidB L101F

TESIS

# QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

# M.C.S. ÁLVARO RODRÍGUEZ GARCÍA

Tijuana, B.C.

Febrero de 2023.

# Universidad Autónoma de Baja California FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.340 Tijuana, B.C., a 18 de enero del 2023

C. Álvaro Rodríguez García Pasante de: Doctorado en Ciencias Presente

POR LA REALIZACION PLENA DEL SER

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la Opción <u>TESIS</u>

Es propuesto, por los C. Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra

Dra. Rosa Elena Mares Alejandre

Quienes serán las responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema <u>"Bases para el desarrollo de una técnica molecular de detección rápida de Mycobacterium tuberculosis resistente a estreptomicina: análisis molecular de los genes *rpsL, rrs y gidB* en aislados clínicos y análisis bioinformático de la variante *Mt*GidB L101F"</u>

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

I. INTRODUCCIÓN 11. JUSTIFICACION III. OBJETIVOS IV. MATERIALES Y METODOS V.O **RESULTADOS Y DISCUSIÓN** VI. CONCLUSIONES VII. **BIBLIOGRAFIA** VIII. ANEXO UNIVERSIDAD AUTÓNOL DE BAJA CALIFORNIA RUA REALIZACIÓN PLENA DE Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra Sub-Directora **Director de Tesis** MaresA LOSA E M.C. Roberto Alejandro Reyes Martinez Dra. Rosa Elena Mares Alejandre Director Directora de Tesis

DO E INVESTIGACION

# Rodríguez García, Álvaro

Bases para el Desarrollo de una Técnica Molecular de Detección Rápida de *Mycobacterium tuberculosis* Resistente a Estreptomicina: Análisis Molecular de los Genes *rpsL*, *rrs* y *gidB* en Aislados Clínicos y Análisis Bioinformático de la Variante *Mt*GidB L101F

Tesis de Doctorado

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

- el material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales; incluir la siguiente cita: "Rodríguez García, Álvaro. Bases para el Desarrollo de una Técnica Molecular de Detección Rápida de *Mycobacterium tuberculosis* Resistente a Estreptomicina: Análisis Molecular de los Genes *rpsL*, *rrs* y *gidB* en Aislados Clínicos y Análisis Bioinformático de la Variante *Mt*GidB L101F. Tesis de Doctorado en Ciencias. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Febrero de 2023".
- enviar un correo electrónico a rmares@uabc.edu.mx y mramos@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado a la presente tesis, contactar a rmares@uabc.edu.mx y mramos@uabc.edu.mx.

- D.R. © Rodríguez García, Álvaro. Tesista.
- D.R. © Mares Alejandre, Rosa Elena. Directora de tesis.
- D.R. © Ramos Ibarra, Marco Antonio. Director de tesis.

D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.

D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior. © 2023.

Tesis:	Bases para el Desarrollo de una Técnica Molecular de Detección Rápida de
	Mycobacterium tuberculosis Resistente a Estreptomicina: Análisis Molecular de
	los Genes rpsL, rrs y gidB en Aislados Clínicos y Análisis Bioinformático de la
	Variante <i>Mt</i> GidB L101F.
Grado:	Doctorado en Ciencias, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e
	Ingeniería
Institución:	Universidad Autónoma de Baja California
Sustentante:	Álvaro Rodríguez García
Fecha:	Febrero de 2023

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (UABC), bajo la codirección de los profesores Dra. Rosa Elena Mares Alejandre y Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra, con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (apoyos 161544 y 170715) y de la Universidad Autónoma de Baja California (registro 300/735/E).

El presente manuscrito se **revisó y aprobó** por un comité académico (jurado de tesis) conformado por los profesores:

Samuel Guillermo Meléndez López, Dr. (Presidente) Rosa Elena Mares Alejandre, Dra. (Secretaria) Victor Guadalupe García González, Dr. (Sinodal) Patricia Lilián Alejandra Muñoz Muñoz, Dra. (Sinodal) Ana Alejandra Ramírez Rodríguez, Dra. (Sinodal) Marco Antonio Ramos Ibarra, Dr. (Suplente)

# Dedicatoria

Dedicado a mis hijos y esposa

Agradecimientos

Doy gracias a Dios y a mis padres por darme la Vida

Agradezco a todo el equipo de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC

Principalmente al Dr. Marco, por darme la oportunidad y apoyo constante en este logro tan significativo en mi vida

# Contenido

Dedicatoria	4
Agradecimientos	4
Contenido	5
Índice de Figuras y Tablas	7
Resumen	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Tuberculosis como problema de salud pública	9
<ul> <li>1.1.1. La enfermedad y el agente causal</li> <li>1.1.2. Infección y reproducción</li> <li>1.1.3. TB: latente y activa</li> <li>1.1.4. Genoma de <i>M. tuberculosis</i></li> <li>1.1.5. Factores de virulencia y patogenia</li> <li>1.1.6. Diagnóstico y tratamiento</li> <li>1.1.7. Resistencia a fármacos</li> </ul>	
1.2. Tuberculosis resistente a estreptomicina	
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS	22
3. OBJETIVOS 3.1. Objetivo general	<b>22</b> 22
<ul> <li><b>3. OBJETIVOS</b></li> <li>3.1. Objetivo general</li> <li>3.2. Objetivos específicos</li> </ul>	<b>22</b> 22 22
<ol> <li>OBJETIVOS</li></ol>	
<ul> <li>3. OBJETIVOS</li></ul>	<b>22</b> 22222323232323232424242425
<ul> <li>3. OBJETIVOS</li></ul>	
<ul> <li>3. OBJETIVOS</li></ul>	

	4.7. Secuenciación de ADN y análisis de datos	
	4.8. Métodos computacionales	
	<ul> <li>4.8.1. Predicciones basadas en la secuencia primaria</li></ul>	26 27 27 28 28
	4.9. Declaración ética	29
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
	5.1. Análisis molecular de los genes rpsL, rrs y gidB de M. tuberculosis	30
	5.2. Trascendencia del análisis molecular	31
	5.3. Análisis biocomputacional de la variante <i>Mt</i> GidB L101F	32
	<ul><li>5.3.1. Análisis estructural y funcional</li><li>5.3.2. Análisis de interacciones en el sitio polimórfico</li><li>5.3.3. Análisis de las fluctuaciones estructurales</li></ul>	32 34 35
	5.4. Trascendencia del análisis biocomputacional	37
6.	CONCLUSIONES	38
7.	BIBLIOGRAFÍA	39
8.	ANEXO	47

# Índice de Figuras y Tablas

Figura 1-1	1. Ciclo de vida patogénico de Mycobacterium tuberculosis	10
Figura 1-2	2. Mapa circular del cromosoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	13
Figura 5-1	I. Estructura terciaria (3D) predicha para <i>Mt</i> GidB	33
Figura 5-2	2. Contactos interatómicos entre residuos que ocurren en el sitio polimórfico	34
Figura 5-3	3. Dinámica molecular (gráficas del radio de giro, Å) de la estructura silvestre (A: L101) y mutante (B: F101) de <i>Mt</i> GidB en una simulación de 2000 ps	36
Figura 5-4	4. Análisis de las fluctuaciones atómicas de la estructura silvestre (L101) y mutante (F101) de <i>Mt</i> GidB	36
Tabla 1-1.	. Diferencias clínicas entre infección tuberculosa latente y activa	11
Tabla 1-2.	. Factores que incrementan el riesgo de desarrollar TB.	12
Tabla 4-1.	. Oligonucleótidos ( <i>primers</i> ) específicos para los genes de <i>M. tuberculosis</i> asociados a la resistencia a estreptomicina	24
Tabla 5-1.	. Resultados generales del análisis molecular de los genes <i>rpsL</i> , <i>rrs</i> , y <i>gidB</i> de once aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> resistentes a	
		30
Tabla 5-2.	. Efecto de L101F sobre la funcion de <i>Mt</i> GidB	32
Tabla 5-3.	. Efecto de L101F sobre la estabilidad de <i>Mt</i> GidB	34
Tabla 5-4.	. Residuos vecinos en contacto con L101 (silvestre) o F101 (mutante) de <i>Mt</i> GidB	35

#### Resumen

La tuberculosis prevalece como amenaza para la salud pública a nivel mundial, y de manera particular en países subdesarrollados donde los programas de detección, tratamiento, y seguimiento muestran competencias limitadas. En 2019, esta enfermedad afectó a 10 millones de personas y provocó 1.4 millones de muertes. El mayor desafío para el control de la infección es la constante aparición y propagación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (el agente infeccioso) resistentes a fármacos. Aunque la estreptomicina no es un fármaco antituberculoso de la primera línea, la Organización Mundial de la Salud recomienda su aplicación en pacientes infectados con una cepa sensible.

Varias mutaciones en los genes *rpsL*, *rrs*, y *gidB* muestran asociación con la resistencia a estreptomicina en *M. tuberculosis*. En el presente estudio, se realizó un análisis genético molecular de estos genes en once aislados clínicos (obtenidos de pacientes con sospecha de infección pulmonar activa, atendidos en la Clínica de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana) para determinar la prevalencia regional de mutaciones conocidas o novedosas. Además, se realizó un análisis biocomputacional de la variante L101F (sustitución leucina por fenilalanina en la posición 101) de *Mt*GidB, en consideración a que no se había detectado ni reportado previamente. Los resultados y el conocimiento generado representan:(1) la etapa inicial para el desarrollo de una prueba molecular de detección rápida de *M. tuberculosis* resistente a estreptomicina, y (2) un avance teórico en la asociación genotipo-fenotipo de una mutación novedosa de la proteína *Mt*GidB.

# 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1. Tuberculosis como problema de salud pública

La tuberculosis (TB) es una enfermedad transmisible, prevenible y curable, causada por la bacteria Gram positiva *Mycobacterium tuberculosis*. A nivel mundial, la TB se encuentra entre las 10 principales causas de muerte y la principal enfermedad causada por un solo agente infeccioso, ubicándose por encima de VIH/SIDA. La enfermedad generalmente afecta los pulmones (TB pulmonar) pero también puede afectar otros sitios (TB extrapulmonar). Se estima que aproximadamente una cuarta parte de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* (World Health Organization, 2020).

Actualmente, el control de la TB representa un desafío mundial debido a la continua aparición de cepas MDR, multirresistentes a fármacos (Kurz *et al.*, 2016; Seung *et al.*, 2015). La identificación precisa de estas cepas exige la confirmación bacteriana y la evaluación de la resistencia a fármacos mediante métodos de cultivo, análisis molecular y secuenciación del ADN (Nguyen *et al.*, 2019; Seki *et al.*, 2021). Además, los pacientes con TB-MDR requieren un tratamiento intensivo durante al menos nueve meses (hasta 20 meses en situaciones extremas), respaldado por un sistema de farmacovigilancia constante para reducir los eventos adversos (Nahid *et al.*, 2019; World Health Organization, 2019).

#### 1.1.1. La enfermedad y el agente causal

A nivel mundial, la TB es una de las principales amenazas para la salud pública (junto con el SIDA) como causa de muerte por enfermedades infecciosas. Aunque la incidencia de TB ha mostrado una tendencia a la baja, los índices de mortalidad observados en la última década sugieren que su erradicación permanece fuera del alcance. En regiones donde la prevalencia de TB es alta, es imperante mejorar el acceso al diagnóstico y tratamiento para reducir la infección; de manera particular, en poblaciones con vulnerabilidad socioeconómica. Además, la aparición de cepas multirresistentes a la farmacoterapia actual, asociada a un alarmante aumento en número, demanda un gran compromiso en términos de asignación de fondos, promoción de la investigación, e implementación de nuevas herramientas diagnósticas y protocolos terapéuticos eficaces (Sulis *et al.*, 2014).



La infección inicia cuando las micobacterias, expulsadas por la tos de un individuo con TB activa, se depositan en los pulmones de un nuevo hospedero. Las micobacterias reclutan macrófagos pulmonares, los cuales se infectan y sirven de transporte a tejidos más profundos. Enseguida, inicia otro reclutamiento de macrófagos, alrededor del ya infectado, formando un granuloma (agregado de células inmunitarias). En sus primeras etapas, el granuloma expande la infección, ya que favorece la propagación de las micobacterias a los macrófagos recién agregados. A medida que se desarrolla la inmunidad adaptativa, el granuloma restringe el crecimiento micobacteriano. Sin embargo, en muchos casos, el granuloma puede sufrir necrosis y apoyar el crecimiento micobacteriano y, por ende, la transmisión al siguiente hospedero.

Figura 1-1. Ciclo de vida patogénico de Mycobacterium tuberculosis.

Tomada y mantenida en su formato original de (Cambier et al., 2014).

En México, los datos de incidencia muestran que la TB continúa siendo un problema de salud pública (Bello-López *et al.*, 2019). En Baja California en el 2019 se calculó una tasa de 69.5 por cada 100000 habitantes (SINAVE, 2020). Desafortunadamente, muchas personas infectadas no tienen acceso a un diagnóstico adecuado. Por esto, se considera prioritario el desarrollo de una prueba rápida, precisa, y accesible para establecer oportunamente un tratamiento anti-TB (García-Basteiro *et al.*, 2018; Parsons *et al.*, 2011).

#### 1.1.2. Infección y reproducción

La TB es una enfermedad comunicable y los pacientes con infección pulmonar activa son la principal fuente de la diseminación. El proceso infeccioso inicia con la inhalación de microgotas (1-5 µm) que contienen al bacilo (*M. tuberculosis*). Por su tamaño, las microgotas pueden permanecer suspendidas en el aire durante varios minutos. En esta etapa, el riesgo de infección depende de varios factores, como la virulencia del patógeno, la cercanía del contacto, la carga bacilar, y el estado inmunológico del hospedero; siendo la vía pulmonar la principal ruta de entrada del agente infeccioso (Figura 1-1).

Cuando son inhaladas, las microgotas evitan las defensas de los bronquios y penetran en los alvéolos terminales, donde son engullidas por células inmunitarias (p. ej., macrófagos y células dendríticas). En la fase temprana de la infección, *M. tuberculosis* se replica dentro del fagocito, y las células cargadas de micobacterias pueden cruzar la barrera alveolar para causar diseminación sistémica. Cabe destacar, que la replicación y la difusión simultánea del patógeno hacia los ganglios linfáticos pulmonares y otros sitios extrapulmonares se producen antes del desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Lo anterior demuestra la habilidad de *M. tuberculosis* para establecer un nicho protegido, y así evitar la eliminación por el sistema inmunitario y persistir de manera indefinida (Ahmad, 2011).

## 1.1.3. TB: latente y activa

No todos los individuos infectados con *M. tuberculosis* desarrollan la enfermedad. Ante esta situación, los centros para el control y prevención de enfermedades de los E.U.A. (Tabla 1-1) clasifican a los pacientes como sujetos con infección latente (TB latente) o activa (TB activa)<sup>1</sup>.

TB latente	TB activa
<ul> <li>No presenta síntomas</li> </ul>	<ul> <li>Tos intensa</li> </ul>
No manifiesta malestares	<ul> <li>Dolor en el pecho</li> </ul>
<ul> <li>Radiografía de tórax normal</li> </ul>	<ul> <li>Tos o esputo con sangre</li> </ul>
	<ul> <li>Debilidad o fatiga</li> </ul>
	<ul> <li>Pérdida de peso</li> </ul>
	<ul> <li>Falta de apetito</li> </ul>
	<ul> <li>Escalofríos</li> </ul>
	<ul> <li>Fiebre</li> </ul>
	<ul> <li>Sudores nocturnos</li> </ul>
	<ul> <li>Radiografía de tórax anormal</li> </ul>

Tabla 1-1. Diferencias clínicas entre infección tuberculosa latente y activa.

Los pacientes con TB latente no presentan síntomas. El único signo es la reacción positiva en la prueba cutánea de la tuberculina. En la mayoría de estos pacientes, las micobacterias persistirán inactivas durante toda la vida, sin causar infección. Sin embargo, en

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> CDC, Centers for Disease Control and Prevention (USA). The difference between latent TB infection and TB disease (last updated: November 21, 2014), https://www.cdc.gov/tb/esp/publications/factsheets/general/ltbiandactivetb\_es.htm.

individuos con un sistema inmune debilitado, el patógeno puede activarse y originar la enfermedad.

En pacientes con TB activa, las micobacterias se activan si el sistema inmune no evita que se multipliquen. Por consiguiente, desarrollan la enfermedad y pueden infectar a otras personas. De manera general, los individuos desarrollan la enfermedad poco después de la infección (en las semanas siguientes), antes de que su sistema inmune pueda combatir a las micobacterias. Sin embargo, otras personas se enferman varios años después, cuando su sistema inmune se debilita por otra razón. Además de otros factores (Tabla 1-2), el riesgo de desarrollar TB es mucho mayor en pacientes con sistema inmune comprometido (p. ej., infectados con VIH) que para personas con sistema inmune competente.

Tabla 1-2. Factores que incrementan el riesgo de desarrollar TB.

- Infección con VIH
- Infección reciente por TB
- Problemas de salud, como diabetes, y otras que afecten el sistema inmunitario
- Consumo de alcohol en exceso o drogas
- Tratamiento no adecuado para combatir infección previa

#### 1.1.4. Genoma de *M. tuberculosis*

La secuencia genómica de *M. tuberculosis* H37Rv (NCBI<sup>™</sup> NC\_000962.3) consta de 4.41 x 10<sup>6</sup> pb (Figura 1-2), con un contenido de 3,906 genes codificantes para proteínas, incluyendo 233 del metabolismo de ácidos grasos y 99 relacionados con la virulencia, la detoxificación y la adaptación (Cole, 1999; Cole *et al.*, 1998).

#### 1.1.5. Factores de virulencia y patogenia

La habilidad de un patógeno para sobrevivir dentro de un organismo hospedero requiere de la expresión de un conjunto de factores genéticos involucrados en la interacción patógeno-hospedero, situación que le permite resistir el estrés fisiológico y medioambiental. La combinación de diferentes estrategias experimentales ha permitido identificar una serie de



Figura 1-2. Mapa circular del cromosoma de Mycobacterium tuberculosis H37Rv.

