



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

CRISTALIZACIÓN DE LA CATALASA - PEROXIDASA (KatG) DE
Mycobacterium tuberculosis

TESIS

Que presenta:

AYLIN AVILA LINARES

Para obtener el Grado de LICENCIADO EN CIENCIAS (área
terminal bioquímica y biología molecular)

Directora de tesis:

Dra. Adelaida Díaz Vilchis (Instituto de Biotecnología, UNAM)

Sinodales:

Dra. Carmen Nina Pastor Colón (Centro de Investigación en Dinámica
Celular)

Dr. Carlos Daniel Amero Tello (Centro de Investigaciones Químicas)

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2020.

CRISTALIZACIÓN DE LA CATALASA – PEROXIDASA (KatG) DE
Mycobacterium tuberculosis

AYLIN AVILA LINARES

2020

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Adelaida Díaz Vilchis, mi tutora, por hacerme parte de este proyecto, por su tiempo, su paciencia, su dedicación, su confianza, por las múltiples correcciones que me hizo a lo largo del proyecto, pero también por la libertad que me otorgó al realizarlo, por todo lo que me enseñó y por las pláticas tan amenas que teníamos cuando cristalizábamos. Ade, eres una gran persona, te deseo lo mejor siempre.

Al Dr. Enrique Rudiño (el “jefe jefe”, solo César y yo sabíamos que le decía así), primero, por abrirme las puertas de su laboratorio hace 6 años cuando yo hacía mi servicio de preparatoria, segundo, por dejarme regresar a hacer mi tesis de licenciatura, y tercero, pero no menos importante, por la amistad que siempre me brindó y el apoyo durante este último año.

A la Bióloga Sonia Rojas, por enseñarme a cristalizar, por la paciencia que conllevó hacerlo, por la amistad tan linda que desarrollamos y por todos los consejos de vida. Te quiero Soni.

Al Dr. César Salvador Cardona, que, aunque ya no está en el grupo, él fue una pieza importante para que yo eligiera esta carrera. Por todo lo que me enseñó y por la paciencia que me tenía cuando me equivocaba y terminaba contándole mi vida.

A la M. en C. Brenda Uribe por permitirme ser parte de su proyecto, por enseñarme y por tenerme paciencia. También, por acogerme en su laboratorio para hacer gran parte de mis experimentos. Esto tampoco hubiera sido posible sin el Dr. Xavier Soberón, gracias.

A la Tec. Lab. Aurelia Ocampo, ni siquiera tengo palabras para describir todo lo que ella significa para mí, me ha apoyado tanto en momentos difíciles, me ha dado consejos cuando yo siento que me desmorono, ha pasado de ser una compañera de trabajo a ser mi Abu adoptiva y escucharme cuando lo necesito. Au, te quiero muchísimo.

A todos mis compañeros del Lab. 8, especialmente a Ulises por ayudarme con reacciones químicas, por ser mi amigo y también por fundar nuestra cooperativa, por

supuesto, gracias también a los miembros que la hicieron posible, Ricardo, Cris, Au, Ángela, Xhaly y Aris.

A todos los miembros de mi jurado tanto de pre residencia como residencia, Dr. Carlos Amero, Dra. Nina Pastor (siempre tan inteligente y linda), Dra. Lina Rivillas, Dra. María Eugenia y Dra. Adelaida Díaz.

Al IBt, por dejarme participar en sus primeros tres eventos de puertas abiertas, por haberme permitido estar en dos laboratorios diferentes y así, hacer ciencia, por costear mi proyecto de tesis, ¡mil gracias por todo lo que dejas en mí, IBt! Además, por permitirme conocer personas increíbles y grandes científicos, que sé, podré contar con ellas el resto de mi vida.

Lo más importante en mi vida

A la mujer que me dio la vida, que me ha inspirado siempre, que nunca me ha dejado sola, a Isela Linares. Mamá, no sabes cuánto te amo, cuanto agradezco a Dios haberme dado una mujer como tú. Solo tú y yo sabemos las cosas difíciles por las que hemos pasado y aun con todo, me has dado la fuerza para seguir adelante, estoy segura de que no me alcanzará la vida para compensarte ni me alcanzarán las palabras para expresarte todo lo que eres para mí. Te debo todo lo que soy y hasta donde he llegado. Mamá, este título es un logro tuyo también.

A Itzel y Erick, siempre serán las personas por las que más me preocuparé, pues son mis hermanos pequeños. Gracias por estar a mi lado siempre, por hacerme reír e incluso por hacerme enojar. Itzel, gracias por ser mi confidente, por prepararme comida cuando yo me quedaba horas estudiando o cuando me sentía mal, te amo hermana. Erick, mi bebé, eres el hombre más importante en mi vida y al que más amo.

A Jorge Avila, papá, gracias por tu esfuerzo día con día para darnos tantas cosas a mis hermanos y a mí, por inculcarnos la puntualidad y la responsabilidad. Gracias porque por ti sé lo que quiero y no quiero en la vida.

A Rachel, a mi tía Key y a mis primos Yendys, Jared y Keyren. Quiero agradecerles por tanto que me dieron, por tantos buenos momentos, por todo el amor y por la fortaleza que veo en ustedes. Son tan importantes en mi vida y aunque no estemos cerca, siempre están en mi corazón.

A Alan Cortes, porque estoy segura de que tu presencia ha cambiado mi vida para bien, porque inconscientemente me has alentado a probar cosas nuevas. Siempre desearé lo mejor para ti, eres un buen hombre y te lo mereces. Estoy segura de que sin importar que pase, siempre te querré...

A Gustavo Rodríguez, por ser un gran amigo, por compartir su conocimiento conmigo y por apoyarme tanto académica como personalmente. Te quiero, amigo.

A todas las personas que han sido parte importante de mi vida, a mi pediatra el Dr. Juan Pablo Castañeda Saldívar y su esposa la Dra. Alicia Anaya Román, primero por atenderme durante toda mi infancia, segundo por darme trabajo durante cinco años en su consultorio. Al maestro Benjamín Valdez Hidalgo, mi maestro favorito de toda la vida y mi pañuelo de lágrimas. A mis amigas de la secundaria, Aby y Dulce. Mi amiga de la prepa, Angie. A mi amiga de la universidad, Sandra, jamás pensé que seríamos tan buenas amigas. A mi mejor amiga del tocho, Cas no sabes cuánto te quiero y creo en ti, y a su novio Jony, por buen amigo y fotógrafo.

A Iván Echegoya, a Gabriel Islas y a Leonardo Salazar, mis coaches de tocho y de vida, que me ayudaron a crecer tanto dentro, como fuera del campo. Que confiaron y creyeron en mí para poder llevar un equipo cuando estuvieron ausentes.

A todos, ¡Gracias!

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	I
<i>Lo más importante en mi vida</i>	II
ÍNDICE GENERAL	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMEN	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.2. Tuberculosis	2
1.2.1. La fármacorresistencia	3
1.2.2. Tuberculosis en México	4
1.3. Generalidades de las catalasas–peroxidasas	6
1.3.1. Estructura de las catalasas-peroxidasas	10
1.4. INH y la KatG de <i>M. tuberculosis</i>	12
1.4.1. Mutantes de <i>MtKatG</i>	15
1.5. Cristalización de proteínas	17
1.5.1. Técnicas de cristalización	21
2. ANTECEDENTES	21
2.1. Localización estructural de la mutación L333V en <i>MtKatG</i>	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
5.1. Objetivo general	25
5.2. Objetivos específicos	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1. Transformación	26
6.2. Expresión de <i>MtKatG</i> L333V	26
6.3. Purificación	27
6.4. Determinación de la concentración de proteína	28

6.5.	Pruebas de cristalización	28
6.6.	Optimización	29
6.7.	Sobreenfriado de cristales, colectade datos y determinación de la estructura	29
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1.	Selección de células transformadas.....	30
7.2.	Purificación de <i>MtKatG</i> L333V	31
7.3.	Pruebas de cristalización de <i>MtKatG</i> L333V	33
7.4.	Colecta de datos de difracción de rayos X de la <i>MtKatG</i> L333V.....	37
7.4.1.	Optimización de <i>MtKatG</i> L333V condición 3	38
8.	CONCLUSIONES	41
9.	PERSPECTIVAS	42
10.	REFERENCIAS.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Ångström	mM	Milimolar
AG	Arabinogalactano	ms	Milisegundos
BCG	Bacilo Calmatte – Guérin	<i>MgKatG</i>	Catalasa-peroxidasa de <i>Magnaporthe grisea</i>
<i>BpKatG</i>	Catalasa-peroxidasa de <i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>MtKatG</i>	Catalasa-peroxidasa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CP	Catalasa-peroxidasa		
EMB	Etambutol	N	Normal
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (siglas en Inglés)	NAD	Nicotina Adenina Dinucleótido
<i>HmKatG</i>	Catalasa-peroxidasa de <i>Haloarcula marismortui</i>	<i>NcKatG</i>	Catalasa-peroxidasa de <i>Neurospora crassa</i>
HPI	Catalasa-peroxidasa de <i>Escherichia coli</i>	ng	Nanogramos
		nm	Nanómetros
HRPC	Peroxidasa C de rábano picante	OD	Densidad óptica (siglas en Inglés)
INH	Isoniazida		
InhA	Reductasa acarreadora de enoil-acil	OMS	Organización Mundial de la Salud
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	PEG	Polietilenglicol
		PG	Peptidoglicano
KatG	Catalasa-peroxidasa, enzima	RIF	Rifampicina
<i>katG</i>	Catalasa-peroxidasa, gen	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
kDa	Kilo Daltones		
LB	Luria Bertani, medio	rpm	Revoluciones por minuto
L	Litros	SDS-	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (en Inglés)
M	Molar	PAGE	
Mg	Miligramos		
mL	Mililitros		

SeKatG	Catalasa-peroxidasa de <i>Synechococcus elongatus</i>	TB-DR	Tuberculosis fármaco – resistente
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple	TB-MDR	Tuberculosis multirresistente
SOB	Super Optimal Broth, medio	TB-XDR	Tuberculosis ultrarresistente
SS	Secretaría de Salud	VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
PZA	Pirazinamida	µg	Microgramos
TB	Tuberculosis	µL	Microlitros

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de resistencia a fármacos antituberculosos	4
Tabla 2. Estructuras cristalográficas de las catalasas-peroxidadasas	10
Tabla 3. Clasificación de las mutantes de la KatG (tomada y modificada de Carpena <i>et al.</i> , 2003)	16
Tabla 4. Técnicas de cristalización (información tomada de Drenth, 2007, Rudiño-Piñera, 2010)	21
Tabla 5. Concentración de la enzima <i>MtKatG</i> L333V	33
Tabla 6. Condiciones de cristalización	34
Tabla 7. Matriz de optimización de las condiciones 1 y 5	35
Tabla 8. Matriz de optimización de la condición 2	35
Tabla 9. Matriz de optimización de la condición 4	36
Tabla 10. Optimización de la condición 3	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Incidencia estimada de la TB, 2017.** Fuente: (World Health Organization, 2018)3
- Figura 2. Gráficos estadísticos de TB en México*.** a) Tasa de mortalidad de pacientes con TB excluyendo a los portadores de VIH. En 2017, hubo una disminución aproximada del 45%. b) Tasa de incidencia del 2000 al 2017. En verde, se muestra el total de casos nuevos notificados incluyendo pacientes con VIH. En negro está el total de casos nuevos y recaídas. En rojo, únicamente la tasa de los casos nuevos de TB/VIH. c) Casos notificados por grupo de edad. d) Porcentaje de éxito de tratamientos administrados a pacientes nuevos, recaídas, pacientes VIH positivos, pacientes multirresistentes y ultrarresistentes5
- Figura 3. Árbol filogenético de las KatGs.** Se observan los dos Clados. La separación entre ambos clados sugiere que evolucionaron por ramas distintas7
- Figura 4. Esquema de la reacción catalítica de las catalasas-peroxidasas.** En rojo se muestran las dos reacciones de la actividad de catalasa. En azul se muestra la actividad de peroxidasa9
- Figura 5. Estructura de la catalasa-peroxidasa.** Estructura del dímero de la CP de *Burkholderia pseudomallei*. A) En rojo se muestra el grupo hemo de cada subunidad, en los colores azul y amarillo claro se representa el dominio C-terminal, en azul y amarillo intenso el dominio N-terminal. B) Sitio activo con la presencia del aducto covalente en el lado distal del hemo11
- Figura 6. Mecanismo propuesto para la activación de INH por la KatG.** La INH (en azul) interacciona con la actividad peroxidática de la KatG formando el radical acil isonicotinoilo. Este radical interacciona con NAD⁺ que está en su forma oxidada formando el aducto INH-NADH, el cual es inhibidor de la enzima InhA involucrada en la biosíntesis de ácidos micólicos. (Tomada y modificada de Cade, *et al.*, 2010) 13
- Figura 7. Estructura del dímero de la MtKatG y el sitio activo.** A) En rosa y azul se muestran las dos subunidades, los colores claros indican el dominio N-terminal donde

se encuentra el grupo hemo, en color gris. B) Secuencia conservada de los residuos que forman el aducto covalente (Met255-Tyr229-Trp107). Se muestra la His270 en coordinación con el hierro del hemo en el lado proximal. En rojo, las cuatro moléculas de agua14

Figura 8. Posibles sitios de unión de INH en *MtKatG*. En verde, la INH. INH1 indica el sitio de unión basado en HRPC, INH2 indica el sitio de unión basado en *BpKatG*. En rosa átomos de carbono, en azul átomos de nitrógeno, en gris el grupo hemo y en rojo las moléculas de agua.....15

Figura 9. Canal de acceso al sitio activo de la *MtKatG*. De izquierda a derecha se muestra la comparación del canal de acceso al sitio activo (en verde) en la mutante KatG S315T, la KatG WT y la mutante KatG D137S de *M. tuberculosis*17

Figura 10. Cristales de proteína. a) taumatina, b) tripsina bovina, c) lisozima tetragonal, d) lisozima monoclinica, e) catalasa de hígado de bovino, f-h) tres formas cristalinas de RNAsa S bovina, i) beta-lactoglobulina, j) concanavalina (Tomada de McPherson A. 2017)18

Figura 11. Diagrama de fases para la cristalización de proteínas. La línea morada representa un equilibrio entre la fase sólida y la fase de moléculas libres (tomada y modificada de McPherson, 2017)20

Figura 12. Distancia de la mutación L333V respecto a la histidina que coordina al hierro del hemo. En rojo, se muestra la valina en la posición 333 y la distancia del C α de la His270 al C γ 2 de la Val333. ... 23

Figura 13. Localización de la mutación L333V con respecto al hierro del hemo. La valina se muestra en rojo.....24

Figura 14. Residuos hidrofóbicos cercanos a la L333V. En azul se muestra la L333 y sobrepuesta con la V333 en rojo.....24

Figura 15. Construcción del plásmido pKK223-3-*katG* (tomada de Uribe, B. 2017)31