Tomada y mantenida en su formato original de (Cole et al., 1998).

genes relevantes para la patogenicidad de *M. tuberculosis*, los cuales han sido agrupados, en base a su función, en distintos tipos de factores de virulencia [Smith, 2003]:

*Proteínas de secreción*. A partir de un filtrado, se identificaron alrededor 200 proteínas de secreción, y algunas asociadas (ya que no contienen señal de exportación, pero han sido obtenidas del medio de cultivo), denominadas CFP (del inglés *Cell Filtrate Proteins*). Entre los factores de virulencia categorizados en este grupo figuran KatG, SodA, GlnA, HspX, y ESAT6. De manera interesante, los factores HspX y ESAT-6 han sido catalogados como antígenos inmuno-dominantes, ya que son reconocidos por anticuerpos séricos de pacientes con TB activa. Además, en base a que confieren protección contra *M. tuberculosis* en modelos animales, estos factores representan inmunógenos potenciales para el desarrollo de vacunas.

*Componentes de superficie celular*. Estos factores son exclusivos de la pared celular de micobacterias patógenas, ya que siendo una estructura celular única y compleja contiene proteínas, lípidos, y carbohidratos propios del género (p. ej., Erp, Mas, FadD26, FadD28, MmpL7, FbpA, MmaA4, PcaA, OmpA, HbhA, y LAM); por tanto, son excelentes blancos para

contrarrestar la virulencia de *M. tuberculosis*. Inclusive, las proteínas Fbp (micoliltransferasas) han sido definidas como antígenos inmuno-dominantes.

Enzimas del metabolismo celular. Actualmente, más de 200 enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos y ácidos grasos han sido incluidas en esta clasificación (p. ej., Icl, LipF, FadD33, Plc [A/B/C/D], y Pan [C/D]). Por otro lado, algunas enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos y purinas (p. ej., LeuD, TrpD, ProC, PurC) han sido seleccionadas para aislar cepas auxotróficas y crear una vacuna de célula viva (atenuada). Por ejemplo, la mutación en el gen codificante para la antranilato fosforribolsiltransferasa (TrpD) conduce a una atenuación severa, ocasionando que *M. tuberculosis* no prolifere en macrófagos de ratones SCID y por ende no cause la muerte.

Proteínas de anaerobiosis y estrés oxidativo. La expresión de enzimas que participan en la respiración en ausencia de oxígeno (NarG) y que contrarrestan la acción de las especies reactivas de oxígeno (SodA, SodC, KatG, y AhpC), durante el establecimiento del patógeno dentro del macrófago, sugiere que la resistencia a las condiciones de anaerobiosis y el estrés oxidativo son importantes para la fisiología de la micobacteria durante la infección; especialmente en la fase tardía (granuloma de pulmón).

*Factores de captación de metales.* La virulencia de microorganismos patógenos ha sido frecuentemente asociada con la captura de hierro y magnesio (Fe<sup>3+</sup> y Mg<sup>2+</sup>), los cuales son esenciales para la vida. De manera interesante, *M. tuberculosis* no es la excepción, ya que mutantes afectadas en la asimilación de estos metales exhiben un fenotipo de atenuación en su virulencia. Aún más, algunas proteínas (como MgtC, MbtB, y IdeR) han sido asociadas a defectos en los sistemas de incorporación de tales metales.

*Reguladores transcripcionales.* Habitualmente, son factores que controlan la transcripción de muchos genes. Aunque no se ha definido su papel fisiológico, la inactivación de algunos reguladores promete un deterioro importante en la virulencia de *M. tuberculosis.* Estos han sido clasificados en tres grupos: (a) factores sigma (SigA, SigE, SigF, SigH), que se predice esenciales para la virulencia; p. ej., SigA, es el principal factor para la transcripción de la mayoría de los genes *housekeeping*; (b) reguladores de respuesta (PhoP, PrrA, MprA), los cuales integran sistemas de dos componentes que responden a señales del medio ambiente, vía un sensor (receptor de membrana) y un efector (activador de la transcripción); p. ej., PhoP, que responde a la depleción de Mg<sup>2+</sup> a través de un sensor de membrana; y (c) otros reguladores transcripcionales (HspR, WhiB3), que fueron anotados en el genoma de *M. tuberculosis* pero no se ha determinado su papel en la fisiología y virulencia bacteriana.

Con base en los estudios realizados en conejo, se distinguieron cuatro etapas de la enfermedad pulmonar(van Crevel *et al.*, 2002).

La primera etapa inicia con la inhalación de micobacterias; enseguida, los macrófagos alveolares las ingieren y, a menudo, las destruyen. Sin embargo, la destrucción del patógeno depende de: (i) la capacidad microbicida de los macrófagos y (ii) la virulencia de las micobacterias ingeridas. De manera interesante, las micobacterias que escapan a la destrucción intracelular inicial se multiplicarán, originando una alteración del macrófago. Cuando esto sucede, los monocitos sanguíneos son atraídos hacia el pulmón (segunda etapa) y se diferenciarán en macrófagos que ingieren micobacterias, pero no las destruyen. En esta etapa simbiótica, el número de células patógenas aumenta y los macrófagos (derivados de la sangre) se acumulan, produciendo ligero daño tisular. Dos a tres semanas posteriores a la infección, se desarrolla la inmunidad mediada por células T. El arribo de linfocitos T a las lesiones tempranas, favorece la producción de citocinas y la activación de macrófagos para tratar de eliminar a las micobacterias intracelulares. Con esto, la proliferación de células patógenas se detiene (tercera etapa), y la necrosis en las lesiones primarias inhibe el crecimiento extracelular de las micobacterias. Como resultado final, la infección tiende a convertirse en latente. Sin embargo, en casos de insuficiencia inmunológica, la enfermedad puede progresar y ocurrir después de la infección primaria. Los focos caseosos licuados proporcionan condiciones para el crecimiento extracelular de M. tuberculosis y la formación de cavidades conduce a la ruptura de bronquios, permitiendo a las micobacterias diseminarse a otras partes del pulmón y al medio exterior (cuarta etapa).

En resumen, el resultado final de la infección tuberculosa depende del equilibrio entre (i) la proliferación y eliminación de las micobacterias y (ii) el grado de necrosis, fibrosis, y regeneración tisular.

#### 1.1.6. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de TB activa incluye la evaluación clínica, una radiografía de tórax, tinción para bacilos ácido-resistentes en muestras de esputo, detección de anticuerpos, cultivos microbiológicos, y la amplificación de ácidos nucleicos. Por otro lado, la infección de TB latente es detectada mediante la prueba de PPD y la cuantificación de interferón gamma (Brodie y Schluger, 2005).

15

No todos los pacientes infectados desarrollan la enfermedad. Por esta razón, los centros para el control y prevención de enfermedades de los E.U.A. (CDC, por sus siglas en inglés)<sup>2</sup> sugieren dos esquemas terapéuticos, ya que la TB latente puede evolucionar a TB activa. Los esquemas para el tratamiento de la TB latente utilizan la isoniazida, la rifapentina, o rifampicina. Sin embargo, si el paciente con infección latente tiene contacto con una persona con enfermedad activa y resistente a fármacos se recomienda un tratamiento individualizado. Por otro lado, como los pacientes con TB activa pueden diseminar las micobacterias a personas con las que tienen contacto diario, se recomienda que sean tratados con un régimen estricto de fármacos correctamente prescritos. En la actualidad, existen 10 fármacos anti-TB aprobados por la agencia para la administración de alimentos y medicamentos de los E.U.A. (FDA, por sus siglas en inglés); de los cuales, la primera línea está integrada por isoniazida, rifampicina, pirazinamida, y etambutol.

#### 1.1.7. Resistencia a fármacos

La aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos es un evento común en todo el mundo. En países donde la enfermedad es prevalente, de manera particular, cada año se reporta una alta incidencia de casos de TB monorresistente específica para fármacos de la primera línea, siendo la resistencia a rifampicina (RR) el suceso de mayor frecuencia. Por otro lado, la TB multirresistente a fármacos (MDR-TB), causada por micobacterias resistentes a rifampicina e isoniazida (principalmente), se considera un acontecimiento de preocupación, ya que reduce la probabilidad de éxito terapéutico con esquemas tradicionales. Ante esto, los pacientes infectados con micobacterias RR o MDR requieren tratamientos complejos y prolongados, los cuales incluyen a fármacos de la segunda línea (World Health Organization and Global Tuberculosis Programme, 2016).

#### Resistencia a fármacos de la primera línea

La rifampicina (RIF), derivada de las rifamicinas, es uno de los fármacos anti-TB más eficaces y, junto con la isoniazida, constituye el tratamiento básico para la tuberculosis. La RIF es activa contra micobacterias en fase de crecimiento o en latencia (Mitchison, 1979), ya que se une a la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa (ARNpol- $\beta$ ) e inhibe la elongación del ARN

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> CDC, Centers for Disease Control and Prevention (USA). Tuberculosis (TB) – Treatment (last updated: April 8, 2016), https://www.cdc.gov/tb/topic/treatment/default.htm.

mensajero (Blanchard, 1996). La mayoría de los aislados clínicos resistentes a la RIF albergan mutaciones en el gen *rpoB* (que codifica para la ARNpol-β), las cuales inducen cambios conformacionales que disminuyen la afinidad por el fármaco (Telenti *et al.*, 1993). Alrededor del 96% de las mutaciones ocurren en la región II (un *hot-spot* de 81 pb; también conocida como «región determinante de la resistencia a la rifampicina»), la cual abarca los codones 507-533 del gen *rpoB* (Ramaswamy & Musser, 1998). De manera específica, los estudios de asociación genotipo-fenotipo muestran que las mutaciones en los codones 516, 526, y 531 son las más frecuentes (Caws *et al.*, 2006; Somoskovi *et al.*, 2001).

La isoniazida (INH) es otro de los fármacos anti-TB más eficaces. A diferencia de la rifampicina, este fármaco sólo es activo contra micobacterias en fase de crecimiento. La INH es un profármaco que requiere ser activado por KatG, una catalasa-peroxidasa codificada por el gen *katG* (Zhang *et al.*, 1992), y actúa bloqueado la síntesis de ácidos micólicos por inhibición de la enoil-ACP reductasa, codificada por el gen *inhA*(Rawat *et al.*, 2003). Aunque otros genes también pudieran estar involucrados en la resistencia a INH, los principales mecanismos moleculares se asocian con mutaciones en los genes *katG* e *inhA*. De hecho, varios estudios reportan una alta prevalencia de mutaciones detectadas en los genes homólogos de aislados clínicos (Hazbón *et al.*, 2006; Ramaswamy *et al.*, 2003).

El etambutol (EMB) es un fármaco anti-TB que tiene acción bacteriostática, al interferir con la biosíntesis e integridad de la pared celular de las micobacterias (estructura única formada por una capa de ácidos micólicos unidos covalentemente al peptidoglicano a través del arabinogalactano) (Takayama and Kilburn, 1989; Amalio Telenti *et al.*, 1997). El EMB actúa sobre las arabinosil transferasas codificadas por el *locus* embCAB (10 kb), el cual consta de tres genes: *embC*, *embA*, y *embB*. En *M. tuberculosis*, estas enzimas son esenciales para la síntesis de arabinogalactano (EmbA/EmbB) y lipoarabinomanano (EmbC), de tal manera que su inhibición produce la acumulación del intermediario D-arabinofuranosil-P-decaprenol y esto imposibilita completar la biosíntesis de la pared celular (Brossier *et al.*, 2015; Khosravi *et al.*, 2019; Mikusová *et al.*, 1995).Aunque se han reportado mutaciones en otros genes, el mecanismo más conocido de resistencia a EMB se asocia con mutaciones en el gen *embB* (Safi *et al.*, 2013; Sreevatsan *et al.*, 1997; A. Telenti *et al.*, 1997).

La pirazinamida (PZA), análogo de la nicotinamida, es un fármaco anti-TB que inhibe a micobacterias semi-latentes que residen en ambientes ácidos (p. ej., lesiones de TB). PZA es un profármaco que requiere ser convertido a ácido pirazinóico por la pirazinamidasanicotinamidasa, enzima codificada por el gen *pncA* (Konno *et al.*, 1967; Mitchison, 1985; Scorpio and Zhang, 1996). De manera frecuente, la resistencia a PZA se asocia con mutaciones en el gen *pncA*, las cuales ocurren principalmente en un segmento de 561 pb de la región codificante yen una porción de 82 pb de la secuencia promotora (Juréen *et al.*, 2008; Scorpio *et al.*, 1997). Aunque existen reportes de cepas resistentes que no contienen mutaciones en el gen *pncA*, la evidencia sobre la contribución de otros genes al fenotipo es aún limitada (Alexander *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2000; Simons *et al.*, 2013).

#### Resistencia a fármacos de la segunda línea

Las fluoroquinolonas (FQ) son fármacos aplicados en el tratamiento de la MDR-TB. La ciprofloxacina y la ofloxacina son derivados sintéticos del ácido nalidíxico (Goss, 1965), en tanto la moxifloxacina y la gatifloxacina son de nueva generación (Palomino y Martin, 2013; Rustomjee *et al.*, 2008).Las FQ inhiben tanto la topoisomerasa II (ADN girasa) como la topoisomerasa IV, dos enzimas críticas para la viabilidad bacteriana(Fàbrega *et al.*, 2009). En *M. tuberculosis*, solo la ADN girasa está presente (Aubry *et al.*, 2004) y se expresa como un hetero-tetrámero conformado por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ , codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente (Takiff *et al.*, 1994). Aunque la resistencia a las FQ se asocia con mutaciones en ambos, las variaciones genéticas más frecuentes se encuentran en el gen *gyrA* (Cheng *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2008).

Los aminoglucósidos amikacina (AK) y kanamicina (KM) también son fármacos usados en el tratamiento de MDR-TB. Ambos actúan sobre las micobacterias uniéndose a la molécula de ARNr 16S e inhibiendo la biosíntesis de proteínas (Sowajassatakul *et al.*, 2014).Habitualmente, las cepas resistentes a aminoglucósidos muestran mutaciones en las posiciones 1400, 1401, y 1483 del gen *rrs* (codificante para el ARNr 16S), las cuales se asocian con un alto nivel de resistencia tanto a AK como a KM (Alangaden *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1998).Por otro lado, la identificación de mutaciones en la región promotora del gen *eis*, que codifica para una aminoglucósido acetiltransferasa, se han asociado con diferentes niveles de resistencia a la KM esto sugiere la existencia de otros mecanismos moleculares de resistencia a estos fármacos (Krüüner *et al.*, 2003; Zaunbrecher *et al.*, 2009).

La etionamida (ETH), derivada del ácido isonicotínico y estructuralmente similar a la isoniazida, es un profármaco que requiere se activada por la mono-oxigenasa codificada por el gen *ethA*. La ETH interfiere con la síntesis de ácidos micólicos, formando un aducto con el NAD e inhibiendo la enoil-ACP reductasa (Carette *et al.*, 2012). La resistencia a este fármaco se produce por mutaciones en los genes *ethA*, *ethR*, e *inhA* (Brossier *et al.*, 2011; DeBarber *et al.*, 2000). Por otro lado, existen estudios con aislados resistentes tanto a la isoniazida como

a la etionamida que reportan mutaciones en el gen *mshA*, el cual codifica para una enzima esencial de la biosíntesis de micotiol (Vilchèze *et al.*, 2008).

El ácido p-aminosalicílico (PAS) es un fármaco utilizado en el tratamiento de MDR-TB. Aunque su mecanismo de acción no está completamente definido, se ha propuesto que actúa como profármaco e interfiere en la biosíntesis de folatos (Rengarajan *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2013). Aunque existen pocos estudios de asociación genotipo-fenotipo, un reporte identificó a la enzima timidilato sintasa, codificada por el gen *thyA*, como determinante de los niveles de folato y, además, corroboró que aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistente a PAS se asocian con mutaciones en el gen *thyA* (Rengarajan *et al.*, 2004).Otro estudio reportó que varias mutaciones en *folC*, codificante para la dihidrofolato sintasa, confieren resistencia a PAS en cepas de laboratorio (Zhao *et al.*, 2014).

El linezolid (LNZ) es una oxazolidinona que también se emplea en el tratamiento de MDR-TB (Leach *et al.*, 2011). Su modo de acción es la inhibición temprana de la biosíntesis de proteínas, uniéndose a la subunidad 50S del ribosoma (Zhang, 2005). Aunque la resistencia a este fármaco es considerada poco usual, un estudio reportó que 1.9% de 210 aislados clínicos de *M. tuberculosis* MDR analizados mostró resistencia a LZN (Richter *et al.*, 2007). Más aun, otro estudio *in vitro* reportó que mutaciones en el gen codificante para el ARNr 23S se asocian con resistencia a LZN (Hillemann *et al.*, 2008).Por otro lado, un estudio más reciente reportó que la mutación T460C del gen *rplC*, que codifica para la proteína ribosomal L3, se asocia tanto a variantes obtenidas en el laboratorio como con aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistente a LNZ (Beckert *et al.*, 2012).

## 1.2. Tuberculosis resistente a estreptomicina

El antibiótico estreptomicina (STR) se retiró como fármaco anti-TB de la primera línea debido a la alta incidencia de efectos secundarios y al potencial para desarrollar resistencia en pacientes que reciben un esquema anti-TB convencional (World Health Organization, 2019). Sin embargo, la OMS (Organización Mundial de la Salud)recomienda su aplicación en tratamientos contra MDR-TB cuando se tiene la certeza de que la infección es causada por una variante de *M. tuberculosis* sensible a STR (Thida *et al.*, 2018).

Al igual que otros aminoglucósidos, STR actúa sobre la subunidad 30S del ribosoma e inhibe la biosíntesis de proteínas de manera específica uniéndose a la proteína ribosomal S12 y a la molécula de ARNr 16S (Sun *et al.*, 2016). En *M. tuberculosis*, la resistencia a este

19

fármaco se asocia principalmente con mutaciones en los genes *rpsL* (que codifica para la proteína ribosomal S12) y *rrs* (que codifica para el ARNr 16S) (Tudo *et al.*, 2010), siendo más frecuentes en los codones 43 y 88 de *rpsL*, y en los bucles 530 y 912 de *rrs* (Khosravi *et al.*, 2017). Inclusive, la mutación K43R en *rpsL* se asocia con la resistencia a STR de alto nivel (Spies *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2016).

Por otro lado, estudios recientes sugieren que varias mutaciones en el gen *gidB* se asocian con la resistencia a STR de bajo nivel (Okamoto *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2011), de manera particular se han observado en asilados clínicos que no portan mutaciones en los genes *rpsL* o *rrs* (Okamoto *et al.*, 2007). El gen *gidB* (glucose-inhibited division protein B) codifica para una metiltransferasa [dependiente de S-adenosilmetionina, SAM] específica para el ARNr 16S (Camus *et al.*, 2002). La metilación ocurre de manera específica en el nucleótido G527 del ARNr 16S de *E. coli*, el cual corresponde a G518 en el homólogo de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998). Por lo tanto, como el fármaco interactúa con ese nucleótido, una función alterada de la metiltransferasa específica afectaría el estado de metilación de G518 del ARNr 16S de *M. tuberculosis*, interfiriendo con la unión al antibiótico y produciendo el fenotipo de resistencia a STR observado (Ahmad, 2011; Camus *et al.*, 2002; Cole, 1999; Cole *et al.*, 1998).

# 2. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. Las nuevas cepas del bacilo de la TB y los asociados al complejo MTBC causantes de la enfermedad tuberculosa en humanos que han adquirido resistencia a medicamentos utilizados en el tratamiento, como la estreptomicina, permiten su prevalencia en la población.

Los altos costos e infraestructura para realizar pruebas de detección limitan su alcance y dificultan el tratamiento eficaz, permitiendo la propagación de la enfermedad. Por eso es importante el desarrollo de métodos alternativos. Las técnicas moleculares son específicas en la detección de patógenos y genes o secuencias de ácidos nucleicos; el uso de esta biotecnología y el análisis biocomputacional nos podría ayudar a determinar si hay asociación de la resistencia a estreptomicina con los genes *rpsL*, *rrs y gidB* de *Mycobacterium tuberculosis*.

# 3. OBJETIVOS

## 3.1. Objetivo general

Realizar un análisis molecular de los genes *rspL*, *rrs*, y *gidB* en aislados clínicos de *M*. *tuberculosis* resistentes a estreptomicina, mediante la secuenciación nucleotídica de fragmentos genómicos amplificados por PCR, para la identificación de mutaciones con potencial como dianas específicas en el desarrollo de pruebas moleculares de interés biomédico.

# 3.2. Objetivos específicos

- Colaboraren el análisis de especímenes clínicos de pacientes con sospecha de infección tuberculosa activa mediante el escrutinio de aislados biológicos con baciloscopia positiva y resistencia a estreptomicina (CMI >0.8 µg/mL).
- Obtener una muestra de ADN genómico de aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a estreptomicina mediante la técnica estándar de extracción de material genético usando el reactivo comercial DNAzol.
- Producir fragmentos puros de los genes *rpsL*, *rrs*, y *gidB* para secuenciación nucleotídica mediante una técnica estándar de amplificación de ADN genómico y purificación de los amplicones usando un estuche comercial.
- Verificar la identidad de los amplicones mediante un análisis de la secuencia nucleotídica obtenida con un sistema automatizado (método de Sanger) en contraste con la secuencia depositada para la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.
- 5. Identificar las mutaciones presentes en los genes *rpsL*, *rrs*, y *gidB* de los asilados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a estreptomicina mediante un análisis comparativo de secuencias asistido por herramientas bioinformáticas.
- Realizar un análisis computacional de la variante *Mt*GidB L101F mediante la aplicación de diferentes herramientas bioinformáticas para predecir el efecto de la mutación L101F sobre la estructura y función de la proteína GidB de *M. tuberculosis*.

# 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Reactivos, materiales y equipos

#### 4.1.1. Reactivos

Todos los materiales se obtuvieron de diferentes casas comerciales, a través de un proveedor nacional. *Bio-Rad*: agarosa. *Cellgro*: solución amortiguadora de fosfatos (1X DPBS). *Fermont*: etanol. *IBI*: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), tris [hidroximetil]aminometano] (Tris), glicerol. *Invitrogen*: reactivo DNAzol<sup>®</sup>. *JT Baker*. ácido acético, hidróxido de sodio (NaOH), sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>). *New England Biolabs*: Marcadores de PM para ADN (*100-bp Ladder, ADNA-HindIII*). *Qiagen*: solución maestra para PCR (*Taq PCR Master Mix*). *Sigma*: azul de bromofenol, azul de xilencianol, bromuro de etidio (BrEt).

#### 4.1.2. Estuches comerciales y equipo

Un estuche comercial: *BBL*<sup>™</sup> *MycoPrep*<sup>™</sup> *Specimen Digestion/Decontamination Kit* (Becton-Dickinson),se utilizó de manera rutinaria para la clarificación (digestión y descontaminación) de los especímenes clínicos. Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un termociclador *C1000 Touch*<sup>™</sup> (*Bio-Rad*). La visualización y digitalización de los geles de agarosa teñidos con BrEt se realizó en un fotodocumentador *GelDoc*<sup>™</sup> *EZ Imager* (*Bio-Rad*).

#### 4.1.3. Oligonucleótidos sintéticos y ADN de referencia

La amplificación por PCR y secuenciación de ADN se realizaron empleando a oligonucleótidos específicos para cada gen: *rpsL*, *rrs* y *gidB* (Tabla 4-1), como iniciadores (*primers*) de la reacción de polimerización. Una muestra de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv (utilizada como ADN de referencia), fue amablemente proporcionada por la Dra. Johana Bernáldez de la Unidad de Desarrollo Biomédico del Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

Gen	Primer §	Secuencia (5′→3′)	Aplicación	
we of	MTRPSLF1	gatgcctcggatgagacgaatc		
	MTRPSLR1	taaacaatgcgctcggccag		
ipse	MTRPSLF2	cgagtttgaggcaagctatg	Secuenciación de ADN	
	MTRPSLR2	cccttcaacagaaccttgttcac	Secuenciación de ADN	
	MTRRSF1	agtggggaatattgcacaatgg	Amplificación por DCP	
	MTRRSR1	gtcctgtgcatgtcaaacccag		
113	MTRRSF2	attgcacaatgggcgcaagc	Secuenciación de ADN	
	MTRRSR2	ggtaaggttcttcgcgttgc	Secuenciación de ADN	
	MTGIDBF1	cacagacctcacgagccgg	Amplificación por DCP	
gidB	MTGIDBR1	gccccacggagcactcac		
	MTGIDBF2	ccggcggagtgcgtaatg	Sequenciación de ADN	
	MTGIDBR2	gcactcacgccgtccctc	Secuenciación de ADN	

Tabla 4-1. Oligonucleótidos (*primers*) específicos para los genes de *M. tuberculosis* asociados a la resistencia a estreptomicina.

§ Obtenidos de Eurofins Genomics LLC (Louisville, KY).

## 4.2. Muestras clínicas de *M. tuberculosis*

#### 4.2.1. Muestras

Los cultivos en medio sólido (Lowenstein-Jensen, Medio LJ) y los especímenes clínicos se obtuvieron del Laboratorio de TB del Hospital General de Tijuana (HGT), en conformidad con el protocolo aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la institución. Todos los protocolos relacionados con el manejo de muestras clínicas se realizaron dentro del Laboratorio de TB (Bioseguridad Nivel 2, BSL2), siguiendo las disposiciones normativas aplicables en materia de bioseguridad.

#### 4.2.2. Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión fueron: muestras obtenidas del periodo de enero 2017 a enero 2018, muestras de esputo o cultivo viables, muestras con tinción de Ziehl-Nielsen (ZN) positiva

y resistencia a estreptomicina (CMI> 0.8 µg/mL), cepas pertenecientes al complejo MTBC; los criterios de exclusión considerados fueron: muestra insuficiente, susceptibilidad a estreptomicina, cepas no pertenecientes al complejo MTBC, muestras no viables.

#### 4.3. Digestión y descontaminación de esputo

Dentro de una cabina BSL2, en un tubo estéril de 50 mL se mezclaron 10 mL del esputo y 10 mL de NALC-NaOH (*MycoPrep*<sup>TM</sup>). La mezcla se agitó en vórtex hasta homogeneidad y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Enseguida, la mezcla se diluyó con 30 mL de PBS (*MycoPrep*<sup>TM</sup>) y se clarificó mediante centrifugación a 300 Xg (20 min). El sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en 1-2 mL PBS.

#### 4.4. Extracción de ADN genómico

A un microtubo estéril, conteniendo 0.5 mL de DPBS, se añadieron:(i) 2-3 asadas de colonias desarrolladas en medio LJ, o (ii) 200µL de la suspensión proveniente del esputo. La lisis se llevó a cabo durante 10 min a 80°C. Después de enfriarse, se añadió 1 mL de reactivo DNAzol<sup>®</sup> y se mezcló por inversión. Los restos celulares se separaron por centrifugación a 14,500 rpm (10 min). El sobrenadante se trasladó a otro microtubo estéril y se mezcló con dos volúmenes de etanol absoluto frío.

Posterior a 10 min de reposo (temperatura ambiente), el ADN se separó por centrifugación a 14,500 rpm (10 min) y se lavó en dos ocasiones con etanol al 70% (1 min a 14,500 rpm). La pastilla, deshidratada a temperatura ambiente, se resuspendió en30 µL de NaOH a 8mM y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

## 4.5. Amplificación por PCR

Las reacciones típicas se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ L, conteniendo 10 picomoles de cada oligonucleótido (Tabla 4-1) y 1  $\mu$ L del ADN molde (prueba o referencia) en solución maestra 1X *Taq Mix*. Condiciones de termociclado: un ciclo de desnaturalización inicial [2 min a 94 °C], 45 ciclos de amplificación exponencial [20 s a 94 °C, 20 s a 55 °C, y 20 s a 72 °C], y un ciclo de extensión final [7 min a 72 °C].

## 4.6. Análisis y purificación de los amplicones

Los productos de PCR (amplicones) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (2%), conteniendo 0.5 µg/mL de BrEt. Los amplicones se visualizaron y digitalizaron usando un fotodocumentador. Los pesos moleculares se verificaron mediante contraste con marcadores de ADN comerciales. La purificación de los productos amplificados: 628 pb (*rpsL*), 645 pb (*rrs*) y 719 pb (*gidB*), se realizó empleando un estuche comercial (*QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit*) y siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

#### 4.7. Secuenciación de ADN y análisis de datos

La secuencia nucleotídica de todos los amplicones se obtuvo por el método de Sanger, usando oligonucleótidos específicos como iniciadores de reacción (Tabla 4-1) y un equipo de secuenciación de ADN: *SeqStudio™ Genetic Analyzer* (Thermo Fisher Scientific). Un análisis tipo *BLAST* (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) se utilizó como plataforma inicial para la comparación de secuencias, usando el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv como referencia. Una vez verificada, la doble cadena de ADN de todos los amplicones se analizó mediante diferentes paquetes computacionales: *SequentiX DNA Dragon-Sequence Contig Assembler* (https://www.dna-dragon.com/) y *SnapGene<sup>®</sup> Viewer* (https://www.snapgene.com/snapgeneviewer). Los alineamientos múltiples de secuencias se generaron usando el programa *Clustal Omega* (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).

### 4.8. Métodos computacionales

#### 4.8.1. Predicciones basadas en la secuencia primaria

Tres predictores bioinformáticos precisaron el efecto de la sustitución L101F en la función de *Mt*GidB: PolyPhen-2, PROVEAN y SIFT. PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) es un algoritmo que combina atributos basados en secuencia y estructura, y utiliza un clasificador bayesiano para identificar mutaciones con impacto en el fenotipo. Los niveles de predicción: probablemente (0.85-1.0) y posiblemente (0.15-0.84) dañinos son significativos (Adzhubei *et al.*, 2013, 2010; Cloete *et al.*, 2017). PROVEAN (http://provean.jcvi.org/) es un método basado en

alineamientos que estima la influencia de las mutaciones en la función proteica. La puntuación final designa la mutación como deletérea o neutra, de acuerdo con un umbral predefinido. Las variantes con una puntuación igual o inferior a -2.5 son deletéreas (Choi *et al.*, 2012; Choi and Chan, 2015). SIFT (https://sift.bii.a-star.edu.sg/) es una herramienta basada en homología de secuencias que clasifica las sustituciones de aminoácidos como mutaciones tolerantes (neutrales) o intolerantes (deletéreas). Las variantes con un valor de probabilidad igual o inferior a 0.05 son deletéreas (Sim *et al.*, 2012).

#### 4.8.2. Modelado de la proteína basado en plantillas

La estructura tridimensional (3D) de la proteína *Mt*GidB se generó mediante modelado basado en plantillas utilizando el servidor I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/), una plataforma unificada que utiliza un enfoque jerárquico para la predicción automatizada de estructuras 3D (Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015; Yang and Zhang, 2015). El valor del parámetro *C-score* (proporcionado como resultado) se utilizó como medida de la confianza predictiva de los modelos (Roy *et al.*, 2011; Zhang, 2008).

La estructura 3D mejor calificada se refinó utilizando el algoritmo ReFOLD (http://www.reading.ac.uk/bioinf/ReFOLD/), una herramienta computacional para el refinamiento de modelos guiada por estimaciones de precisión (Adiyaman and McGuffin, 2021; Shuid *et al.*, 2017), y la calidad estructural se valoró utilizando el servidor ModFold (https://www.reading.ac.uk/bioinf/ModFOLD/) (McGuffin *et al.*, 2021). La estructura terciaria propuesta para *Mt*GidB se analizó mediante el gráfico de Ramachandran en Procheck (Laskowski *et al.*, 1993) y el gráfico de valores *Z-score* de ProSA (Sippl, 1993; Wiederstein and Sippl, 2007). Las estructuras 3D se visualizaron utilizando el sistema gráfico de *UCSF Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004).

#### 4.8.3. Predicciones basadas en la estructura terciara

Cuatro métodos computacionales predijeron el efecto de la sustitución L101F sobre la estabilidad de la estructura terciaria de *Mt*GidB: DeepDDG, DUET, mCSM y SDM. DeepDDG (http://protein.org.cn/ddg.html) emplea un algoritmo basado en redes neuronales para predecir cambios en la estabilidad proteica debido a mutaciones puntuales (Cao *et al.*, 2019). DUET

(http://biosig.unimelb.edu.au/duet) predice los efectos de las mutaciones sobre la estabilidad proteica mediante la combinación de dos enfoques complementarios, para realizar una predicción de consenso (Pires *et al.*, 2016, 2014a). mCSM (http://biosig.unimelb.edu.au/mcsm) utiliza firmas basadas en gráficos para predecir el impacto de las mutaciones sobre estabilidad proteica (Pires *et al.*, 2014b). SDM (http://marid.bioc.cam.ac.uk/sdm2) aplica tablas de sustitución específicas del entorno restrictivo para predecir el efecto de una mutación y calcular el cambio en la estabilidad proteica (Pandurangan *et al.*, 2017; Worth *et al.*, 2011).

#### 4.8.4. Análisis de los contactos interatómicos

Los contactos interatómicos en el sitio polimórfico se estimaron utilizando el servidor *Arpeggio* (http://biosig.unimelb.edu.au/arpeggioweb/), una herramienta en línea para calcular las interacciones en estructuras proteicas(Jubb *et al.*, 2017). El modelo 3D propuesto para *Mt*GidB fue la estructura silvestre y su variante L101F la mutante. La red local de interacciones se analizó con el sistema PyMOL (Schrödinger, LLC). Los contactos específicos se identificaron usando el software LPC/CSU (http://oca.weizmann.ac.il/oca-bin/lpccsu) (Sobolev *et al.*, 1999).

#### 4.8.5. Simulaciones de dinámica molecular de grano grueso

Los modelos de grano grueso (CG, por sus siglas en inglés) para simulaciones de dinámica molecular(MD, por sus siglas en inglés) son un enfoque computacional efectivo para un muestreo adecuado del espacio conformacional mientras manteniendo el rigor físico (Kmiecik *et al.*, 2016). Las simulaciones CG-MD se realizaron en línea empleando el servidor UNRES (https://unres.pl/).

El modelo propuesto para *Mt*GidB se utilizó como la estructura silvestre y su variante L101F como la mutante, usando la configuración predeterminada para una dinámica de proteínas estándar. El modelo de residuo unido (UNRES, por su designación en inglés) es una representación CG altamente reducida, en la que solo están presentes dos sitios de interacción por cada residuo (la cadenas lateral y el grupo peptídico) (Czaplewski *et al.*, 2018; Liwo *et al.*, 2014; Voth, 2009). Los datos automáticos, como los gráficos de energía potencial y el radio de giro, se descargaron y analizaron tal como los generó el servidor UNRES. Los resultados de las fluctuaciones se analizaron utilizando el sistema PyMOL.

## 4.9. Declaración ética

El presente estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación (CONBIOETICA-02-CEI-001-20170526, 30 octubre 2018) del Hospital General de Tijuana. Las muestras de esputo, los extractos de ADN genómico, y los cultivos se analizaron de manera anónima. El manejo de muestras y los procedimientos subsecuentes se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados y con estricto apego a las normas éticas aplicables a los procedimientos realizados en las instituciones involucradas.

Todos los pacientes participaron de manera voluntaria. La privacidad individual se garantizó mediante la remoción de los datos personales del tubo de muestra antes de realizar cualquier análisis. Toda investigación médica se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y los Procedimientos de Buenas Prácticas Clínicas.

# 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Análisis molecular de los genes rpsL, rrs y gidB de M. tuberculosis

Pacientes con sospecha de enfermedad activa y que asistieron a la Clínica de TB del HGT para evaluación médica proporcionaron las muestras de esputo. De un período de recolección de un año, 15 aislados clínicos cumplieron los criterios de inclusión para el estudio; sin embargo, sólo se analizaron 11, ya que 4 no completaron la ronda de análisis (por insuficiencia de muestra). Usando métodos estándar para extracción de ADN genómico de *M. tuberculosis* y amplificación por PCR, se obtuvieron los amplicones esperados: 628 pb (*rpsL*), 645 pb (*rrs*) y 719 pb (*gidB*). Una vez purificados, estos fragmentos génicos se secuenciaron y analizaron adecuadamente. La Tabla 5-1 resume los resultados obtenidos.

Aislado	rpsL	Rrs	gidB	Grupo §
01R	ND	ND	301c>t (L101F)	II
02R	ND	ND	236t>c (L79S)	II
03R	ND	491c>t <sup>¶</sup>	ND	I
04R	ND	ND	ND	I
05R	ND	ND	ND	I
06R	ND	ND	ND	I
07R	ND	ND	ND	I
08R	ND	ND	37g>c (G13R); 47t>g (L16R)	II
09R	ND	ND	236t>c (L79S)	II
10R	ND	ND	301c>t (L101F)	II
11R	ND	ND	236t>c (L79S)	II

Tabla 5-1. Resultados generales del análisis molecular de los genes *rpsL*, *rrs*, y *gidB* de once aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a estreptomicina.