Figura 16. SDS-PAGE 10% con <i>MtKatG</i> WT y <i>MtKatG</i> L333V. Las bandas azul intenso presentan una masa molecular aproximada de 80 kDa y corresponden a las enzimas <i>MtKatG</i> WT y <i>MtKatG</i> L333V. Del lado izquierdo se muestra el sobrenadante de la <i>MtKatG</i> WT y del lado derecho la <i>MtKatG</i> L333V purificada.	32
Figura 17. Cristales correspondientes a las condiciones de cristalización de <i>MtKatG</i> L333V. En la parte inferior izquierda de cada panel se muestra el número de la condición del cristal.....	34
Figura 18. Cristales de optimización de la condición 5. Condición del kit <i>Wizard</i> 1-2; 200 mM de acetato de zinc, 10% w/v de PEG 3000 y 100 mM de acetato de sodio, pH 4.5.....	36
Figura 19. Patrón de difracción de la enzima <i>MtKatG</i> L333V. Los puntos corresponden a las reflexiones registradas. En la imagen se observa el primer patrón de difracción de los 720 colectados.....	37
Figura 20. Cromatograma de la purificación de la enzima <i>MtKatG</i> L333V. En verde se indica el número de las fracciones, la línea azul indica la absorbancia de la enzima a 280 nm y la línea roja indica la conductancia.	38
Figura 21. Purificación para la optimización de <i>MtKatG</i> L333V. SDS – PAGE 10%. De izquierda a derecha, 0) muestra recuperada que pasó por la columna de níquel, SN) sobrenadante de la sonicación de las células, 7 – 13) fracciones eluídas.....	39

RESUMEN

En esta tesis se estudia la catalasa – peroxidasa (KatG) de *Mycobacterium tuberculosis*. *M. tuberculosis* es una micobacteria que se distingue por la complejidad de su envoltura celular, es un patógeno obligado y tiene como principal blanco de ataque los pulmones en humanos. Este microorganismo es responsable de la tuberculosis, una enfermedad que se calcula está presente de manera latente en una cuarta parte de la población mundial.

Para combatir la tuberculosis existen medicamentos de primera línea, tales como la isoniazida. Este fármaco actúa inhibiendo la biosíntesis de ácidos micólicos, el principal componente de la envoltura celular de *M. tuberculosis*, y se ha demostrado que el medicamento es activado por la KatG.

A través de los años, se han encontrado mutaciones en KatG como la L333V, la cual hace a la bacteria resistente al fármaco. Para conocer cómo esta mutante es resistente a la isoniazida es importante conocer su estructura tridimensional y uno de los métodos más utilizados para conocer dicha estructura es la cristalografía de rayos X.

En este proyecto se expresó, purificó y se obtuvieron cristales de la enzima *MtKatG* L333V. Con los cristales se colectaron datos de difracción de rayos X a una resolución de 2.1 Å.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Las micobacterias son microorganismos Gram positivos no flagelados, aerobios estrictos, cuya principal característica es la complejidad de su envoltura celular. Consta de varios compuestos como lo son ácidos micólicos, arabinogalactano (AG), peptidoglicano (PG), polisacáridos y glucolípidos fenólicos propios de cada especie (Martínez *et al.*, 1999).

Mycobacterium tuberculosis, descrita por Robert Koch, es un bacilo patógeno obligado, puede estar de manera latente en el hospedero y está presente en una cuarta parte de la población mundial (OMS, 2018). La tuberculosis es la enfermedad que provoca esta micobacteria, y ha sido la segunda causa de muerte más común ocasionada por un solo agente infeccioso (Angala *et al.*, 2014). El blanco de ataque de *M. tuberculosis* son los pulmones, donde el bacilo es ingerido por macrófagos alveolares. Se piensa que esta fagocitosis es importante para la diseminación bacteriana, lo que le permite colonizar otros órganos como riñones, cerebro, corazón y huesos (Philips *et al.*, 2012).

M. tuberculosis posee una envoltura celular única y se divide en la membrana plasmática y la pared celular. La membrana plasmática consiste de una variedad de glucolípidos y lipoproteínas, algunos glicosilados. La pared celular está compuesta por PG unido covalentemente a AG, que a su vez está esterificado en sus extremos no reductores a ácidos micólicos. La pared celular es esencial para la viabilidad y el sitio de resistencia a muchos medicamentos contra tuberculosis (Angala *et al.*, 2014). Las vías biosintéticas de la pared celular micobacteriana son el blanco de los medicamentos actuales para la tuberculosis; por ejemplo, la isoniazida y etionamida inhiben la síntesis de ácidos micólicos y el etambutol se dirige a la síntesis de componentes de AG (Zhang *et al.*, 2013).

1.2. Tuberculosis

La tuberculosis (TB), causada por *M. tuberculosis*, es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente a los pulmones. La infección se transmite de persona a persona por vía aérea y se estima que en el lapso de un año una persona enferma de TB, puede infectar entre 10 y 15 personas por contacto directo. En personas sanas, la infección es asintomática dado que el sistema inmune forma una barrera contra la bacteria. En personas enfermas, los principales síntomas son tos (en algunos casos presenta hemoptisis), dolores torácicos, fiebre, debilidad, pérdida de peso y sudoración nocturna (OMS, 2018).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que, en el año 2017, 10 millones de personas enfermaron por TB y 1,6 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad, de los cuales, 230 000 eran niños y 0.3 millones eran personas que padecían VIH. Actualmente se calcula que *M. tuberculosis* está en un cuarto de la población mundial de manera latente (personas que están infectadas por la bacteria, pero no se han enfermado y no pueden transmitir la infección). En personas con VIH, la TB es una de las principales causas de muerte. A nivel mundial, se estima que la incidencia de TB está reduciéndose un 2% (OMS, 2018).

A nivel mundial, la TB es un grave problema de salud, donde las poblaciones vulnerables están en países en vías de desarrollo, principalmente en áreas de Asia Sudoriental, África y el Pacífico Occidental, donde los niños, adultos en años reproductivos, personas fumadoras de tabaco y por supuesto, personas infectadas con VIH son los afectados (**Figura 1**) (OMS, 2018).

Existen métodos preventivos para la TB, entre ellos, la vacunación. En muchos países se aplica la vacuna BCG (bacilo Calmatte – Guérin), la cual consta de bacilos atenuados de *Mycobacterium bovis*. Aunque esta vacuna no ofrece una alta protección contra *M. tuberculosis*, ha sido, por mucho tiempo, la vacuna más utilizada en el mundo.

Para el diagnóstico de TB, desde el 2010 la OMS recomendó el uso de la prueba rápida Xpert MTB/RIF®. Esta prueba detecta de forma simultánea la TB y la resistencia

a rifampicina (uno de los fármacos más importantes contra esta enfermedad). Sin embargo, para identificar la TB asociada a VIH, TB multirresistente y TB ultrarresistente, el método utilizado resulta complejo y costoso.

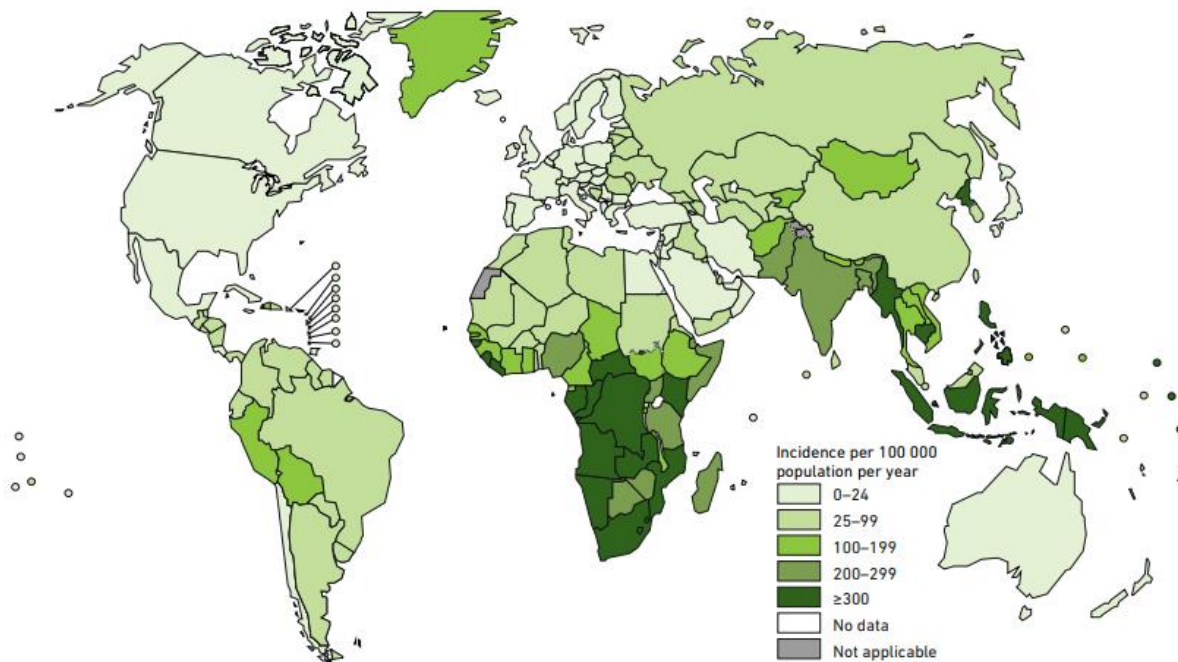


Figura 1. Incidencia estimada de la TB, 2017. Fuente: (World Health Organization, 2018).

1.2.1. La farmacorresistencia

Existen tratamientos farmacológicos que actúan contra la TB y el tratamiento con éstos debe administrarse en un periodo de 6 a 9 meses, según sea la gravedad del caso. Actualmente, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en Inglés) considera aprobados 10 fármacos antituberculosos. Entre los medicamentos de primera línea están la isoniazida (INH, hidrazida de ácido isonicotínico), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA). Desafortunadamente, el bacilo de *M. tuberculosis* ha evolucionado con el paso del tiempo, ocasionando la resistencia a estos fármacos.

Se ha comprobado la existencia de cepas de *M. tuberculosis* que presentan farmacorresistencia (TB – DR, por sus siglas en Inglés) por al menos un medicamento antituberculoso. Esta farmacorresistencia surge a partir de la mala utilización de los

tratamientos, ya sea por prescripción incorrecta, mala calidad de los fármacos o interrupción del tratamiento. Tan solo en 2017, según las estimaciones de la OMS, hubo 558 000 nuevos casos de resistencia a rifampicina, de los cuales el 82% padecían TB – MDR (multirresistente) y 8.5% de este total presentaban TB – XDR (ultrarresistente) (**Tabla 1**). A nivel mundial, apenas el 55% de los enfermos con TB – MDR reciben actualmente un tratamiento eficaz (OMS, 2018).

La TB – MDR es particularmente difícil de tratar y tiene una tasa alta de mortalidad, de 50 a 80% dentro de los 4 meses posteriores al diagnóstico. Por lo tanto, a medida que aumente la prevalencia y la gravedad de la TB – DR, se necesitarán nuevos esfuerzos para comprender las bases moleculares fundamentales de la resistencia a los medicamentos (Cade *et al.*, 2010).

Tabla 1. Tipos de resistencia a fármacos antituberculosos.

Tipos de resistencia	Características
Monorresistencia	Presentan resistencia a un solo fármaco de primera línea
Polirresistencia	Resistencia a más de un fármaco de primera línea diferente de rifampicina e isoniazida
Multirresistencia (MR)	Resistencia a más de uno de los fármacos de primera línea o a isoniazida y rifampicina simultáneamente
Ultrarresistencia (XR)	Multirresistencia sumada a la resistencia de alguno de los tres antituberculosos de segunda línea, así como la resistencia a cualquier fluoroquinolona

1.2.2. Tuberculosis en México

En nuestro país, la TB sigue presente, aun cuando el porcentaje de muertes ha disminuido más de 45%. De acuerdo con la Secretaria de Salud (SS), las entidades federativas con el mayor número de casos y muertes por TB son: Baja California, Veracruz, Guerrero, Sonora, Tamaulipas, Chiapas, Nuevo León y Tabasco (SS, 2016).

El CENAPRECE (Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades) en su Dirección del Programa de Micobacteriosis, es el responsable del diseño, coordinación y supervisión de las estrategias nacionales para el registro, tratamiento y contención de la TB y TB – DR. También se encarga de identificar factores de riesgo, focos de infección y posibles métodos de solución, esto mediante el análisis de datos nacionales (CENAPRECE, 2017).

En 2018, la OMS proporcionó los reportes de las estadísticas de mortalidad, incidencia y éxito de tratamientos de TB y TB/VIH respecto a una población de 129 millones en 2017 (**Figura 2**). Estos datos muestran que, al menos en México, la incidencia de TB en hombres a cualquier edad es mayor que en mujeres. Efectivamente hay una disminución de la mortalidad en los últimos 18 años según la tendencia y en 2017 se registraron 2-2.1 mil muertes. En 2017, el número de casos nuevos notificados de TB incluyendo a pacientes con VIH fue de 28 mil y la incidencia únicamente de TB/VIH fue de 3500. También, en 2016 hubo un aumento en el porcentaje de éxito de los tratamientos suministrados a pacientes con TB.

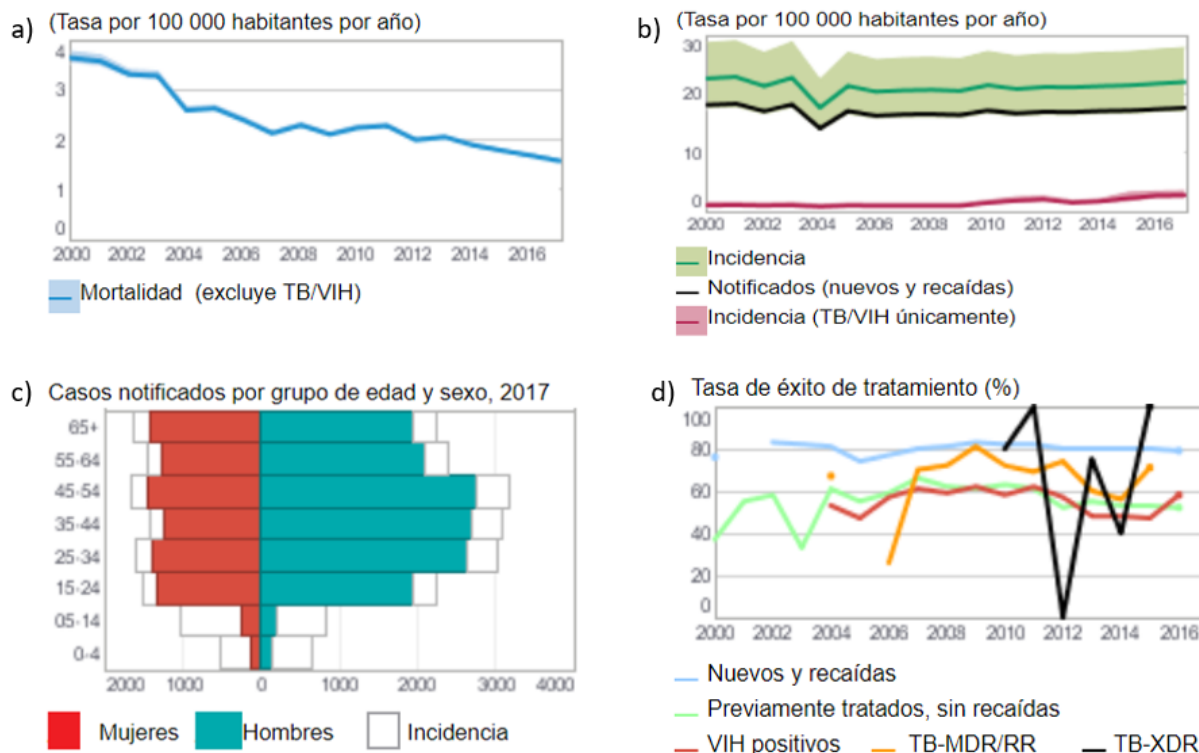


Figura 2. Gráficos estadísticos de TB en México*. a) Tasa de mortalidad de pacientes con TB excluyendo a los portadores de VIH. En 2017, hubo una disminución aproximada del 45%.

b) Tasa de incidencia del 2000 al 2017. En verde, se muestra el total de casos nuevos notificados incluyendo pacientes con VIH. En negro está el total de casos nuevos y recaídas. En rojo, únicamente la tasa de los casos nuevos de TB/VIH. c) Casos notificados por grupo de edad. d) Porcentaje de éxito de tratamientos administrados a pacientes nuevos, recaídas, pacientes VIH positivos, pacientes multirresistentes y ultrarresistentes.