ND: No se detectó ninguna mutación (es decir, 100% idéntica al ADN de referencia). <sup>¶</sup>Mutación compartida con aislados sensibles a la estreptomicina. <sup>§</sup> Agrupación interna.

Como dato inicial, ninguno de los aislados mostró mutaciones en *rpsL*; es decir, la secuencia nucleotídica es totalmente idéntica al gen de referencia (Mycobrowser ID: Rv0682). Además, la mayoría (10 de 11) mostró 100% de identidad en el segmento del gen *rrs* analizado (365-978 pb), con respecto al gen de referencia (Mycobrowser ID: MTB000019). El aislado de excepción (03R) presentó la mutación 491c>t, que también se detectó en aislados susceptibles a estreptomicina, confirmando la falta de asociación genotipo-fenotipo. Cabe destacar que esta mutación representa un biomarcador epidemiológico asignado al sublinaje latinoamericano y mediterráneo 3 (LAM3) de *M. tuberculosis*(Tudo *et al.*, 2010).

Por otro lado, el análisis de *gidB* produjo resultados mixtos. Cinco aislados, 03R-07R, mostraron una secuencia 100% idéntica al gen de referencia (Mycobrowser ID: Rv3919c). Otros tres: 02R, 09R y 11R, mostraron la mutación 236t>c (que causa la sustitución de L79S). Esta variante se asocia con un fenotipo resistente a estreptomicina de bajo nivel cuando se detecta sola. Sin embargo, cuando concurre con mutaciones en otros genes (p. ej., 517c>t en *rrs* o K43R en *rpsL*), los aislados muestran resistencia significativa(Klopper *et al.*, 2020; Smittipat *et al.*, 2016; Spies *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019). Otros dos: R01 y R10, mostraron la mutación 301t>c (que causa la sustitución L101F). El conocimiento sobre esta mutación y su contribución al fenotipo es limitado. Sin embargo, una característica común de los aislados (*rrs* y *rpsL*), lo que sugiere una asociación genotipo-fenotipo genuina (Smittipat *et al.*, 2016). Por último, el aislado 08R mostró dos mutaciones, 37g>c y 47t>g (que causan las sustituciones G13R y L16R). Mientras que G13R aparenta ser una nueva mutación, L16R es un polimorfismo natural asociado con el linaje LAM (Jagielski *et al.*, 2014; Perdigão *et al.*, 2014; Smittipat *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014; Perdigão *et al.*, 2014; Smittipat *et al.*, 2016; Spies *et al.*, 2019).

## 5.2. Trascendencia del análisis molecular

Los resultados del análisis genético molecular permiten separar a los aislados clínicos de *M. tuberculosis* en dos grupos: I y II (Tabla 5-1). El grupo I incluye aquellos que carecen de mutaciones en los genes comúnmente asociados al fenotipo de resistencia a estreptomicina: *rpsL*, *rrs*, y *gidB*, y aquellos con mutaciones previamente identificadas como polimorfismos naturales (p. ej., 491c>t en *rrs*). La identificación de este grupo implica la existencia de otros genes micobacterianos asociados con este fenotipo, como lo sugieren los análisis proteómicos (Sharma and Bisht, 2017; Sharma *et al.*, 2010a, 2010b).Por otro lado, el grupo II contiene

aquellos que presentan mutaciones en *gidB* y carecen de variantes genéticas conocidas en *rpsL* y *rrs*. De manera interesante, un subgrupo se caracteriza por contener una mutación asociada a bajos niveles de resistencia (p. ej., L79S), mientras que otro se distingue por presentar una mutación novedosa: G13R o L101F.Con respecto a esto último, la sustitución G13R se localiza en el dominio N-terminal, mientras que L101F se ubica en el dominio catalítico: SAM-MTasa (metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina), dentro de la región de interacción con SAM (Martin, 2002; Schubert *et al.*, 2003; Verma *et al.*, 2014). Debido a la ausencia de reportes sobre la contribución de G13R al fenotipo, el efecto de esta mutación sobre la función de *Mt*GidB no se analizará en el presente estudio. Sin embargo, para generar conocimientos adicionales sobre las bases moleculares de la resistencia a estreptomicina en *M. tuberculosis*, se realizó un análisis computacional de la variante *Mt*GidB L101F para predecir sus consecuencias funcionales (dada la conservada relación estructura-función entre los dominios SAM-MTasa).

# 5.3. Análisis biocomputacional de la variante MtGidB L101F

# 5.3.1. Análisis estructural y funcional

Un análisis computacional basado en la estructura primaria de *Mt*GidB proporcionó la información inicial sobre el efecto de L101F sobre la función proteica (Tabla 5-2). El resultado combinado de tres herramientas bioinformáticas predijo un efecto negativo.

Método	Puntaje	Corte	Predicción §
PolyPhen-2	1.00	≥0.85	Probablemente Dañina
PROVEAN	-3.98	≤−2.5	Deletérea
SIFT	0.00	≤0.05	Afecta la Función

Tabla 5-2. Efecto de L101F sobre la función de *Mt*GidB.

§ Tal como resultó del algoritmo computacional.

El modelado basado en plantillas generó una estructura 3D confiable, la cual se utilizó para evaluar si la sustitución L101F afecta la conformación y estabilidad de *Mt*GidB. El modelo predicho mostró un valor de alta confianza (Figura 5-1A): 1.17 (rango de -5 a 2, un valor



Figura 5-1. Estructura terciaria (3D) predicha para MtGidB.

(A) Representación en listones del mejor modelo, coloreado de acuerdo con el espectro del arco iris (configuración estándar).(B) Gráfica de Ramachandran. (C) Análisis ProSA (gráfica de valores *Z*-score). Un punto negro indica el valor de *Z*-score calculado.

positivo es altamente significativo). El resultado de la valoración estructural confirmó su calidad: 0.7045 (valores  $\geq$  0.4 son significativos). Además, la gráfica de Ramachandran mostró que el 89.1% de los residuos no Gly/Pro se encuentra en regiones favorables, y un 8.7% adicional se ubica en regiones permitidas (Figura 5-1B). Por otro lado, el *Z*-score calculado para la calidad global (-6.44) está dentro del intervalo de valores típicamente estimados para proteínas de tamaño similar (Figura 5-1C).

Previo a los análisis posteriores, el modelo 3D sirvió como marco para identificar a los residuos de *Mt*GidB que interactúan con SAM: G69, S70, G71, L74, E92, P93, L94, R97, G117, R118, A119, E120, R137, y A138. Además, un análisis bioinformático basado en estructuras 3D proporcionó información específica, relativa al efecto de L101F sobre la estabilidad. De manera

conjunta, cuatro métodos computacionales y un supuesto termodinámico (Capriotti *et al.*, 2008)<sup>3</sup> confirmaron la desestabilización estructural (Tabla 5-3).

Método	ΔΔG (Kcal/mol)	Predicción §	Supuesto
DeepDDG	-1.83	Desestabilizante	Desestabilizante
DUET	-1.75	Desestabilizante	Desestabilizante
mCSM	-1.48	Desestabilizante	Desestabilizante
SDM	-1.39	Desestabilizante	Desestabilizante

Tabla 5-3. Efecto de L101F sobre la estabilidad de *Mt*GidB.

§ Tal como resultó del algoritmo computacional.

## 5.3.2. Análisis de interacciones en el sitio polimórfico

El análisis de los contactos interatómicos en el sitio polimórfico corroboró la hipótesis de desestabilización estructural (Figura 5-2): el residuo mutante (F101) establece nuevas interacciones y pierde otras, en contraste con el residuo silvestre (L101) en donde el sitio catalítico está unido a los residuos que le dan la estabilidad estructural y funcional a la metilación (G518) de la transferasa dependiente de SAM.



Figura 5-2. Contactos interatómicos entre residuos que ocurren en el sitio polimórfico.

(A) L101 (silvestre) y (B) F101 (mutante). Los residuos polimórficos se muestran en color azul-agua y los otros en las coloraciones estándar. Las interacciones no covalentes se presentan en colores predeterminados por el servidor Arpeggio.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Desestabilizante ( $\Delta\Delta G < -1.0$  Kcal /mol), Neutro ( $-1.0 \le \Delta\Delta G \le 1.0$  Kcal /mol), o Estabilizante ( $\Delta\Delta G > 1.0$  Kcal /mol).

Un análisis los contactos a nivel de unidades estructurales completó la observación anterior (Tabla 5-4). Como el residuo silvestre está involucrado en una red de contactos que incluye a G71, E92, y R97 (residuos que interactúan con SAM), es razonable sugerir que la sustitución de L101F afecta la función de *Mt*GidB alterando el sitio de unión al ligando del dominio SAM-MTasa.

Ros	iduo	Contactos específicos con L101						Contactos específicos con F101					
Residuo		D (Å)	S (Ų)	HB	Arm	Pho	DC	D (Å)	S (Ų)	HB	Arm	Pho	DC
71	Gly	4.8	4.5	_	-	-	+	3.4	33.4	-	-	-	-
72	Ala	3.5	32.3	I	-	+	+	3.2	13.9	-	-	+	-
73	Gly	3.8	7.9	I	-	-	+	3.2	26.7	I	-	-	-
90	Leu	3.7	31.4	I	-	+	-	4.1	23.1	Ι	-	+	+
92	Glu	4.9	11	I	-	+	-	3.5	28.9	-	-	-	-
97	Arg	2.9	19.4	-	-	+	+	2.9	12.6	-	-	-	+
98	Thr	3.5	20.6	I	-	-	+	3.1	31	Ι	-	-	-
100	Phe	1.3	91	+	-	+	+	1.4	82.5	+	+	-	+
102	Arg	1.4	52.5	+	-	-	+	1.3	52.9	-	-	-	+
104	Met	3.1	12.8	I	-	+	+	3.3	8.2	Ι	-	+	-
105	Val	2.8	40.7	-	-	+	+	2.8	40.6	-	-	+	-
114	lle	4.3	11.7	_	_	+	+	3.9	20	-	-	+	-

Tabla 5-4. Residuos vecinos en contacto con L101 (silvestre) o F101 (mutante) de MtGidB.

Clasificación de las interacciones no covalentes detectadas por el programa LPC/CSU. D, distancia más corta entre átomos de dos residuos; S, superficie de contacto entre dos residuos; HB, contacto hidrófilo-hidrófilo (puente de hidrógeno); Arm, contacto aromático-aromático; Pho, contacto hidrofóbico-hidrofóbico; DC, contacto hidrofóbico-hidrofílico (contacto desestabilizador); +/-, presencia/ausencia del contacto.

#### 5.3.3. Análisis de las fluctuaciones estructurales

Un enfoque de dinámica molecular de grano grueso aportó información relevante sobre la estructura de *Mt*GidB y los cambios derivados de la mutación L101F. Como dato preliminar, ambos sistemas (silvestre y mutante) mostraron estabilidad energética a lo largo de toda la simulación. Sin embargo, las gráficas del radio de giro indican que la mutante muestra mayor movilidad, comparada con la silvestre (Figura 5-3), apoyando la hipótesis: un cambio en la flexibilidad de *Mt*GidB es la consecuencia estructural de la sustitución L101F. Si se observa desde la perspectiva de la viabilidad bacteriana, la flexibilidad le da una ganancia funcional para su desarrollo.



Figura 5-3. Dinámica molecular (gráficas del radio de giro, Å) de la estructura silvestre (**A**: L101) y mutante (**B**: F101) de *Mt*GidB en una simulación de 2000 ps.

Un análisis de las fluctuaciones atómicas completó el conocimiento sobre la flexibilidad estructural de *Mt*GidB. Aunque ambos sistemas retuvieron su conformación global (a nivel de la estructura secundaria), la mutante mostró mayor flexibilidad, comparada con la silvestre (Figura 5-4 A,B), con desviaciones significativas en residuos/regiones del dominio SAM-MTasa (Figura 5-4 C). Este comportamiento sugiere que la sustitución L101F afecta a la flexibilidad de otros residuos y, por los tanto, a la estabilidad de *Mt*GidB.



Figura 5-4. Análisis de las fluctuaciones atómicas de la estructura silvestre (L101) y mutante (F101) de *Mt*GidB.

Representaciones en masilla de estructuras *Mt*GidB: (**A**) silvestre y (**B**) mutante. El color azul representa el valor más bajo para el factor B y el rojo el más alto. El calibre del tubo refleja el valor del factor B (es decir, cuanto mayor es el factor B, más grueso es el tubo). (**C**) Gráfica de las fluctuaciones por residuo (Å) estimadas para la estructura silvestre (azul) y mutante (rojo). La estructura secundaria predicha (hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$ ) para *Mt*GidB y el tramo correspondiente a su dominio SAM-MTasa están coloreadas en verde (representación PDB, panel superior).

## 5.4. Trascendencia del análisis biocomputacional

De manera global, los resultados de dinámica molecular sugieren que la mutación L101F afecta la flexibilidad y estabilidad de la estructura de *Mt*GidB. Además, como el residuo silvestre (L101) está involucrado en una red de contactos que incluye a los residuos G71, E92, y R97 (los cuales interactúan con S-adenosilmetionina), parece razonable suponer que la sustitución Leu>Phe en la posición 101 afecta la función de *Mt*GidB, alterando el sitio de unión al ligando del dominio SAM-MTasa. Sin embargo, se requiere un enfoque experimental para probar esta hipótesis y establecer con precisión la asociación genotipo-fenotipo observada en los aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a estreptomicina. Con un número mayor de aislados clínicos (muestras) con fenotipo resistente a STR, se podría analizar la relación con la mutación en gidB 301 c>t, y precisar la asociación. Algunas de las pruebas moleculares propuestas serían: PCR alelo-específico o PCR RFLP.

El análisis molecular realizado en este estudio nos da las bases para considerar la estructura de *Mt*GidB L101F como blanco farmacológico, pero para esto se requiere conocer que interviene directamente con la resistencia a estreptomicina mediante ensayos experimentales de silenciamiento y sobre expresión.

## 6. CONCLUSIONES

A partir de un escrutinio de 232 baciloscopias positivas (de pacientes con sospecha de enfermedad activa; realizado durante un año), sólo quince aislados clínicos de *M. tuberculosis* mostraron resistencia a estreptomicina: concentración mínima inhibitoria mayor a0.8 µg/mL, sugiriendo una prevalencia del 6.5% en nuestra región.

La información genética molecular obtenida de once aislados (cuatro no completaron la ronda de análisis) indica que existen dos grupos de cepas resistentes al fármaco. Un grupo no presenta mutaciones en los genes analizados (*rspL*, *rrs*, y *gidB*), implicando la participación de otros genes o mecanismos moleculares micobacterianos en la resistencia a estreptomicina. El otro grupo solo presenta mutaciones en el gen *gidB* (esto es, carente de mutaciones en *rpsL* y *rrs*), y se caracteriza por incluir tanto a los aislados que portan mutaciones asociadas con bajos niveles de resistencia (p.ej., *Mt*GidB L79S) como a los aislados que contienen mutaciones nuevas. En este subgrupo destaca la variante *Mt*GidB L101F por la ausencia de estudios que aporten conocimiento sobre su asociación con el fenotipo de resistencia a estreptomicina.

La información bioquímica sobre la relación estructura-función obtenida mediante un análisis biocomputacional de la variante *Mt*GidB L101F predice que la sustitución (leucina por fenilalanina en la posición 101 de la proteína *Mt*GidB) conduce a una alteración estructural potencialmente dañina para la función. Por otro lado, los estudios de estabilidad proteica (usando un modelo 3D como marco de referencia) confirman que el efecto de tal sustitución es una desestabilización estructural en el sitio polimórfico y su red de contactos, alterando el sitio de unión a S-adenosilmetionina en el dominio catalítico de la metiltransferasa específica para el ARNr 16S (función de GidB).

De manera global, el presente estudio ofrece conocimientos adicionales y novedosos sobre las bases moleculares de la resistencia a estreptomicina en *M. tuberculosis*, los cuales pavimentan el camino hacia el desarrollo de una técnica molecular para la detección rápida de cepas clínicas resistentes al fármaco.