*Datos reportados a la OMS. Las estadísticas de TB son estimadas por la OMS en consulta con los países.

Diversos estudios realizados en pacientes resistentes a antituberculosos de primera línea, específicamente de la INH, han demostrado que el 60% de las cepas resistentes están relacionadas con la presencia de mutaciones o deleciones en el gen *katG*, el cuál codifica a la catalasa-peroxidasa, *MtKatG* (Uribe, 2017).

Se ha reportado que la INH interfiere con la biosíntesis de los ácidos micólicos, ácidos grasos esenciales α -alquilados y β -hidroxilados largos que se encuentran en la pared celular micobacteriana. A nivel molecular la INH se comporta como un profármaco que requiere una activación oxidativa por la catalasa-peroxidasa *MtKatG* que generará el radical isonicotinoilo. Este radical reacciona covalentemente con el dinucleótido adenina de nicotinamida (NAD) celular (Chollet, *et al.*, 2015).

1.3. Generalidades de las catalasas–peroxidasas

Las catalasas–peroxidasas (CPs) pertenecen a la clase 1 de la superfamilia de peroxidasas de plantas, hongos y bacterias. Son enzimas bifuncionales, generalmente homodiméricas, con un grupo hemo por subunidad (Bertrand *et al.*, 2004). La primera catalasa-peroxidasa purificada fue la de *Escherichia coli* (HPI) en 1979 y en 1988 se obtuvo la secuencia de su gen, *katG*. Filogenéticamente las CPs están relacionadas con la superfamilia de peroxidasas de bacterias, hongos y plantas. Estas enzimas aparentemente evolucionaron mucho más tarde que las catalasas mono funcionales y están presentes principalmente en las bacterias aerobias y de manera limitada en algunas arqueas y hongos, probablemente como resultado de la transferencia lateral de genes (Díaz *et al.*, 2012).

Aproximadamente el 40% de las bacterias posee genes *katG*. Se piensa que probablemente esta superfamilia evolucionó a partir de un ancestro de KatG y la reconstrucción filogenética sugiere que es el resultado de varias transferencias laterales además de eventos de duplicación (**Figura 3**). El análisis filogenético muestra dos Clados definidos. El Clado 1 abarca las CPs desde bacterias hasta eucariotas. En esos últimos se clasifican como intracelulares (KatG1) que están presentes en hongos no patógenos. Las CPs extracelulares (KatG2) solo se encuentran en hongos patógenos, que además presentan una KatG intracelular. El Clado 2 está representado por las CPs de arqueas y algunos protistas. (Zamocky *et al.*, 2012).

La actividad de estas enzimas se distingue por llevar a cabo dos reacciones: actividad de catalasa ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) y actividad de peroxidasa ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{AH}_2 \rightarrow 2\text{AH} + 2\text{H}_2\text{O}$) donde AH_2 es un donador de un electrón (Zamocky *et al.*, 2012).

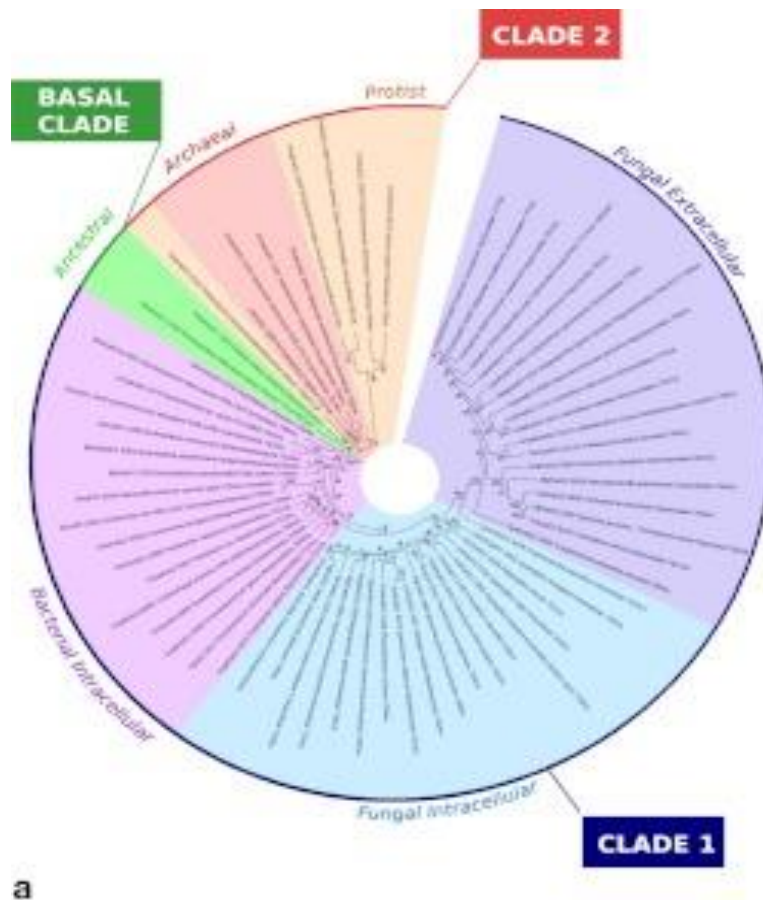


Figura 3. Árbol filogenético de las KatGs. Se observan los dos Clados. La separación entre ambos clados sugiere que evolucionaron por ramas distintas.

El mecanismo de reacción de catalasa se lleva a cabo en dos pasos. En el primer paso, el hemo se oxida por una molécula de peróxido de hidrógeno formando un intermediario llamado Compuesto I. El compuesto I se caracteriza por tener un grupo ferroxilo ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) y un radical catiónico de porfirina ($\text{Por}^{*\text{+}}$). En el primer paso de la reacción se produce una molécula de agua. En el segundo paso de la reacción, el Compuesto I es reducido por otra molécula de peróxido de hidrógeno regresando la enzima a su estado inicial y produciendo una molécula de dióxígeno y otra de agua. La actividad de peroxidasa utiliza el Compuesto I para oxidar ciertos sustratos donadores de un electrón (Vidossich *et al.*, 2012). El sustrato transfiere un electrón en dos reacciones secuenciales formando un compuesto intermediario llamado Compuesto II (García, 2015). El Compuesto II después es reducido por una segunda molécula del mismo sustrato regresando la enzima a su estado basal (**Figura 4**).

Las catalasas-peroxidasas son las únicas peroxidasas que presentan una actividad eficiente como catalasa y como peroxidasa (García, 2015). Sin embargo, a pesar de muchos años de estudio, el sustrato de peroxidasa *in vivo* de las CPs no se ha identificado (Carpena *et al.*, 2003).

En micobacterias, la importancia fisiológica de la actividad de catalasa es que contribuye a la protección contra estrés oxidativo ocasionado por H_2O_2 cuando la micobacteria reside en los macrófagos y cuando esta actividad no es suficiente puede afectar su supervivencia (Zhao *et al.*, 2006). Por otro lado, la actividad peroxidática de KatG es fundamental para la acción de INH, ya que activa el pro-fármaco en una molécula bactericida activa *in vivo* (Zhao *et al.*, 2013).