# 7. BIBLIOGRAFÍA

- Adiyaman, R., McGuffin, L.J., 2021. ReFOLD3: refinement of 3D protein models with gradual restraints based on predicted local quality and residue contacts. Nucleic Acids Res. gkab300. https://doi.org/10.1093/nar/gkab300
- Adzhubei, I., Jordan, D.M., Sunyaev, S.R., 2013. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. Curr. Protoc. Hum. Genet. Chapter 7, Unit7.20. https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76
- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R., 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat. Methods 7, 248–249. https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248
- Ahmad, S., 2011. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. Clin. Dev. Immunol. 2011, 814943. https://doi.org/10.1155/2011/814943
- Alangaden, G.J., Kreiswirth, B.N., Aouad, A., Khetarpal, M., Igno, F.R., Moghazeh, S.L., Manavathu, E.K., Lerner, S.A., 1998. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 1295–1297. https://doi.org/10.1128/AAC.42.5.1295
- Alexander, D.C., Ma, J.H., Guthrie, J.L., Blair, J., Chedore, P., Jamieson, F.B., 2012. Gene sequencing for routine verification of pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: a role for pncA but not rpsA. J. Clin. Microbiol. 50, 3726–3728. https://doi.org/10.1128/JCM.00620-12
- Aubry, A., Pan, X.-S., Fisher, L.M., Jarlier, V., Cambau, E., 2004. Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 1281–1288. https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1281-1288.2004
- Beckert, P., Hillemann, D., Kohl, T.A., Kalinowski, J., Richter, E., Niemann, S., Feuerriegel, S., 2012. rplC T460C identified as a dominant mutation in linezolid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 2743–2745. https://doi.org/10.1128/AAC.06227-11
- Bello-López, J.M., León-García, G., Rojas-Bernabé, A., Fernández-Sánchez, V., García-Hernández, O., Mancilla Rámirez, J., Ibáñez-Cervantes, G., 2019. Morbidity Trends and Risk of Tuberculosis: Mexico 2007–2017. Can. Respir. J. 2019, 1–9. https://doi.org/10.1155/2019/8295261
- Blanchard, J.S., 1996. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis. Annu. Rev. Biochem. 65, 215–239. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001243
- Brodie, D., Schluger, N.W., 2005. The diagnosis of tuberculosis. Clin. Chest Med. 26, 247–271, vi. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2005.02.012
- Brossier, F., Sougakoff, W., Bernard, C., Petrou, M., Adeyema, K., Pham, A., Amy de la Breteque, D., Vallet, M., Jarlier, V., Sola, C., Veziris, N., 2015. Molecular Analysis of the *embCAB* Locus and *embR* Gene Involved in Ethambutol Resistance in Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis in France. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 4800–4808. https://doi.org/10.1128/AAC.00150-15
- Brossier, F., Veziris, N., Truffot-Pernot, C., Jarlier, V., Sougakoff, W., 2011. Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 355–360. https://doi.org/10.1128/AAC.01030-10
- Cambier, C.J., Falkow, S., Ramakrishnan, L., 2014. Host Evasion and Exploitation Schemes of Mycobacterium tuberculosis. Cell 159, 1497–1509. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.024
- Camus, J.-C., Pryor, M.J., Médigue, C., Cole, S.T., 2002. Re-annotation of the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. Microbiol. Read. Engl. 148, 2967–2973. https://doi.org/10.1099/00221287-148-10-2967

- Cao, H., Wang, J., He, L., Qi, Y., Zhang, J.Z., 2019. DeepDDG: Predicting the Stability Change of Protein Point Mutations Using Neural Networks. J. Chem. Inf. Model. 59, 1508–1514. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00697
- Capriotti, E., Fariselli, P., Rossi, I., Casadio, R., 2008. A three-state prediction of single point mutations on protein stability changes. BMC Bioinformatics 9 Suppl 2, S6. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-S2-S6
- Carette, X., Blondiaux, N., Willery, E., Hoos, S., Lecat-Guillet, N., Lens, Z., Wohlkönig, A., Wintjens, R., Soror, S.H., Frénois, F., Dirié, B., Villeret, V., England, P., Lippens, G., Deprez, B., Locht, C., Willand, N., Baulard, A.R., 2012. Structural activation of the transcriptional repressor EthR from Mycobacterium tuberculosis by single amino acid change mimicking natural and synthetic ligands. Nucleic Acids Res. 40, 3018–3030. https://doi.org/10.1093/nar/gkr1113
- Caws, M., Duy, P.M., Tho, D.Q., Lan, N.T.N., Hoa, D.V., Farrar, J., 2006. Mutations prevalent among rifampinand isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from a hospital in Vietnam. J. Clin. Microbiol. 44, 2333–2337. https://doi.org/10.1128/JCM.00330-06
- Cheng, A.F.B., Yew, W.W., Chan, E.W.C., Chin, M.L., Hui, M.M.M., Chan, R.C.Y., 2004. Multiplex PCR amplimer conformation analysis for rapid detection of gyrA mutations in fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 596–601. https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.596-601.2004
- Cheng, S.J., Thibert, L., Sanchez, T., Heifets, L., Zhang, Y., 2000. pncA mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 528–532. https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.528-532.2000
- Choi, Y., Chan, A.P., 2015. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. Bioinforma. Oxf. Engl. 31, 2745–2747. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195
- Choi, Y., Sims, G.E., Murphy, S., Miller, J.R., Chan, A.P., 2012. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. PloS One 7, e46688. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688
- Cloete, R., Akurugu, W.A., Werely, C.J., van Helden, P.D., Christoffels, A., 2017. Structural and functional effects of nucleotide variation on the human TB drug metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1. J. Mol. Graph. Model. 75, 330–339. https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.04.026
- Cole, S.T., 1999. Learning from the genome sequence of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. FEBS Lett. 452, 7–10. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00536-0
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 1998. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature 393, 537–544. https://doi.org/10.1038/31159
- Czaplewski, C., Karczyńska, A., Sieradzan, A.K., Liwo, A., 2018. UNRES server for physics-based coarsegrained simulations and prediction of protein structure, dynamics and thermodynamics. Nucleic Acids Res. 46, W304–W309. https://doi.org/10.1093/nar/gky328
- DeBarber, A.E., Mdluli, K., Bosman, M., Bekker, L.G., Barry, C.E., 2000. Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 9677–9682. https://doi.org/10.1073/pnas.97.17.9677
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., Vila, J., 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. Microb. Biotechnol. 2, 40–61. https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x
- García-Basteiro, A.L., DiNardo, A., Saavedra, B., Silva, D.R., Palmero, D., Gegia, M., Migliori, G.B., Duarte, R., Mambuque, E., Centis, R., Cuevas, L.E., Izco, S., Theron, G., 2018. Point of care diagnostics for tuberculosis. Pulmonology 24, 73–85. https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.12.002

- Hazbón, M.H., Brimacombe, M., Bobadilla del Valle, M., Cavatore, M., Guerrero, M.I., Varma-Basil, M., Billman-Jacobe, H., Lavender, C., Fyfe, J., García-García, L., León, C.I., Bose, M., Chaves, F., Murray, M., Eisenach, K.D., Sifuentes-Osornio, J., Cave, M.D., Ponce de León, A., Alland, D., 2006. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 2640–2649. https://doi.org/10.1128/AAC.00112-06
- Hillemann, D., Rüsch-Gerdes, S., Richter, E., 2008. In vitro-selected linezolid-resistant Mycobacterium tuberculosis mutants. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 800–801. https://doi.org/10.1128/AAC.01189-07
- Jagielski, T., Ignatowska, H., Bakuła, Z., Dziewit, Ł., Napiórkowska, A., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., Bielecki, J., 2014. Screening for Streptomycin Resistance-Conferring Mutations in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates from Poland. PLoS ONE 9, e100078. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100078
- Jubb, H.C., Higueruelo, A.P., Ochoa-Montaño, B., Pitt, W.R., Ascher, D.B., Blundell, T.L., 2017. Arpeggio: A Web Server for Calculating and Visualising Interatomic Interactions in Protein Structures. J. Mol. Biol. 429, 365–371. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.12.004
- Juréen, P., Werngren, J., Toro, J.-C., Hoffner, S., 2008. Pyrazinamide resistance and pncA gene mutations in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 1852–1854. https://doi.org/10.1128/AAC.00110-08
- Khosravi, A.D., Etemad, N., Hashemzadeh, M., Khandan Dezfuli, S., Goodarzi, H., 2017. Frequency of rrs and rpsL mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Iranian patients. J. Glob. Antimicrob. Resist. 9, 51–56. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.01.005
- Khosravi, A.D., Sirous, M., Abdi, M., Ahmadkhosravi, N., 2019. Characterization of the most common embCAB gene mutations associated with ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from Iran. Infect. Drug Resist. 12, 579–584. https://doi.org/10.2147/IDR.S196800
- Klopper, M., Heupink, T.H., Hill-Cawthorne, G., Streicher, E.M., Dippenaar, A., de Vos, M., Abdallah, A.M., Limberis, J., Merker, M., Burns, S., Niemann, S., Dheda, K., Posey, J., Pain, A., Warren, R.M., 2020. A landscape of genomic alterations at the root of a near-untreatable tuberculosis epidemic. BMC Med. 18, 24. https://doi.org/10.1186/s12916-019-1487-2
- Kmiecik, S., Gront, D., Kolinski, M., Wieteska, L., Dawid, A.E., Kolinski, A., 2016. Coarse-Grained Protein Models and Their Applications. Chem. Rev. 116, 7898–7936. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00163
- Konno, K., Feldmann, F.M., McDermott, W., 1967. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. Am. Rev. Respir. Dis. 95, 461–469. https://doi.org/10.1164/arrd.1967.95.3.461
- Krüüner, A., Jureen, P., Levina, K., Ghebremichael, S., Hoffner, S., 2003. Discordant resistance to kanamycin and amikacin in drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 2971– 2973. https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2971-2973.2003
- Kurz, S.G., Furin, J.J., Bark, C.M., 2016. Drug-Resistant Tuberculosis. Infect. Dis. Clin. North Am. 30, 509– 522. https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.010
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Crystallogr. 26, 283–291. https://doi.org/10.1107/S0021889892009944
- Leach, K.L., Brickner, S.J., Noe, M.C., Miller, P.F., 2011. Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1222, 49–54. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.05962.x
- Liwo, A., Baranowski, M., Czaplewski, C., Gołaś, E., He, Y., Jagieła, D., Krupa, P., Maciejczyk, M., Makowski, M., Mozolewska, M.A., Niadzvedtski, A., Ołdziej, S., Scheraga, H.A., Sieradzan, A.K., Slusarz, R., Wirecki, T., Yin, Y., Zaborowski, B., 2014. A unified coarse-grained model of biological macromolecules based on mean-field multipole-multipole interactions. J. Mol. Model. 20, 2306. https://doi.org/10.1007/s00894-014-2306-5
- Martin, J., 2002. SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. Curr. Opin. Struct. Biol. 12, 783–793. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00391-3

- McGuffin, L.J., Aldowsari, F.M.F., Alharbi, S.M.A., Adiyaman, R., 2021. ModFOLD8: accurate global and local quality estimates for 3D protein models. Nucleic Acids Res. gkab321. https://doi.org/10.1093/nar/gkab321
- Mello, F.C. de Q., Silva, D.R., Dalcolmo, M.P., 2018. Tuberculosis: where are we? J. Bras. Pneumol. 44, 82–82. https://doi.org/10.1590/s1806-37562017000000450
- Mikusová, K., Slayden, R.A., Besra, G.S., Brennan, P.J., 1995. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 2484–2489. https://doi.org/10.1128/AAC.39.11.2484
- Mitchison, D.A., 1985. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. Tubercle 66, 219–225. https://doi.org/10.1016/0041-3879(85)90040-6
- Mitchison, D.A., 1979. Basic Mechanisms of Chemotherapy. Chest 76, 771–781. https://doi.org/10.1378/chest.76.6\_Supplement.771
- Nahid, P., Mase, S.R., Migliori, G.B., Sotgiu, G., Bothamley, G.H., Brozek, J.L., Cattamanchi, A., Cegielski, J.P., Chen, L., Daley, C.L., Dalton, T.L., Duarte, R., Fregonese, F., Horsburgh, C.R., Ahmad Khan, F., Kheir, F., Lan, Z., Lardizabal, A., Lauzardo, M., Mangan, J.M., Marks, S.M., McKenna, L., Menzies, D., Mitnick, C.D., Nilsen, D.M., Parvez, F., Peloquin, C.A., Raftery, A., Schaaf, H.S., Shah, N.S., Starke, J.R., Wilson, J.W., Wortham, J.M., Chorba, T., Seaworth, B., 2019. Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. An Official ATS/CDC/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 200, e93–e142. https://doi.org/10.1164/rccm.201909-1874ST
- Nguyen, T.N.A., Anton-Le Berre, V., Bañuls, A.-L., Nguyen, T.V.A., 2019. Molecular Diagnosis of Drug-Resistant Tuberculosis; A Literature Review. Front. Microbiol. 10, 794. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00794
- Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimura, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S., Suzuki, Y., Ochi, K., 2007. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. Mol. Microbiol. 63, 1096–1106. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05585.x
- Palomino, J.C., Martin, A., 2013. Tuberculosis clinical trial update and the current anti-tuberculosis drug portfolio. Curr. Med. Chem. 20, 3785–3796. https://doi.org/10.2174/09298673113209990166
- Pandurangan, A.P., Ochoa-Montaño, B., Ascher, D.B., Blundell, T.L., 2017. SDM: a server for predicting effects of mutations on protein stability. Nucleic Acids Res. 45, W229–W235. https://doi.org/10.1093/nar/gkx439
- Parsons, L.M., Somoskövi, A., Gutierrez, C., Lee, E., Paramasivan, C.N., Abimiku, A., Spector, S., Roscigno, G., Nkengasong, J., 2011. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. Clin. Microbiol. Rev. 24, 314–350. https://doi.org/10.1128/CMR.00059-10
- Perdigão, J., Macedo, R., Machado, D., Silva, C., Jordão, L., Couto, I., Viveiros, M., Portugal, I., 2014. GidB mutation as a phylogenetic marker for Q1 cluster Mycobacterium tuberculosis isolates and intermediatelevel streptomycin resistance determinant in Lisbon, Portugal. Clin. Microbiol. Infect. 20, O278–O284. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12392
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. J. Comput. Chem. 25, 1605– 1612. https://doi.org/10.1002/jcc.20084
- Pires, D.E.V., Ascher, D.B., Blundell, T.L., 2014a. DUET: a server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach. Nucleic Acids Res. 42, W314-319. https://doi.org/10.1093/nar/gku411
- Pires, D.E.V., Ascher, D.B., Blundell, T.L., 2014b. mCSM: predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. Bioinforma. Oxf. Engl. 30, 335–342. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt691
- Pires, D.E.V., Chen, J., Blundell, T.L., Ascher, D.B., 2016. In silico functional dissection of saturation mutagenesis: Interpreting the relationship between phenotypes and changes in protein stability, interactions and activity. Sci. Rep. 6, 19848. https://doi.org/10.1038/srep19848

- Ramaswamy, S., Musser, J.M., 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance inMycobacterium tuberculosis: 1998 update. Tuber. Lung Dis. 79, 3–29. https://doi.org/10.1054/tuld.1998.0002
- Ramaswamy, S.V., Reich, R., Dou, S.-J., Jasperse, L., Pan, X., Wanger, A., Quitugua, T., Graviss, E.A., 2003. Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 1241–1250. https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1241-1250.2003
- Rawat, R., Whitty, A., Tonge, P.J., 2003. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 13881–13886. https://doi.org/10.1073/pnas.2235848100
- Rengarajan, J., Sassetti, C.M., Naroditskaya, V., Sloutsky, A., Bloom, B.R., Rubin, E.J., 2004. The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. Mol. Microbiol. 53, 275–282. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04120.x
- Richter, E., Rüsch-Gerdes, S., Hillemann, D., 2007. First linezolid-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 1534–1536. https://doi.org/10.1128/AAC.01113-06
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nat. Protoc. 5, 725–738. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5
- Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2011. A Protocol for Computer-Based Protein Structure and Function Prediction. J. Vis. Exp. 3259. https://doi.org/10.3791/3259
- Rustomjee, R., Lienhardt, C., Kanyok, T., Davies, G.R., Levin, J., Mthiyane, T., Reddy, C., Sturm, A.W., Sirgel, F.A., Allen, J., Coleman, D.J., Fourie, B., Mitchison, D.A., Gatifloxacin for TB (OFLOTUB) study team, 2008. A Phase II study of the sterilising activities of ofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis. Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis. 12, 128–138.
- Safi, H., Lingaraju, S., Amin, A., Kim, S., Jones, M., Holmes, M., McNeil, M., Peterson, S.N., Chatterjee, D., Fleischmann, R., Alland, D., 2013. Evolution of high-level ethambutol-resistant tuberculosis through interacting mutations in decaprenylphosphoryl-β-D-arabinose biosynthetic and utilization pathway genes. Nat. Genet. 45, 1190–1197. https://doi.org/10.1038/ng.2743
- Schubert, H.L., Blumenthal, R.M., Cheng, X., 2003. Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. Trends Biochem. Sci. 28, 329–335. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00090-2
- Scorpio, A., Lindholm-Levy, P., Heifets, L., Gilman, R., Siddiqi, S., Cynamon, M., Zhang, Y., 1997. Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 540–543. https://doi.org/10.1128/AAC.41.3.540
- Scorpio, A., Zhang, Y., 1996. Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat. Med. 2, 662–667. https://doi.org/10.1038/nm0696-662
- Seki, M., Choi, H.J., Kim, K., Whang, J., Sung, J., Mitarai, S., 2021. Tuberculosis: A persistent unpleasant neighbour of humans. J. Infect. Public Health S1876034121000095. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.01.005
- Seung, K.J., Keshavjee, S., Rich, M.L., 2015. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 5, a017863. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017863
- Sharma, D., Bisht, D., 2017. Secretory Proteome Analysis of Streptomycin-Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates. SLAS Discov. Adv. Life Sci. R D 22, 1229–1238. https://doi.org/10.1177/2472555217698428
- Sharma, P., Kumar, B., Gupta, Y., Singhal, N., Katoch, V.M., Venkatesan, K., Bisht, D., 2010a. Proteomic analysis of streptomycin resistant and sensitive clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. Proteome Sci. 8, 59. https://doi.org/10.1186/1477-5956-8-59