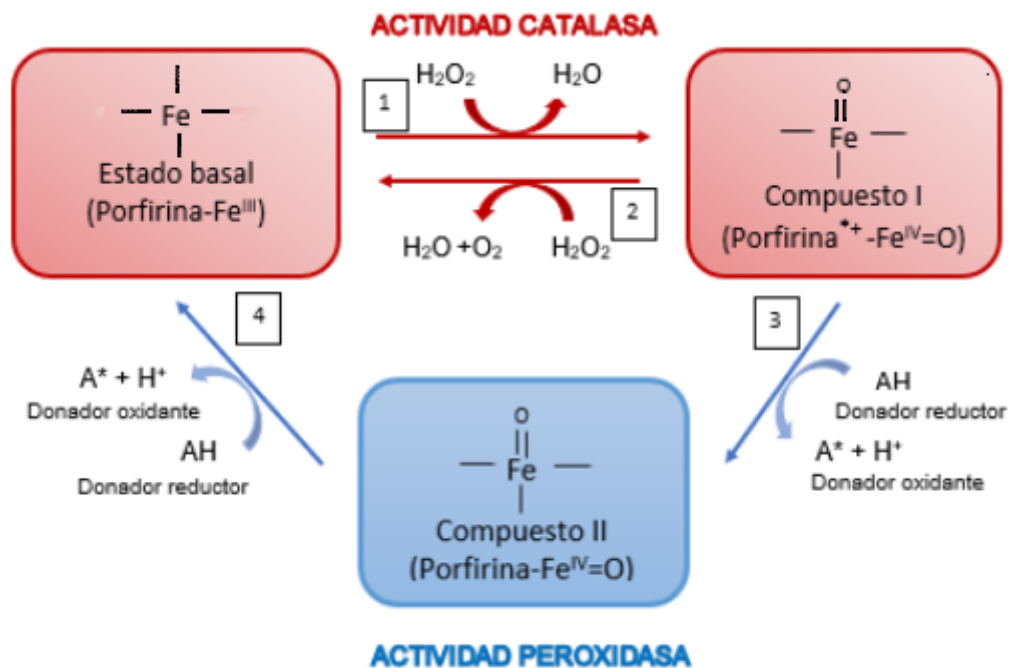


Figura 4. Esquema de la reacción catalítica de las catalasas-peroxidasas. En rojo, se muestran las dos reacciones de la actividad de catalasa. En azul, se muestra la actividad de peroxidasa.

Durante la última década, se han investigado exhaustivamente las catalasas-peroxidasas de procariontas, incluida la determinación de las estructuras cristalográficas de una CP de arquea y tres enzimas bacterianas. También se han realizado estudios bioquímicos de catalasas-peroxidasas fúngicas, principalmente de *Neurospora crassa* (*NcKatG*) y de *Magnaporthe grisea* (*MgKatG2*). De esta última al determinar la estructura cristalográfica se dieron cuenta que, además de las claras similitudes con las *KatG* procariontas, *MgKatG2* presenta varias características estructurales que parecen ser comunes en las todas las *KatG* secretadas por hongos patógenos, como la presencia de un puente disulfuro entre subunidades (Zamocky *et al.*, 2012).

Actualmente se han determinado las estructuras cristalográficas completas de CPs (en su estado nativo) de seis organismos y la determinación del dominio C-terminal de la *KatG* de *E. coli* (**Tabla 2**). Las estructuras cristalográficas revelaron que las *KatG*

poseen enlaces covalentes únicos formados entre las cadenas laterales de tres residuos localizados del lado distal del hemo (Biology *et al.*, 2014).

Tabla 2. Estructuras cristalográficas de las catalasas-peroxidasas

ID PDB (Referencia)	Enzima	Organismo	Fecha de depósito	Resolución (Å)
1ITK (Yamada <i>et al.</i> , 2002)	<i>HmKatG</i>	<i>Haloarcula marismortui</i>	2002	2.00
1MWV (Carpena <i>et al.</i> , 2003)	<i>BpKatG</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	2002	1.70
1UB2 (Biology <i>et al.</i> , 2014)	<i>SeKatG</i>	<i>Synechococcus elongatus</i>	2003	2.40
1U2J (Carpena <i>et al.</i> , 2004)	<i>KatG</i> (dominio C terminal)	<i>Escherichia coli</i>	2004	2.30
1SJ2 (Bertrand <i>et al.</i> , 2004)	<i>MtKatG</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2004	2.40
3UT2 (Zamocky <i>et al.</i> , 2012)	<i>MgKatG2</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>	2012	1.55
5WHS (Vega-García <i>et al.</i> , 2018)	<i>NcKatG</i>	<i>Neurospora crassa</i>	2018	2.60

1.3.1. Estructura de las catalasas-peroxidasas

Las CPs normalmente son homodímeros tanto en estructura cristalográfica como en solución. Cada subunidad es de aproximadamente 750 residuos (aproximadamente 80 kDa de masa molecular) y presentan una superficie de contacto extensa. Estas subunidades se organizan en dos dominios globulares, el dominio N-terminal y C-terminal, cada uno aproximadamente de 40 kDa. Ambos dominios son similares con las peroxidasas como la ascorbato peroxidasa de plantas y la citocromo c peroxidasa de hongos, lo que sugiere que estos dominios resultaron de un evento de duplicación génica y su posterior fusión. El dominio C-terminal no une al grupo hemo y entonces no es activo. El dominio C-terminal es necesario para formar el dímero de la enzima (Baker, *et al.*, 2004). Solo en el dominio N-terminal se encuentra unido el grupo hemo

(Figura 5 A). El dominio N-terminal difiere de las peroxidasas de plantas en una extensión de aproximadamente 60 residuos de los cuales 30 están desordenados, lo que parece indicar una gran flexibilidad. Las CPs presentan también tres asas de más de 30 residuos que contribuyen para formar la cavidad del hemo (Díaz *et al.*, 2012).

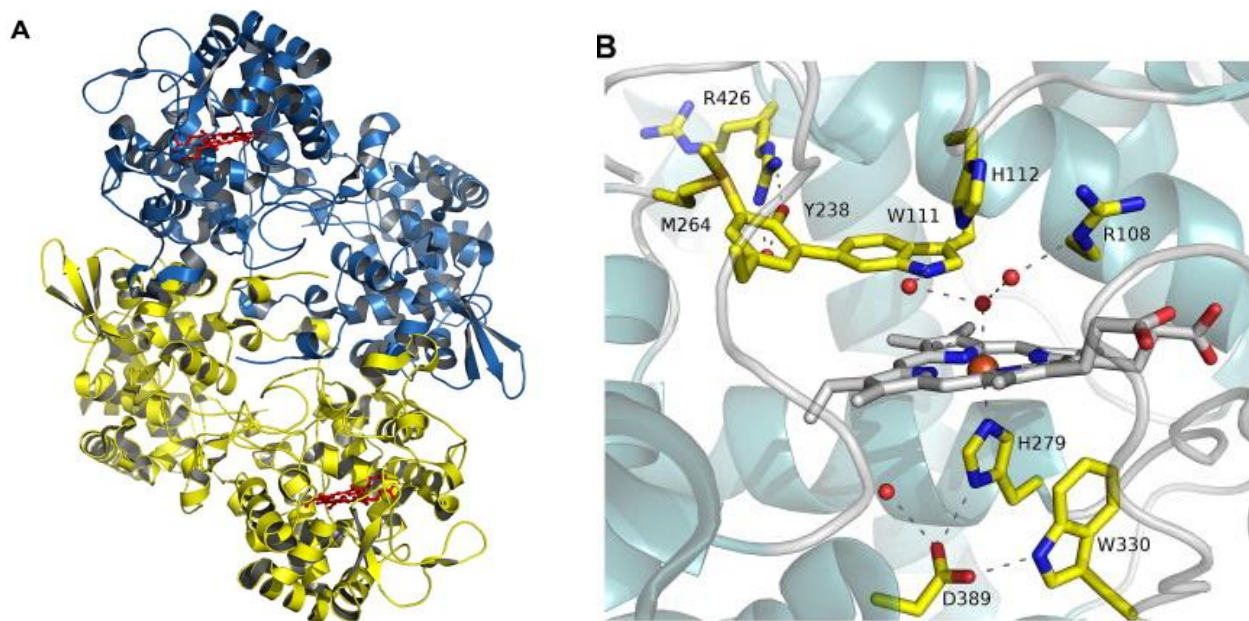


Figura 5. Estructura de la catalasa-peroxidasa. Estructura del dímero de la CP de *Burkholderia pseudomallei*. A) En rojo se muestra el grupo hemo de cada subunidad, en los colores azul y amarillo claro se representa el dominio C-terminal, en azul y amarillo intenso el dominio N-terminal. B) Sitio activo con la presencia del aducto covalente en el lado distal del hemo (tomada de Díaz *et al.*, 2012. PDB-ID 1MWV)