- Sharma, P., Kumar, B., Singhal, N., Katoch, V.M., Venkatesan, K., Chauhan, D.S., Bisht, D., 2010b. Streptomycin induced protein expression analysis in Mycobacterium tuberculosis by two-dimensional gel electrophoresis & mass spectrometry. Indian J. Med. Res. 132, 400–408.
- Shuid, A.N., Kempster, R., McGuffin, L.J., 2017. ReFOLD: a server for the refinement of 3D protein models guided by accurate quality estimates. Nucleic Acids Res. 45, W422–W428. https://doi.org/10.1093/nar/gkx249
- Sim, N.-L., Kumar, P., Hu, J., Henikoff, S., Schneider, G., Ng, P.C., 2012. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. Nucleic Acids Res. 40, W452-457. https://doi.org/10.1093/nar/gks539
- Simons, S.O., Mulder, A., van Ingen, J., Boeree, M.J., van Soolingen, D., 2013. Role of rpsA gene sequencing in diagnosis of pyrazinamide resistance. J. Clin. Microbiol. 51, 382. https://doi.org/10.1128/JCM.02739-12
- Sippl, M.J., 1993. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Proteins Struct. Funct. Genet. 17, 355–362. https://doi.org/10.1002/prot.340170404
- Smittipat, N., Juthayothin, T., Billamas, P., Jaitrong, S., Rukseree, K., Dokladda, K., Chaiyasirinroje, B., Disratthakit, A., Chaiprasert, A., Mahasirimongkol, S., Yanai, H., Yamada, N., Tokunaga, K., Palittapongarnpim, P., 2016. Mutations in rrs, rpsL and gidB in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Thailand. J. Glob. Antimicrob. Resist. 4, 5–10. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.11.009
- Sobolev, V., Sorokine, A., Prilusky, J., Abola, E.E., Edelman, M., 1999. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. Bioinforma. Oxf. Engl. 15, 327–332.
- Somoskovi, A., Parsons, L.M., Salfinger, M., 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. Respir. Res. 2, 164–168. https://doi.org/10.1186/rr54
- Sowajassatakul, A., Prammananan, T., Chaiprasert, A., Phunpruch, S., 2014. Molecular characterization of amikacin, kanamycin and capreomycin resistance in M/XDR-TB strains isolated in Thailand. BMC Microbiol. 14, 165. https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-165
- Spies, F.S., Ribeiro, A.W., Ramos, D.F., Ribeiro, M.O., Martin, A., Palomino, J.C., Rossetti, M.L.R., da Silva, P.E.A., Zaha, A., 2011. Streptomycin Resistance and Lineage-Specific Polymorphisms in Mycobacterium tuberculosis gidB Gene. J. Clin. Microbiol. 49, 2625–2630. https://doi.org/10.1128/JCM.00168-11
- Sreevatsan, S., Stockbauer, K.E., Pan, X., Kreiswirth, B.N., Moghazeh, S.L., Jacobs, W.R., Telenti, A., Musser, J.M., 1997. Ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis: critical role of embB mutations. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 1677–1681. https://doi.org/10.1128/AAC.41.8.1677
- Sulis, G., Roggi, A., Matteelli, A., Raviglione, M.C., 2014. Tuberculosis: Epidemiology and Control. Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis. 6, e2014070. https://doi.org/10.4084/mjhid.2014.070
- Sun, H., Zhang, C., Xiang, L., Pi, R., Guo, Z., Zheng, C., Li, S., Zhao, Y., Tang, K., Luo, M., Rastogi, N., Li, Y., Sun, Q., 2016. Characterization of mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Sichuan, China and the association between Beijing-lineage and dual-mutation in gidB. Tuberculosis 96, 102–106. https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.09.004
- Sun, Z., Zhang, J., Zhang, X., Wang, S., Zhang, Y., Li, C., 2008. Comparison of gyrA gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains and clinical isolates. Int. J. Antimicrob. Agents 31, 115–121. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.10.014
- Suzuki, Y., Katsukawa, C., Tamaru, A., Abe, C., Makino, M., Mizuguchi, Y., Taniguchi, H., 1998. Detection of kanamycin-resistant Mycobacterium tuberculosis by identifying mutations in the 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol. 36, 1220–1225. https://doi.org/10.1128/JCM.36.5.1220-1225.1998
- Takayama, K., Kilburn, J.O., 1989. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in Mycobacterium smegmatis. Antimicrob. Agents Chemother. 33, 1493–1499. https://doi.org/10.1128/AAC.33.9.1493
- Takiff, H.E., Salazar, L., Guerrero, C., Philipp, W., Huang, W.M., Kreiswirth, B., Cole, S.T., Jacobs, W.R., Telenti, A., 1994. Cloning and nucleotide sequence of Mycobacterium tuberculosis gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. Antimicrob. Agents Chemother. 38, 773–780. https://doi.org/10.1128/AAC.38.4.773

- Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T., Lowrie, D., Colston, M.J., Cole, S., 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. The Lancet 341, 647–651. https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90417-F
- Telenti, Amalio, Philipp, W.J., Sreevatsan, S., Bernasconi, C., Stockbauer, K.E., Wieles, B., Musser, J.M., Jacobs, W.R., 1997. The emb operon, a gene cluster of Mycobacterium tuberculosis involved in resistance to ethambutol. Nat. Med. 3, 567–570. https://doi.org/10.1038/nm0597-567
- Telenti, A., Philipp, W.J., Sreevatsan, S., Bernasconi, C., Stockbauer, K.E., Wieles, B., Musser, J.M., Jacobs, W.R., 1997. The emb operon, a gene cluster of Mycobacterium tuberculosis involved in resistance to ethambutol. Nat. Med. 3, 567–570. https://doi.org/10.1038/nm0597-567
- Thida Oo, N.A., San, L.L., Thapa, J., Aye, K.S., Aung, W.W., Nakajima, C., Suzuki, Y., 2018. Characterization of mutations conferring streptomycin resistance to multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Myanmar. Tuberculosis 111, 8–13. https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.05.003
- Tudo, G., Rey, E., Borrell, S., Alcaide, F., Codina, G., Coll, P., Martin-Casabona, N., Montemayor, M., Moure, R., Orcau, A., Salvado, M., Vicente, E., Gonzalez-Martin, J., 2010. Characterization of mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the area of Barcelona. J. Antimicrob. Chemother. 65, 2341–2346. https://doi.org/10.1093/jac/dkq322
- van Crevel, R., Ottenhoff, T.H.M., van der Meer, J.W.M., 2002. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. Clin. Microbiol. Rev. 15, 294–309. https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.294-309.2002
- Verma, J.S., Gupta, Y., Nair, D., Manzoor, N., Rautela, R.S., Rai, A., Katoch, V.M., 2014. Evaluation of gidB alterations responsible for streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. J. Antimicrob. Chemother. 69, 2935–2941. https://doi.org/10.1093/jac/dku273
- Vilchèze, C., Av-Gay, Y., Attarian, R., Liu, Z., Hazbón, M.H., Colangeli, R., Chen, B., Liu, W., Alland, D., Sacchettini, J.C., Jacobs, W.R., 2008. Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in Mycobacterium tuberculosis. Mol. Microbiol. 69, 1316–1329. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06365.x
- Voth, G.A. (Ed.), 2009. Coarse-graining of condensed phase and biomolecular systems. CRC Press, Boca Raton.
- Wang, Y., Li, Q., Gao, H., Zhang, Z., Liu, Y., Lu, J., Dai, E., 2019. The roles of rpsL, rrs, and gidB mutations in predicting streptomycin-resistant drugs used on clinical Mycobacterium tuberculosis isolates from Hebei Province, China. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 12, 2713–2721.
- Wiederstein, M., Sippl, M.J., 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in threedimensional structures of proteins. Nucleic Acids Res. 35, W407–W410. https://doi.org/10.1093/nar/gkm290
- Wong, S.Y., Lee, J.S., Kwak, H.K., Via, L.E., Boshoff, H.I.M., Barry, C.E., 2011. Mutations in *gidB* Confer Low-Level Streptomycin Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 2515– 2522. https://doi.org/10.1128/AAC.01814-10
- World Health Organization, 2020. Global Tuberculosis Report 2020. WHO Geneva ISBN 978-92-4-001313-1.
- World Health Organization, 2019. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. WHO: Geneva Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- World Health Organization, Global Tuberculosis Programme, 2016. WHO treatment guidelines for drugresistant tuberculosis: 2016 update.
- Worth, C.L., Preissner, R., Blundell, T.L., 2011. SDM--a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. Nucleic Acids Res. 39, W215-222. https://doi.org/10.1093/nar/gkr363
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nat. Methods 12, 7–8. https://doi.org/10.1038/nmeth.3213
- Yang, J., Zhang, Y., 2015. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. Nucleic Acids Res. 43, W174-181. https://doi.org/10.1093/nar/gkv342

- Zaunbrecher, M.A., Sikes, R.D., Metchock, B., Shinnick, T.M., Posey, J.E., 2009. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 20004–20009. https://doi.org/10.1073/pnas.0907925106
- Zhang, Y., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics 9, 40. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40
- Zhang, Y., 2005. The magic bullets and tuberculosis drug targets. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45, 529–564. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.100120
- Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., Cole, S., 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. Nature 358, 591–593. https://doi.org/10.1038/358591a0
- Zhao, F., Wang, X.-D., Erber, L.N., Luo, M., Guo, A., Yang, S., Gu, J., Turman, B.J., Gao, Y., Li, D., Cui, Z., Zhang, Z., Bi, L., Baughn, A.D., Zhang, X.-E., Deng, J.-Y., 2014. Binding pocket alterations in dihydrofolate synthase confer resistance to para-aminosalicylic acid in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 1479–1487. https://doi.org/10.1128/AAC.01775-13
- Zheng, J., Rubin, E.J., Bifani, P., Mathys, V., Lim, V., Au, M., Jang, J., Nam, J., Dick, T., Walker, J.R., Pethe, K., Camacho, L.R., 2013. para-Aminosalicylic acid is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem. 288, 23447–23456. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.475798

# 8. ANEXO

Álvaro Rodríguez-García, Rosa E. Mares-Alejandre, Patricia L. A. Muñoz-Muñoz, Samuel Ruvalcaba-Ruiz, Ricardo A. González-Sánchez, Johanna Bernáldez-Sarabia, Samuel G. Meléndez-López, Alexei F. Licea-Navarro, Marco A. Ramos-Ibarra. Antibiotics 2021; 10(7): 807. PMID: 34356728; PMCID: PMC8300841; DOI: 10.3390/antibiotics10070807.





# Article Molecular Analysis of Streptomycin Resistance Genes in Clinical Strains of *Mycobacterium tuberculosis* and Biocomputational Analysis of the *Mt*GidB L101F Variant

Álvaro Rodríguez-García <sup>1,2</sup>, Rosa E. Mares-Alejandre <sup>1,\*</sup>, Patricia L. A. Muñoz-Muñoz <sup>1</sup>, Samuel Ruvalcaba-Ruiz <sup>2</sup>, Ricardo A. González-Sánchez <sup>3</sup>, Johanna Bernáldez-Sarabia <sup>3</sup>, Samuel G. Meléndez-López <sup>1</sup>, Alexei F. Licea-Navarro <sup>3</sup> and Marco A. Ramos-Ibarra <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Biotechnology and Biosciences Research Group, Faculty of Chemical Sciences and Engineering, Autonomous University of Baja California, Tijuana 22390, Mexico; alvaro.rodriguez@uabc.edu.mx (Á.R.-G.); lilian.munoz.munoz@uabc.edu.mx (P.L.A.M.-M.); samuelmelendez@uabc.edu.mx (S.G.M.-L.)
- <sup>2</sup> Clinical Diagnostic Laboratory, General Hospital of Tijuana, Tijuana 22010, Mexico; samuelruvalcaba6@hotmail.com
- <sup>3</sup> Department of Biomedical Innovation, Center for Scientific Research and Higher Education at Ensenada, Ensenada 22860, Mexico; ragonzal@cicese.mx (R.A.G.-S.); jbernald@cicese.mx (J.B.-S.); alicea@cicese.mx (A.F.L.-N.)
- Correspondence: rmares@uabc.edu.mx (R.E.M.-A.); mramos@uabc.edu.mx (M.A.R.-I.)

**Abstract:** Globally, tuberculosis (TB) remains a prevalent threat to public health. In 2019, TB affected 10 million people and caused 1.4 million deaths. The major challenge for controlling this infectious disease is the emergence and spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of TB. The antibiotic streptomycin is not a current first-line anti-TB drug. However, WHO recommends its use in patients infected with a streptomycin-sensitive strain. Several mutations in the *M. tuberculosis rpsL*, *rrs* and *gidB* genes have proved association with streptomycin resistance. In this study, we performed a molecular analysis of these genes in clinical isolates to determine the prevalence of known or novel mutations. Here, we describe the genetic analysis outcome. Furthermore, a biocomputational analysis of the *Mt*GidB L101F variant, the product of a novel mutation detected in *gidB* during molecular analysis, is also reported as a theoretical approach to study the apparent genotype-phenotype association.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis;* streptomycin resistance; molecular analysis; biocomputational analysis; clinical isolates

#### 1. Introduction

Worldwide, tuberculosis (TB) is among the top 10 causes of death and the leading disease caused by a single infectious agent, *Mycobacterium tuberculosis*, ranking above HIV/AIDS [1,2]. TB control has become a global challenge due to the continued emergence of multidrug-resistant (MDR) strains [3,4]. Precise identification of such strains demands bacterial confirmation and drug resistance assessment using culture methods, molecular analysis and DNA sequencing [5,6]. Moreover, patients with MDR-TB require intensive treatment for at least nine months (up to 20 months), supported by constant pharmacovigilance to reduce adverse events [7,8].

Streptomycin (Str) was the first antibiotic used for the therapeutic control of TB [9,10]. However, drug-associated side effects and the emergence of Str-resistant (Str<sup>R</sup>) strains prompted its removal from the group of first-line anti-TB drugs [11–13]. Despite this, WHO recommends using it in patients infected with a confirmed Str-susceptible strain [8,14,15]. Str is active against growing bacteria by inhibiting protein synthesis. It acts through irreversible binding to S12 protein and 16S rRNA, two molecular constituents of the small subunit of bacterial ribosomes [13,16].



Citation: Rodríguez-García, Á.; Mares-Alejandre, R.E.; Muñoz-Muñoz, P.L.A.; Ruvalcaba-Ruiz, S.; González-Sánchez, R.A.; Bernáldez-Sarabia, J.; Meléndez-López, S.G.; Licea-Navarro, A.F.; Ramos-Ibarra, M.A. Molecular Analysis of Streptomycin Resistance Genes in Clinical Strains of *Mycobacterium tuberculosis* and Biocomputational Analysis of the *Mt*GidB L101F Variant. *Antibiotics* **2021**, *10*, 807. https://doi.org/ 10.3390/antibiotics10070807

Academic Editor: Danila V. Zimenkov

Received: 1 June 2021 Accepted: 30 June 2021 Published: 2 July 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/). Mutations in the *M. tuberculosis rpsL, rrs* and *gidB* genes, respectively, encoding the ribosomal protein S12, 16S rRNA and glucose-inhibited division protein B, have been associated with Str resistance [13,17–21]. The non-synonymous substitutions K43R and K88R in *rpsL* and nucleotide variations in the «530 loop» and «912 region» of 16S rRNA are the most frequent Str<sup>R</sup>-linked mutations. Remarkably, non-synonymous substitutions in *gidB* are usually associated with low-resistance levels [19–25].

The *gidB* gene product is an S-adenosylmethionine (SAM)-dependent 7-methylguanosine methyltransferase specific for 16S rRNA [26]. In particular, the GidB-catalyzed methylation occurs at nucleoside G527 of the *E. coli* 16S rRNA, which corresponds to G518 in the *M. tuberculosis* counterpart [27]. Thus, given that Str interacts with such a nucleoside, an impaired GidB function would affect the G518 methylation status of *M. tuberculosis* 16S rRNA, interfering with drug binding and, consequently, producing the observed Str<sup>R</sup> phenotype [21,25–28].

Herein, we performed a molecular analysis of the *rpsL*, *rrs* and *gidB* genes in clinical isolates of *M. tuberculosis* that showed a noticeable Str<sup>R</sup> phenotype to determine the current prevalence of known or novel mutations in our region. The combined outcome of DNA sequencing and gene comparisons allowed us to identify point mutations associated with such drug resistance. Furthermore, a biocomputational analysis was used as a theoretical approach to study the apparent genotype-phenotype association observed in two Str<sup>R</sup> isolates containing the 301c>t mutation in *gidB*, which produces the non-synonymous substitution L101F in the gene product.

#### 2. Results and Discussion

#### 2.1. Molecular Analysis of the M. tuberculosis rpsL, rrs and gidB Genes

Patients suspected of having active TB disease who attended the GHT's TB Clinic provided the sputum samples. From a collection period of one year, 11 clinical isolates met the inclusion criteria for this study: positive Ziehl-Nielsen (ZN) staining and streptomycin resistance (minimum inhibitory concentration, MIC > 0.8  $\mu$ g/mL). Using standard molecular methods for *M. tuberculosis* gDNA extraction and PCR amplification, the expected gene fragments for molecular analysis: 628 bp (*rpsL*), 645 bp (*rrs*) and 719 bp (*gidB*), were obtained. Once purified, the amplicons were sequenced and analyzed with various bioinformatics tools: NCBI's BLAST, SequentiX's DNA Dragon, SnapGene<sup>®</sup> Viewer and EBI's Clustal Omega. Table 1 summarizes the data obtained from dsDNA sequencing and gene analysis.

Isolate ID	rpsL	rrs	gidB	Group §
01R	ND	ND	301c>t (L101F)	II
02R	ND	ND	236t>c (L79S)	II
03R	ND	491c>t *	ND	Ι
04R	ND	ND	ND	Ι
05R	ND	ND	ND	Ι
06R	ND	ND	ND	Ι
07R	ND	ND	ND	Ι
08R	ND	ND	37g>c (G13R); 47t>g (L16R)	II
09R	ND	ND	236t>c (L79S)	II
10R	ND	ND	301c>t (L101F)	II
11R	ND	ND	236t>c (L79S)	II

**Table 1.** Overall results of the molecular analysis of *rpsL*, *rrs* and *gidB* genes from 11 clinical isolates of *M*. *tuberculosis* showing resistance to streptomycin.

ND: no mutation detected (i.e., 100% identical to the reference DNA sequence). \* Mutation shared with streptomycin-sensitive clinical isolates. <sup>§</sup> Grouped by in-house criteria.

As initial analysis of the molecular results, none of the Str<sup>R</sup> isolates showed mutations in *rpsL*, i.e., fully identical to the reference gene sequence (Mycobrowser ID: Rv0682). Furthermore, most of them (10 out of 11) showed 100% identity within the 365–978 nucleotide

segment of the reference *rrs* gene (Mycobrowser ID: MTB000019). The exception isolate (03R) showed the 491c>t mutation, which was also detected in Str-susceptible isolates, confirming a lack of genotype-phenotype association. Moreover, it represents an epidemiological biomarker assigned to the *M. tuberculosis* Latin American and Mediterranean sublineage 3 (LAM3) [28].

In contrast, the *gidB* analysis produced mixed results. Five isolates, 03R-07R, showed sequences 100% identical to the reference (Mycobrowser ID: Rv3919c). Another three: 02R, 09R and 11R, showed the 236t>c mutation (causing the L79S substitution). This variant is associated with a low-level Str<sup>R</sup> phenotype when detected as a sole mutation. However, when concurring with mutations in other genes (e.g., *rrs* 517c>t or *rpsL* K43R), isolates exhibit significant resistance to Str [24,29–31]. Two others (R01 and R10) showed the 301t>c mutation (causing the L101F substitution). Knowledge about this gene variant and its contribution to the phenotype is limited. However, a common feature of Str<sup>R</sup> isolates containing such a variation is the absence of mutations in their *rrs* and *rpsL* genes, suggesting a genuine association with the observed phenotype [29]. Lastly, isolate 08R showed two mutations, 37g>c and 47t>g, causing the G13R and L16R substitutions. While G13R seems to be a novel mutation, L16R is a natural polymorphism associated with the LAM lineage [20,24,29,31,32].

#### 2.2. Significance of the Molecular Analysis

So far, the observed results allow us to separate the analyzed Str<sup>R</sup> isolates into two groups (I and II, Table 1). Group I comprises of those lacking mutations in the commonly associated genes (i.e., *rpsL*, *rrs* and *gidB*) and those with mutations previously identified as polymorphisms (e.g., 491c>t in *rrs*). Interestingly, the identification of this group implies the existence of additional genes associated with the phenotype, as suggested by proteomic analyses [33–35]. On the other hand, group II includes those containing mutations in *gidB* and lacking known genetic variations in *rpsL* and *rrs*. Furthermore, while a subset of this group involves those carrying a mutation associated with a low level of resistance (i.e., L79S), another subset contains those revealing either G13R or L101F as a novel non-synonymous substitution.

Regarding the latter, G13R is within the N-terminal domain, and L101F is in the SAM-dependent methyltransferase (SAM-MTase) domain, within the SAM-interacting region [25,36,37]. As there is no prior evidence regarding the G13R genotype contribution to the Str<sup>R</sup> phenotype, the effect of such a mutation on *Mt*GidB function will not be analyzed further. However, to gain additional knowledge on the molecular basis of Str resistance in *M. tuberculosis*, we performed a biocomputational analysis of the *Mt*GidB L101F variant to predict its functional consequences (given the conserved structure-function relationship among SAM-MTase domains).

# 2.3. Biocomputational Analysis of the M. tuberculosis GidB L101F Variant2.3.1. Structural and Functional Analysis

A primary structure-based biocomputational analysis of *Mt*GidB provided the initial information about the effect of the L101F substitution on protein function (Table 2). The combined results of three bioinformatics tools predicted a negative effect of such a mutation on *Mt*GidB function.

Method	Score	Cutoff	Prediction
PolyPhen-2	1.00	$\geq 0.85$	Probably Damaging
PROVEAN	-3.98	$\leq -2.5$	Deleterious
SIFT	0.00	$\leq 0.05$	Affect Function

 Table 2. Effect of L101F substitution on MtGidB function.

Template-based modeling resulted in a reliable 3D structure to test whether L101F affects the functional conformation of *Mt*GidB, as suggested before. The predicted 3D

model showed a high confidence score (Figure 1A): 1.17 (in the range -5 to 2, a higher value means high confidence). After refinement, the quality assessment result validated its structural accuracy: a global score of 0.7045 (values  $\geq 0.4$  are good scores). Furthermore, the Ramachandran plot showed that 89.1% of the non-Gly/Pro residues are in the most favored regions plus an additional 8.7% in allowed regions (Figure 1B). In addition, the estimated Z-score for overall quality, -6.44, is within the range of values typically found for proteins of similar size (Figure 1C).



**Figure 1.** Predicted tertiary structure for *Mt*GidB. (**A**) Best 3D model (ribbon representation, rainbow-colored using default settings). (**B**) Ramachandran plot. (**C**) ProSA analysis (Z-score plot). A black dot denotes the estimated Z-Score.

Before further structure-function analysis, the predicted model served as a framework to identify the presumed SAM-interacting residues: G69, S70, G71, L74, E92, P93, L94, R97, G117, R118, A119, E120, R137 and A138. A tertiary structure-based bioinformatic analysis of the *Mt*GidB 3D model provided additional knowledge about the effect of the L101F substitution on protein stability. Overall, four biocomputational methods, along with a thermodynamic assumption: destabilizing ( $\Delta\Delta G < -1.0$  Kcal/mol), neutral ( $-1.0 \leq \Delta\Delta G \leq 1.0$  Kcal/mol) and stabilizing ( $\Delta\Delta G > 1.0$  Kcal/mol) [38], confirmed structural destabilization (Table 3).

lable 3. Effect of L101F substitution on MtGidB stability.
--

Method	$\Delta\Delta G$ (Kcal/mol)	Prediction §	Assumption
DeepDDG	-1.83	Destabilizing	Destabilizing
DUET	-1.75	Destabilizing	Destabilizing
mCSM	-1.48	Destabilizing	Destabilizing
SDM	-1.39	Destabilizing	Destabilizing

§ As returned by the computational algorithm.

#### 2.3.2. Polymorphic Site Interaction Analysis

The analysis of interatomic contacts at the polymorphic site provided further insights into the local interactions and changes derived from residue substitution (Figure 2). In this regard, a comparative examination of the respective networks of non-covalent bonds revealed that the mutant residue (F101) establishes new interactions and loses others, in contrast to the wild-type (L101). A supplementary analysis of interatomic contacts of structural units confirmed this observation (Table 4). Furthermore, as L101 is involved in a residue contact network that includes SAM-interacting residues (i.e., G71, E92 and R97), it seems reasonable to suggest that the L101F substitution affects the *Mt*GidB function by altering the ligand-binding site of the SAM-MTase domain.



**Figure 2.** Interatomic contacts among residues that occur at the polymorphic site: (**A**) L101 (wild-type) and (**B**) F101 (mutant). Polymorphic residues (sticks) are depicted in cyan, while the others are displayed using the element-coloring settings. Non-covalent interactions are presented in default colors, as stated in the Arpeggio server.

р	• 1	Specific Contacts with L101					Specific Contacts with F101						
Kesidue	D (Å)	S (Å <sup>2</sup> )	HB	Arm	Pho	DC	D (Å)	S (Å <sup>2</sup> )	HB	Arm	Pho	DC	
71	Gly	4.8	4.5	_	_	_	+	3.4	33.4	_	_	_	_
72	Ala	3.5	32.3	_	_	+	+	3.2	13.9	_	_	+	_
73	Gly	3.8	7.9	_	_	_	+	3.2	26.7	_	_	_	_
90	Leu	3.7	31.4	_	_	+	_	4.1	23.1	_	_	+	+
92	Glu	4.9	11	_	_	+	_	3.5	28.9	_	_	_	_
97	Arg	2.9	19.4	_	_	+	+	2.9	12.6	_	_	_	+
98	Thr	3.5	20.6	_	—	_	+	3.1	31	—	_	—	_
100	Phe	1.3	91	+	_	+	+	1.4	82.5	+	+	_	+
102	Arg	1.4	52.5	+	_	_	+	1.3	52.9	_	_	_	+
104	Met	3.1	12.8	_	—	+	+	3.3	8.2	—	_	+	_
105	Val	2.8	40.7	_	—	+	+	2.8	40.6	—	_	+	_
114	Ile	4.3	11.7	_	—	+	+	3.9	20	—	_	+	_

**Table 4.** Residues in contact with L101 (wild-type) or F101 (mutant) in the *Mt*GidB 3D structure. Classification of non-covalent interactions as detected by the LPC/CSU software program.

D, the nearest distance between atoms of two residues; S, contact surface area between two residues; HB, hydrophilic-hydrophilic contact (hydrogen bond); Arm, aromatic-aromatic contact; Pho, hydrophobic-hydrophobic contact; DC, hydrophobic-hydrophilic contact (destabilizing contact); +/-, presence/absence of a specific contact.

#### 2.3.3. Protein Dynamics Analysis

Molecular dynamics (MD) simulations are commonly applied to study protein mobility and flexibility [39,40]. Using coarse-grained (CG) models as reduced representations of protein residues, this theoretical approach provided additional knowledge about the conformational structure of *Mt*GidB and its changes due to the L101F substitution in a 2000 ps time frame. Interestingly, both systems (wild-type and mutant) depicted a short phase of continuous decrease in the UNRES (united residue) potential energy followed by an apparent steady-state, which remained until the simulation end (Figure 3A,B). However, the radius of gyration plots showed that the mutant system exhibits a higher degree of structural mobility than the wild-type system (Figure 3C,D), supporting the hypothesis that implies changes in local flexibility are the consequence of the L101F mutation on the *Mt*GidB conformation.



**Figure 3.** MD analysis of the wild-type (WT, L101) and mutant (MU, F101) systems (*Mt*GidB) in a 2000-ps simulation. Plots of potential energy (Kcal/mol) for WT (**A**) and MU (**B**). Plots of the radius of gyration (Å) for WT (**C**) and MU (**D**).

Supplementary analysis of atomic fluctuations completed the knowledge on residuebased flexibility. Even though both retained the secondary structure, the mutant system showed increased overall flexibility than the wild-type system (Figure 4A,B), with significant deviations in residues and regions of the SAM-MTase domain (Figure 4C). This structural behavior suggests that the L101F substitution indirectly affects the flexibility of other residues and, thus, the global *Mt*GidB structural stability.



**Figure 4.** Analysis of atomic fluctuations. Cartoon putty representations of *Mt*GidB structures: (**A**) wild-type (WT, L101) and (**B**) mutant (MU, F101). Blue represents the lowest value for B-factor and red the highest. The size of the tube reflects the value of the B-factor (i.e., the larger the B-factor, the thicker the tube). (**C**) A plot of the residue-based fluctuations (Å) estimated for WT (blue) and MU (red). The predicted secondary structure ( $\alpha$ -helices and  $\beta$ -strands) for *Mt*GidB and the stretch corresponding to its SAM-MTase domain are colored green (PDB representation, top panel).

#### 2.4. Significance of the Biocomputational Analysis

Overall, the MD results suggest that the L101F mutation affects the flexibility and stability of the *Mt*GidB structure, probably due to local and global intramolecular perturbations. Furthermore, as the L101 residue is involved in a contact network that includes SAM-interacting residues (i.e., G71, E92 and R97), it seems reasonable to suggest that the Leu>Phe substitution at position 101 affects the *Mt*GidB function by altering the ligand-binding site of the SAM-MTase domain. However, an experimental approach is required to test the latter hypothesis and accurately establish the genotype-phenotype association observed in the clinical isolates of *M. tuberculosis*.

#### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Sample Collection and Mycobacteriological Analysis

Sputum samples from patients suspected of having active TB were collected at the TB Clinic of the General Hospital of Tijuana (GHT) by qualified personnel. All samples were digested-decontaminated using a BBL MycoPrep<sup>TM</sup> System (Becton Dickinson). The mycobacteriological analyses and drug-susceptibility assays were performed at the TB Diagnostic Unit (GHT), using standard protocols. Out of 157 independent samples from a one-year collection period, 11 tested positive for two inclusion criteria: acid-fast bacilli by Ziehl-Nielsen (ZN) staining and Str-resistant (MIC > 0.8  $\mu$ g/mL) by MGIT analysis (BACTEC 960 System, Becton Dickinson). In this case, 15 ZN-positive Str-sensitive samples, selected at random, were used as controls. Sample handling and subsequent procedures were according to standard protocols approved by the GHT's Ethics Committee.

#### 3.2. Molecular Methods

#### 3.2.1. Mycobacterial DNA Extraction

Genomic DNA was isolated using the DNAzol reagent (Becton Dickinson) and the protocol recommended by the manufacturer. Briefly, 0.2 mL of MycoPrep's sediment and 0.5 mL of 1X Dulbecco's PBS solution were mixed, and bacterial lysis was completed by heating at 80 °C (10 min). After cooling for 1 min on an ice bath, 1 mL of DNAzol reagent was added, mixed thoroughly, and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min (to remove cell debris). The supernatant was mixed with 0.5 mL of cold ethanol and then centrifuged for 10 min at 14,500 rpm. The precipitated DNA was air-dried for 10 min and then dissolved in 30  $\mu$ L of 8 mL NaOH.

#### 3.2.2. PCR Amplification of Gene Fragments

Typical PCR reactions (20 µL) contained 10 picomoles of each primer (i.e., Fw/Rv) and 1 µL of template DNA in 1X *Taq* Master Mix (New England Biolabs). Table 5 lists the synthetic oligonucleotides used as primers for PCR amplification of the *M. tuberculosis rpsL, rrs, gidB* gene fragments. Reactions were completed in a C1000 Touch<sup>TM</sup> Thermal Cycler (Biorad) using the following settings: an initial denaturation step (2 min at 94 °C), 45 cycles of exponential amplification (20 s at 94 °C, 20 s at 55 °C, 20 s at 72 °C) and a final extension step (7 min at 72 °C). A reaction lacking template DNA was used as a negative control, while another containing *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA (1 ng) was positive (and reference DNA for comparative purposes).

#### 3.2.3. Analysis and Purification of Amplicons

The amplification products were analyzed by 2.0% agarose gel electrophoresis, using EtBr as a fluorescent dye (0.5  $\mu$ g/mL, final), and visualized/documented with a GelDoc<sup>TM</sup> EZ Imager (Biorad). The 100-bp DNA Ladder and  $\lambda$ -DNA/HindIII Digest (New England Biolabs) were the DNA markers used to assess molecular weights. The amplicons: 628 bp for *rpsL*, 645 bp for *rrs* and 719 bp for *gidB*, were purified using a QIAquick PCR Purification Kit, as recommended by the manufacturer (Qiagen).

Gene	Primer <sup>§</sup>	Sequence (5 $' { ightarrow} 3'$ )	Application
rpsL	MTRPSLF1	gatgcctcggatgagacgaatc	PCR amplification
	MTRPSLR1	taaacaatgcgctcggccag	PCR amplification
	MTRPSLF2	cgagtttgaggcaagctatg	DNA sequencing
	MTRPSLR2	cccttcaacagaaccttgttcac	DNA sequencing
rrs	MTRRSF1	agtggggaatattgcacaatgg	PCR amplification
	MTRRSR1	gtcctgtgcatgtcaaacccag	PCR amplification
	MTRRSF2	attgcacaatgggcgcaagc	DNA sequencing
	MTRRSR2	ggtaaggttcttcgcgttgc	DNA sequencing
gidB	MTGIDBF1	cacagacctcacgagccgg	PCR amplification
	MTGIDBR1	gccccacggagcactcac	PCR amplification
	MTGIDBF2	ccggcggagtgcgtaatg	DNA sequencing
	MTGIDBR2	gcactcacgccgtccctc	DNA sequencing

<b>Fable 5.</b> Gene-specific primers for PCR amplification or DNA sequence
---

<sup>§</sup> Obtained from Eurofins Genomics LLC (Louisville, KY).

#### 3.2.4. DNA Sequencing and Data Analysis

All Amplicons were sequenced by the Sanger method using gene-specific primers (Table 5) and a SeqStudio<sup>™</sup> Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific). The NCBI BLAST engine (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, accessed on 1 September 2020) [41] was the computational tool used to perform DNA sequence comparisons against *M. tuberculosis* H37Rv (as a reference). The double-stranded DNA sequences were analyzed using two different biocomputational packages, the SequentiX's DNA Dragon—Sequence Contig Assembler (https://www.dna-dragon.com/, accessed on 15 September 2020) and SnapGene<sup>®</sup> Viewer (https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/, accessed on 15 September 2020). The multi-sequence alignments were generated by Clustal Omega [42,43], using the EMBL-EBI server (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/, accessed on 15 September 2020).

#### 3.3. Biocomputational Methods

#### 3.3.1. Sequence-Based Function Predictions

Three bioinformatic predictors determined the effect of L101F substitution on the function of *Mt*GidB: PolyPhen-2, PROVEAN and SIFT, with default settings. PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/, accessed on 1 October 2020) is an algorithm that combines sequence and structure-based attributes and uses a naive Bayesian classifier to identify missense mutations with an impact on the phenotype. Output levels of probably (0.85–1.0) and possibly (0.15–0.84) damaging are significant [44–46]. PROVEAN (http://provean.jcvi.org/, accessed on 1 October 2020) is an alignment-based method that estimates the influence of amino acid substitutions on protein function. The final score designates the mutation as deleterious or neutral, according to a predefined threshold. Protein variants with a score equal to or less than –2.5 are deleterious [47,48]. SIFT (https://sift.bii.a-star.edu.sg/, accessed on 1 October 2020) is a sequence homology-based tool that classifies amino acid substitutions as tolerant (neutral) or intolerant (deleterious) mutations. Protein variants with a normalized probability value equal to or less than 0.05 are deleterious [49].

#### 3.3.2. Template-Based Protein Modeling

The three-dimensional (3D) structure of *Mt*GidB was generated by template-based modeling using the I-TASSER server (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/, accessed on 1 November 2020), a unified platform that uses a hierarchical approach for automated 3D structure prediction [50–52]. C-score was used to measure the modeling confidence [53,54]. The top-ranked 3D structure was improved using ReFOLD (http://www.reading.ac.uk/bioinf/ReFOLD/, accessed on 10 November 2020), a computational tool for model refinement guided by accurate quality estimates [55,56], and the structural precision was estimated using ModFold (https://www.reading.ac.uk/bioinf/ModFOLD/, accessed on 20 November 2020), a server for global and local quality assessment [57]. The

3D model was further analyzed using Procheck's Ramachandran plot [58] and ProSA's Z-score plot [59,60]. PyMol (Schrödinger, LLC.) and UCSF Chimera [61] were the molecular graphics systems used to visualize protein structures.

#### 3.3.3. Structure-Based Stability Predictions

Five biocomputational methods predicted the effect of L101F substitution on the stability of *Mt*GidB: DeepDDG, DUET, mCSM and SDM, with default settings. DeepDDG (http://protein.org.cn/ddg.html, accessed on 5 December 2020) employs a well-trained, neural network-based method to predict changes in protein stability due to point mutations [62]. DUET (http://biosig.unimelb.edu.au/duet, accessed on 5 December 2020) predicts the effects of missense mutations on protein stability by combining two complementary approaches in a consensus prediction [63,64]. mCSM (http://biosig.unimelb.edu. au/mcsm, accessed on 5 December 2020) uses graph-based signatures to predict the impact of missense mutations on protein stability, encoding distance patterns between atoms [65]. SDM (http://marid.bioc.cam.ac.uk/sdm2, accessed on 5 December 2020) applies conformationally constrained environment-specific substitution tables to predict the effect of a missense mutation and calculate the change in protein stability [66,67].

#### 3.3.4. Examination of the Interatomic Contacts

The interatomic contacts at the polymorphic site were estimated using Arpeggio (http://biosig.unimelb.edu.au/arpeggioweb/, accessed on 15 December 2020), a web service for calculating the interatomic interactions in protein structures [68]. The *Mt*GidB model was the wild-type structure, and its L101F variant the mutant. The local network of non-covalent interactions was analyzed using the PyMol system. The specific contacts were detected using the LPC/CSU software (http://oca.weizmann.ac.il/oca-bin/lpccsu, accessed on 15 December 2020) by automatic analysis of interatomic contacts of structural units (CSU) [69].