En las catalasas-peroxidasas el grupo hemo divide el dominio N-terminal en dos regiones, el lado proximal y el lado distal. El hemo no está unido covalentemente a la enzima, se encuentra siempre en la misma orientación y en su estado de reposo contiene un hierro férrico que está coordinado con el átomo N ϵ de una histidina del lado proximal (His279 en *BpKatG*). Una característica única de las CPs es la presencia de un aducto covalente en el lado distal del hemo, en el que una tirosina está unida en sus posiciones orto a una metionina por un lado y un triptófano por el otro (Met264, Tyr238, Trp111 en *BpKatG*) **(Figura 5 B)**. En el aducto formado es probable que la metionina lleve una carga positiva lo que podría ocasionar una salida de electrones por el aducto. Este sitio también tiene relación con una arginina móvil conservada que puede adoptar

dos conformaciones dependiendo del pH y se ha demostrado que estos cuatro residuos (Met, Tyr, Trp y Arg) son esenciales para la reacción de catalasa, pero no para la reacción de peroxidasa (Díaz *et al.*, 2012). La sustitución del Trp o la Tyr evita la formación del enlace, mientras que el intercambio de Met no impide la formación del enlace covalente entre el Trp y la Tyr (Smulevich, *et al.*, 2006). También se ha demostrado que si se muta la metionina o la tirosina que forman el aducto covalente, ocasiona que se pierda la actividad catalasa sin modificar la actividad peroxidasa (García, 2015).

Otra característica de las KatGs es la presencia de tres grandes asas denominadas LL1, LL2 y LL3. LL1 y LL2 se encuentran altamente conservadas y estas conforman el canal de acceso del H₂O₂ en el lado distal del grupo prostético. En el asa LL1 se encuentra la tirosina que forma parte del aducto covalente. LL3 está lejos del sitio activo y su papel aún no se ha definido (Smulevich, *et al.*, 2006).

1.4. INH y la KatG de *M. tuberculosis*

Se ha demostrado que la CP de *M. tuberculosis* (*MtKatG*) activa la INH, por ello ha sido objeto de muchos estudios. La especie activada parece ser un radical acil isonicotinoílo, que se une a NAD⁺ / NADH formando un aducto de isoniazida – NADH (INH-NADH), que finalmente confiere la actividad antituberculosa (Cade *et al.*, 2010).

La identificación del sitio de unión a INH en la *MtKatG* es de gran importancia para comprender tanto el proceso de activación del fármaco como la importancia de las mutaciones de la KatG, las cuales pueden ser directamente las responsables de la resistencia a INH (Bertrand *et al.*, 2004). Sin embargo, hasta ahora no hay una estructura de *MtKatG* en complejo con el fármaco.

Se descubrió que INH (un compuesto aromático que consta de un anillo de piridina y un grupo hidrazida) es un potente inhibidor de InhA cuando se forma el aducto covalente INH-NADH por la KatG (**Figura 6**). InhA es una enzima reductasa acarreadora de enoil-acil involucrada en la biosíntesis de ácidos micólicos. Además, que las mutaciones en

KatG pueden dar lugar a la resistencia a INH debido a su incapacidad para activar el profármaco (Cade *et al.*, 2010).

El mecanismo de acción de INH aún no está totalmente entendido debido a que no hay un complejo de la KatG de *M. tuberculosis* con INH. Sin embargo, se ha informado que en dicho mecanismo se generan una variedad de compuestos altamente reactivos, como lo son, superóxido, peróxido, radicales hidroxilo y óxido nítrico, así como también especies orgánicas reactivas (Jena, *et al.*, 2014).

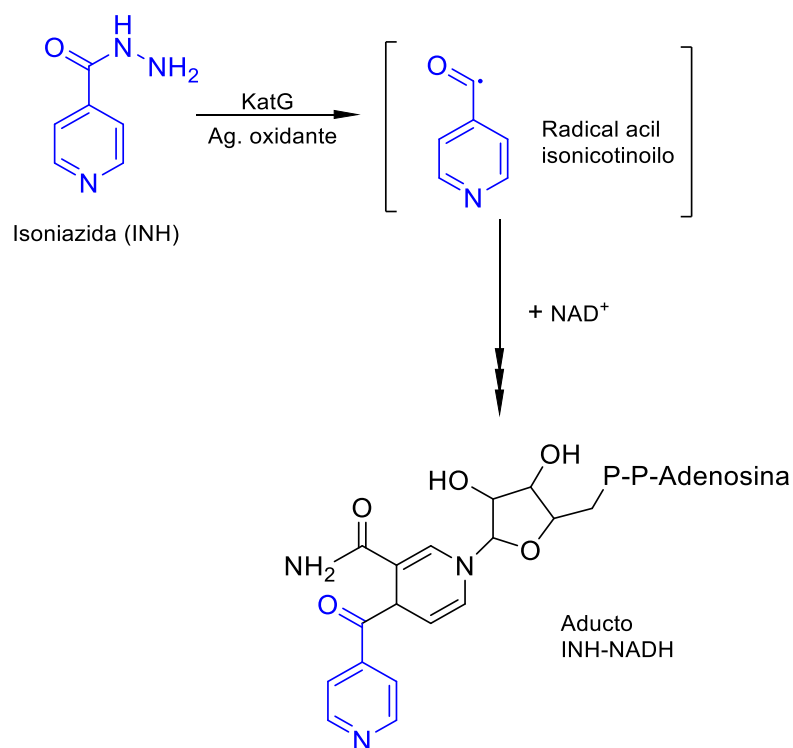


Figura 6. Mecanismo propuesto para la activación de INH por la KatG. La INH (en azul) interacciona con la actividad peroxidática de la KatG formando el radical acil isonicotinoilo. Este radical interacciona con NAD^+ que está en su forma oxidada formando el aducto INH-NADH el cual es inhibidor de la enzima InhA involucrada en la biosíntesis de ácidos micólicos. (Tomada y modificada de Cade, *et al.*, 2010).

Como en todas las CPs, cada monómero de *MtKatG* consta de dos dominios que son principalmente α -helicoidales, donde en el dominio N-terminal está el sitio activo de la enzima (**Figura 7 A**). Con la determinación de la estructura cristalográfica de esta enzima se identificaron también cuatro moléculas de agua bien ordenadas en el lado distal del hemo y a diferencia de la estructura de *BpKatG*, en *MtKatG* no hay ninguna molécula del agua coordinada al hierro (**Figura 7 B**) (Bertrand *et al.*, 2004).