#### 3.3.5. Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations

Coarse-grained (CG) models for (MD) simulations are an effective biocomputational approach for adequate sampling of the conformational space while maintaining physical rigor [70]. The CG-MD simulations were performed online by the UNRES web server (https://unres.pl/, accessed on 10 January 2021), using the *Mt*GidB 3D model as a wild-type structure and its L101F variant as the mutant structure with default settings for standard protein dynamics. The CG united residue (i.e., UNRES) model is a highly-reduced physics-based representation of proteins, in which only two interaction sites per residue (united side chains and united peptide groups) are present [71–73]. The automatic output data, such as plots of potential energy and radius of gyration, were downloaded and analyzed as generated by the server. The fluctuations results were analyzed using the Pymol system.

**Author Contributions:** Conceptualization and supervision, R.E.M.-A. and M.A.R.-I.; methodology, R.E.M.-A., P.L.A.M.-M., S.G.M.-L., A.F.L.-N. and M.A.R.-I.; validation, R.E.M.-A., A.F.L.-N. and M.A.R.-I.; formal analysis, all authors; investigation, Á.R.-G., S.R.-R., R.A.G.-S. and J.B.-S.; writing—original draft preparation, Á.R.-G., R.E.M.-A. and M.A.R.-I.; writing—review and editing, R.E.M.-A., P.L.A.M.-M., S.G.M.-L., A.F.L.-N. and M.A.R.-I. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was funded in part by grants from Mexico's National Council for Science and Technology (CONACyT; CB-2019/01-170715) and the Autonomous University of Baja California (UABC; CPI/300/735/E, CPI/300/2344 and CPI/300/2596).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the Declaration-of-Helsinki's guidelines and approved by the HGT's Ethics Committee (CONBIOETICA-02-CEI-001-20170526, 30 October 2018). No informed consent was required. Sputum samples, DNA extracts and bacterial cultures were analyzed anonymously.

**Data Availability Statement:** All data presented in this study are available on request from the corresponding author, without undue reservation, to any qualified researcher.

Acknowledgments: The authors thank QFB. Concepción García-Castro (CLS) and QFB. Georgina Torres-Rodríguez (CLS) of the GHT's Clinical Diagnostic Lab (TB Diagnostic Unit) for their exceptional technical assistance; and Rafael Laniado-Laborín (Head of the GHT's TB Clinic) and QFB. Walther H. Suárez-Carrillo (Head of the GHT's Clinical Diagnostic Lab) for their invaluable support during the study. Álvaro García-Rodriguez thanks GHT for both academic and administrative facilities granted to achieve his Ph.D. studies.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

#### References

- 1. Mello, F.C.D.Q.; Silva, D.R.; Dalcolmo, M.P. Tuberculosis: Where are we? J. Bras. Pneumol. 2018, 44, 82. [CrossRef] [PubMed]
- 2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020; WHO: Geneva, Switzerland, 2020; ISBN 9789240013131.
- 3. Kurz, S.G.; Furin, J.J.; Bark, C.M. Drug-Resistant Tuberculosis. Infect. Dis. Clin. N. Am. 2016, 30, 509–522. [CrossRef] [PubMed]
- 4. Seung, K.J.; Keshavjee, S.; Rich, M.L. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2015**, *5*, a017863. [CrossRef] [PubMed]
- Nguyen, T.N.A.; Anton-Leberre, V.; Bañuls, A.-L.; Nguyen, T.V.A. Molecular Diagnosis of Drug-Resistant Tuberculosis; A Literature Review. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 794. [CrossRef] [PubMed]
- Seki, M.; Choi, H.J.; Kim, K.; Whang, J.; Sung, J.; Mitarai, S. Tuberculosis: A persistent unpleasant neighbour of humans. J. Infect. Public Health 2021, 14, 508–513. [CrossRef] [PubMed]
- Trubnikov, A.; Hovhannesyan, A.; Akopyan, K.; Ciobanu, A.; Sadirova, D.; Kalandarova, L.; Parpieva, N.; Gadoev, J. Effectiveness and Safety of a Shorter Treatment Regimen in a Setting with a High Burden of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 2021, *18*, 4121. [CrossRef] [PubMed]
- 8. World Health Organization. WHO Consolidated Guidelines on Drug-Resistant Tuberculosis Treatment; WHO: Geneva, Switzerland, 2019.
- 9. Kerantzas, C.A.; Jacobs, W.R. Origins of Combination Therapy for Tuberculosis: Lessons for Future Antimicrobial Development and Application. *mBio* 2017, *8*, e01586-16. [CrossRef]
- Murray, J.F.; Schraufnagel, D.; Hopewell, P.C. Treatment of Tuberculosis. A Historical Perspective. Ann. Am. Thorac. Soc. 2015, 12, 1749–1759. [CrossRef]
- 11. Mase, S.R.; Chorba, T. Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. Clin. Chest Med. 2019, 40, 775–795. [CrossRef]
- 12. Castro, E.A.T.; Mendes, M.; Freitas, S.; Roxo, P.C. Incidence and risk factors of major toxicity associated to first-line antituberculosis drugs for latent and active tuberculosis during a period of 10 years. *Rev. Port. Pneumol.* **2015**, *21*, 144–150. [CrossRef]
- 13. Palomino, J.C.; Martin, A. Drug Resistance Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. Antibiotics 2014, 3, 317–340. [CrossRef]
- Nahid, P.; Mase, S.R.; Migliori, G.B.; Sotgiu, G.; Bothamley, G.H.; Brozek, J.L.; Cattamanchi, A.; Cegielski, J.P.; Chen, L.; Daley, C.L.; et al. Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. An Official ATS/CDC/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2019, 200, e93–e142. [CrossRef]
- 15. Cohen, K.A.; Stott, K.E.; Munsamy, V.; Manson, A.L.; Earl, A.M.; Pym, A.S. Evidence for Expanding the Role of Streptomycin in the Management of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e00860-20. [CrossRef]
- Dookie, N.; Rambaran, S.; Padayatchi, N.; Mahomed, S.; Naidoo, K. Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: A review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018, 73, 1138–1151. [CrossRef]
- 17. Musser, J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: Molecular genetic insights. *Clin. Microbiol. Rev.* **1995**, *8*, 496–514. [CrossRef]
- Arjomandzadegan, M.; Gravand, S. Analysis of rpsL and rrs genes mutations related to streptomycin resistance in Mdr and Xdr clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberk. Toraks* 2015, 63, 235–242. [CrossRef]
- 19. Sun, Y.-J.; Luo, J.-T.; Wong, S.-Y.; Lee, A.S.G. Analysis of rpsL and rrs mutations in Beijing and non-Beijing streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Singapore. *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, *16*, 287–289. [CrossRef]
- Jagielski, T.; Ignatowska, H.; Bakula, Z.; Dziewit, Ł.; Napiórkowska, A.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Zwolska, Z.; Bielecki, J. Screening for Streptomycin Resistance-Conferring Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Poland. *PLoS* ONE 2014, 9, e100078. [CrossRef]
- 21. Wong, S.Y.; Lee, J.S.; Kwak, H.K.; Via, L.; Boshoff, H.I.M.; Barry, C.E. Mutations ingidBConfer Low-Level Streptomycin Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 2515–2522. [CrossRef]
- 22. Khosravi, A.D.; Etemad, N.; Hashemzadeh, M.; Dezfuli, S.K.; Goodarzi, H. Frequency of rrs and rpsL mutations in streptomycinresistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Iranian patients. J. Glob. Antimicrob. Resist. 2017, 9, 51–56. [CrossRef]
- 23. Sun, H.; Zhang, C.; Xiang, L.; Pi, R.; Guo, Z.; Zheng, C.; Li, S.; Zhao, Y.; Tang, K.; Luo, M.; et al. Characterization of mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Sichuan, China and the association between Beijing-lineage and dual-mutation in gidB. *Tuberculosis* **2016**, *96*, 102–106. [CrossRef]

- Spies, F.S.; Ribeiro, A.W.; Ramos, D.; Ribeiro, M.O.; Martin, A.; Palomino, J.C.; Rossetti, M.L.R.; Da Silva, P.E.A.; Zaha, A. Streptomycin Resistance and Lineage-Specific Polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* gidB Gene. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49, 2625–2630. [CrossRef]
- Verma, J.S.; Gupta, Y.; Nair, D.; Manzoor, N.; Rautela, R.S.; Rai, A.; Katoch, V.M. Evaluation of gidB alterations responsible for streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. J. Antimicrob. Chemother. 2014, 69, 2935–2941. [CrossRef]
- Okamoto, S.; Tamaru, A.; Nakajima, C.; Nishimura, K.; Tanaka, Y.; Tokuyama, S.; Suzuki, Y.; Ochi, K. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol. Microbiol.* 2007, 63, 1096–1106. [CrossRef]
- Wong, S.Y.; Javid, B.; Addepalli, B.; Piszczek, G.; Strader, M.B.; Limbach, P.A.; Barry, C.E. Functional Role of Methylation of G518 of the 16S rRNA 530 Loop by GidB in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013, 57, 6311–6318. [CrossRef] [PubMed]
- Tudó, G.; Rey, E.; Borrell, S.; Alcaide, F.; Codina, G.; Coll, P.; Martín-Casabona, N.; Montemayor, M.; Moure, R.; Orcau, À.; et al. Characterization of mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the area of Barcelona. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010, 65, 2341–2346. [CrossRef]
- 29. Smittipat, N.; Juthayothin, T.; Billamas, P.; Jaitrong, S.; Rukseree, K.; Dokladda, K.; Chaiyasirinroje, B.; Disratthakit, A.; Chaiprasert, A.; Mahasirimongkol, S.; et al. Mutations in rrs, rpsL and gidB in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Thailand. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2016**, *4*, 5–10. [CrossRef]
- Klopper, M.; Heupink, T.H.; Hill-Cawthorne, G.; Streicher, E.M.; Dippenaar, A.; De Vos, M.; Abdallah, A.M.; Limberis, J.; Merker, M.; Burns, S.; et al. A landscape of genomic alterations at the root of a near-untreatable tuberculosis epidemic. *BMC Med.* 2020, 18, 24. [CrossRef]
- 31. Wang, Y.; Li, Q.; Gao, H.; Zhang, Z.; Liu, Y.; Lu, J.; Dai, E. The roles of rpsL, rrs, and gidB mutations in predicting streptomycinresistant drugs used on clinical Mycobacterium tuberculosis isolates from Hebei Province, China. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2019**, *12*, 2713–2721.
- 32. Perdigão, J.; Macedo, R.; Machado, D.; Silva, C.; Jordao, L.; Couto, I.; Viveiros, M.; Portugal, I. GidB mutation as a phylogenetic marker for Q1 cluster Mycobacterium tuberculosis isolates and intermediate-level streptomycin resistance determinant in Lisbon, Portugal. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, O278–O284. [CrossRef]
- Sharma, P.; Kumar, B.; Singhal, N.; Katoch, V.M.; Venkatesan, K.; Chauhan, D.S.; Bisht, D. Streptomycin induced protein expression analysis in Mycobacterium tuberculosis by two-dimensional gel electrophoresis & mass spectrometry. *Indian J. Med. Res.* 2010, *132*, 400–408. [PubMed]
- 34. Sharma, P.; Kumar, B.; Gupta, Y.; Singhal, N.; Katoch, V.M.; Venkatesan, K.; Bisht, D. Proteomic analysis of streptomycin resistant and sensitive clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Proteome Sci.* 2010, *8*, 59. [CrossRef] [PubMed]
- Sharma, D.; Bisht, D. Secretory Proteome Analysis of Streptomycin-Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates. SLAS Discov. Adv. Life Sci. R&D 2017, 22, 1229–1238. [CrossRef]
- Martin, J.L. SAM (dependent) I AM: The S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. Curr. Opin. Struct. Biol. 2002, 12, 783–793. [CrossRef]
- 37. Schubert, H.L.; Blumenthal, R.M.; Cheng, X. Many paths to methyltransfer: A chronicle of convergence. *Trends Biochem. Sci.* 2003, 28, 329–335. [CrossRef]
- 38. Capriotti, E.; Fariselli, P.; Rossi, I.; Casadio, R. A three-state prediction of single point mutations on protein stability changes. *BMC Bioinform.* **2008**, *9*, S6. [CrossRef]
- 39. Hollingsworth, S.A.; Dror, R.O. Molecular Dynamics Simulation for All. Neuron 2018, 99, 1129–1143. [CrossRef]
- 40. Kmiecik, S.; Kouza, M.; Badaczewska-Dawid, A.E.; Kloczkowski, A.; Kolinski, A. Modeling of Protein Structural Flexibility and Large-Scale Dynamics: Coarse-Grained Simulations and Elastic Network Models. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3496. [CrossRef]
- 41. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [CrossRef]
- Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T.J.; Karplus, K.; Li, W.; López, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 2011, 7, 539. [CrossRef]
- 43. Madeira, F.; Park, Y.M.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A.R.N.; Potter, S.C.; Finn, R.D.; et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W636–W641. [CrossRef]
- 44. Adzhubei, I.A.; Schmidt, S.; Peshkin, L.; Ramensky, V.E.; Gerasimova, A.; Bork, P.; Kondrashov, A.S.; Sunyaev, S.R. A meth-od and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 248–249. [CrossRef]
- 45. Adzhubei, I.; Jordan, D.; Sunyaev, S.R. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **2013**, *76*, 7–20. [CrossRef]
- Cloete, R.; Akurugu, W.A.; Werely, C.J.; Van Helden, P.D.; Christoffels, A. Structural and functional effects of nucleotide variation on the human TB drug metabolizing enzyme arylamine N -acetyltransferase 1. J. Mol. Graph. Model. 2017, 75, 330–339. [CrossRef]
- 47. Choi, Y.; Sims, G.E.; Murphy, S.; Miller, J.R.; Chan, A.P. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46688. [CrossRef]
- 48. Choi, Y.; Chan, A.P. PROVEAN web server: A tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 2745–2747. [CrossRef]

- 49. Sim, N.-L.; Kumar, P.; Hu, J.; Henikoff, S.; Schneider, G.; Ng, P.C. SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40, W452–W457. [CrossRef]
- 50. Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 725–738. [CrossRef]
- 51. Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **2015**, 12, 7–8. [CrossRef]
- 52. Yang, J.; Zhang, Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43, W174–W181. [CrossRef]
- 53. Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinform. 2008, 9, 40. [CrossRef]
- 54. Roy, A.; Xu, N.; Poisson, J.; Zhang, Y. A Protocol for Computer-Based Protein Structure and Function Prediction. *J. Vis. Exp.* **2011**, 3259, e3259. [CrossRef]
- Shuid, A.N.; Kempster, R.; McGuffin, L.J. ReFOLD: A server for the refinement of 3D protein models guided by accurate quality estimates. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45, W422–W428. [CrossRef]
- 56. Adiyaman, R.; McGuffin, L.J. ReFOLD3: Refinement of 3D protein models with gradual restraints based on predicted local quality and residue contacts. *Nucleic Acids Res.* **2021**, gkab300. [CrossRef]
- 57. McGuffin, L.J.; Aldowsari, F.M.F.; Alharbi, A.S.M.; Adiyaman, R. ModFOLD8: Accurate global and local quality estimates for 3D protein models. *Nucleic Acids Res.* 2021, gkab321. [CrossRef]
- Laskowski, R.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Crystallogr. 1993, 26, 283–291. [CrossRef]
- Sippl, M.J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* 1993, 17, 355–362. [CrossRef] [PubMed]
- Wiederstein, M.; Sippl, M.J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, W407–W410. [CrossRef] [PubMed]
- 61. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612. [CrossRef] [PubMed]
- 62. Cao, H.; Wang, J.; He, L.; Qi, Y.; Zhang, J.Z. DeepDDG: Predicting the Stability Change of Protein Point Mutations Using Neural Networks. *J. Chem. Inf. Model.* 2019, 59, 1508–1514. [CrossRef] [PubMed]
- 63. Pires, D.E.; Ascher, D.; Blundell, T.L. DUET: A server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, W314–W319. [CrossRef]
- 64. Pires, D.E.V.; Chen, J.; Blundell, T.L.; Ascher, D.B. In silico functional dissection of saturation mutagenesis: Interpreting the relationship between phenotypes and changes in protein stability, interactions and activity. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19848. [CrossRef]
- 65. Pires, D.E.V.; Ascher, D.; Blundell, T.L. mCSM: Predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 335–342. [CrossRef]
- 66. Worth, C.; Preissner, R.; Blundell, T.L. SDM—A server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, W215–W222. [CrossRef]
- 67. Pandurangan, A.P.; Ochoa-Montaño, B.; Ascher, D.B.; Blundell, T.L. SDM: A server for predicting effects of mutations on protein stability. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45, W229–W235. [CrossRef]
- 68. Jubb, H.C.; Higueruelo, A.; Ochoa-Montaño, B.; Pitt, W.; Ascher, D.B.; Blundell, T.L. Arpeggio: A Web Server for Calculating and Visualising Interatomic Interactions in Protein Structures. *J. Mol. Biol.* **2017**, *429*, 365–371. [CrossRef]
- 69. Sobolev, V.; Sorokin, A.; Prilusky, J.; Abola, E.E.; Edelman, M. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics* **1999**, *15*, 327–332. [CrossRef]
- 70. Kmiecik, S.; Gront, D.; Kolinski, M.; Wieteska, L.; Badaczewska-Dawid, A.E.; Kolinski, A. Coarse-Grained Protein Models and Their Applications. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 7898–7936. [CrossRef]
- 71. Voth, G.A. (Ed.) Coarse-Graining of Condensed Phase and Biomolecular Systems; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2009; ISBN 9781420059557.
- 72. Liwo, A.; Baranowski, M.; Czaplewski, C.; Gołaś, E.; He, Y.; Jagieła, D.; Krupa, P.; Maciejczyk, M.; Makowski, M.; Mozolewska, M.A.; et al. A unified coarse-grained model of biological macromolecules based on mean-field multipole–multipole interactions. *J. Mol. Model.* 2014, 20, 1–15. [CrossRef]
- 73. Czaplewski, C.; Karczynska, A.; Sieradzan, A.K.; Liwo, A. UNRES server for physics-based coarse-grained simulations and prediction of protein structure, dynamics and thermodynamics. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W304–W309. [CrossRef]