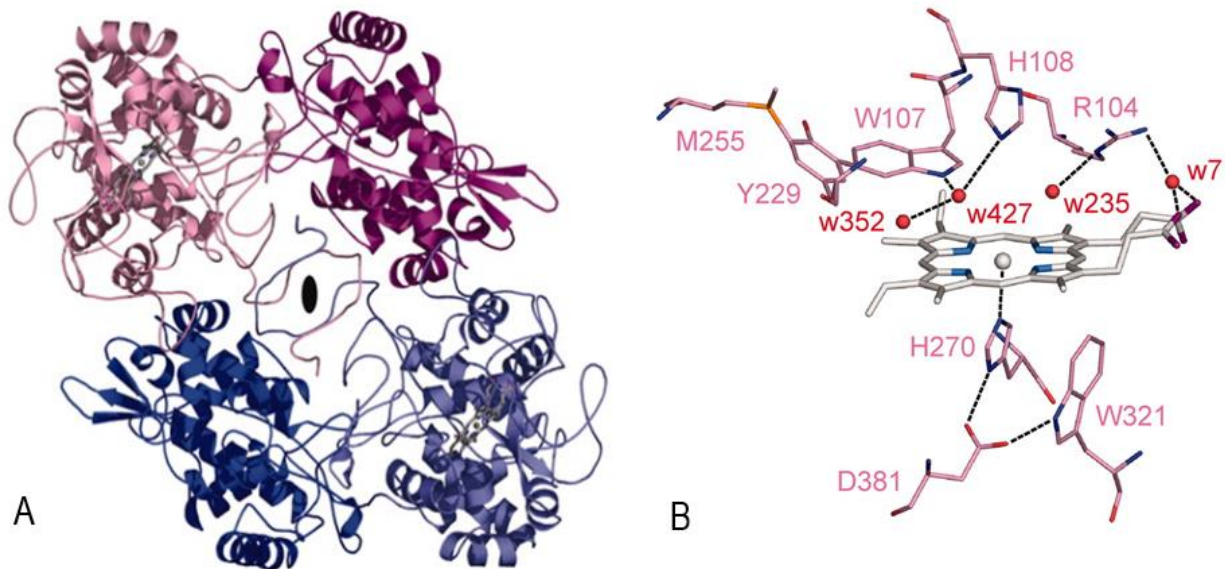


Figura 7. Estructura del dímero de *MtKatG* y el sitio activo. A) En rosa y azul se muestran las dos subunidades, los colores claros indican el dominio N-terminal donde se encuentra el grupo hemo, en color gris. B) Secuencia conservada de los residuos que forman el aducto covalente (Met255, Tyr229, Trp107), la His270 en coordinación con el hierro del del hemo del lado proximal. En rojo, las cuatro moléculas de agua.

La estructura de *MtKatG* se determinó por reemplazo molecular utilizando la estructura de *BpKatG* (Bertrand *et al.*, 2004). Las CPs de *BpKatG* y *SeKatG* han sido las únicas estructuras en complejo con INH. Esto ha permitido identificar los posibles sitios de unión de INH en otras catalasas-peroxidasas (Carpena, *et al.*, 2003; Kamachi, *et al.*, 2015). En *MtKatG*, el posible sitio de unión a INH se encuentra en el asa conservada de la superficie (los residuos del 278 al 312), específicamente en el lado distal del hemo (Bertrand *et al.*, 2004).

Gracias a la determinación de las estructuras cristalográficas de *BpKatG*-INH y de *SeKatG*-INH, y al modelo de HRPC-INH (peroxidasa C de rábano picante) por RMN (resonancia magnética nuclear) (Pierattelli *et al.*, 2004), se han postulado, por acoplamiento, dos posibles sitios de unión de INH en *MtKatG* (**Figura 8**) (Bertrand *et al.*, 2004). También se sabe que los posibles sitios de unión que se encuentran cerca de la cavidad del hemo son los sitios más probables para la activación de INH (Srivastava *et al.*, 2017).

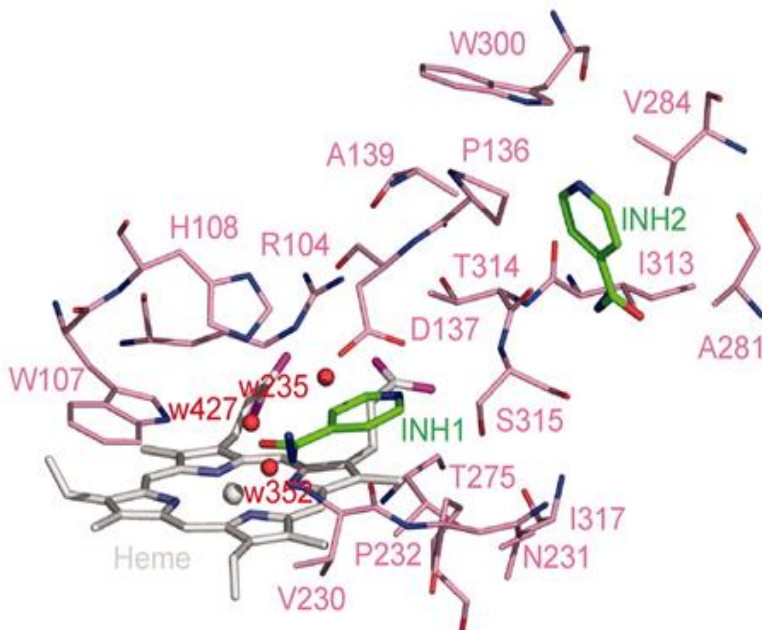


Figura 8. Posibles sitios de unión de INH en *MtKatG*. En verde, la INH. INH1 indica el sitio de unión basado en HRPC, INH2 indica el sitio de unión basado en *BpKatG*. En rosa átomos de carbono, en azul átomos de nitrógeno, en gris el grupo hemo y en rojo las moléculas de agua.

1.4.1. Mutantes de *MtKatG*

Las CPs ganaron notoriedad significativa en 1992 cuando se confirmó que las mutaciones en la *MtKatG* eran mayormente responsables de la resistencia a INH (Carpena, *et al.*, 2003). En los últimos años se han observado diversas mutaciones en aminoácidos ubicados, en su mayoría, cerca del sitio activo, lo cual parece interferir con la unión de la enzima al fármaco provocando la resistencia. Estas mutaciones se han clasificado en tres categorías (**Tabla 3**).

Tabla 3. Clasificación de las mutantes de la KatG (tomada y modificada de Carpena *et al.*, 2003).

Categoría de mutación	Características
Categoría 1	Son mutaciones que afectan específicamente a la reacción de INH. La única mutante que se conoce es S315T.
Categoría 2	Mutaciones que afectan la actividad en general de peroxidasa, ya que pueden alterar la distribución espacial del sitio activo.
Categoría 3	Generalmente son mutaciones que tienen un mecanismo incierto y la enzima puede verse afectada en su plegamiento.

De todas las mutaciones encontradas en aislados de pacientes que presentan resistencia a INH, son pocas cuya estructura cristalográfica se conoce. Se han determinado cuatro estructuras de la CP de *M. tuberculosis*, incluyendo la KatG WT y las mutantes KatG S315T (principal mutante en pacientes resistentes a INH y principal modelo de estudio), KatG D137S (no presenta resistencia a INH y tiene una catálisis mejorada para la activación de INH comparada con la KatG WT) y KatG R418L (que carece de actividad de catalasa, pero no presenta alteración en la activación de la INH). Se han realizado análisis del canal de acceso al sitio activo para ver como las mutaciones D137S, S315T y R418L (esta última no se muestra debido a su baja resolución) podrían estar modificando el canal de acceso a sustratos y en qué se ve modificada la actividad enzimática. El resultado de los análisis muestra como en KatG S315T existe un bloqueo estérico creado por el grupo metilo de la treonina lo que explica una baja cinética de activación provocando la resistencia a INH. Mientras tanto, en la mutante KatG D137S se muestra un canal de acceso ampliado, en comparación con la KatG WT, resultando en una catálisis de activación mejorada (**Figura 9**) (Zhao *et al.*, 2013).

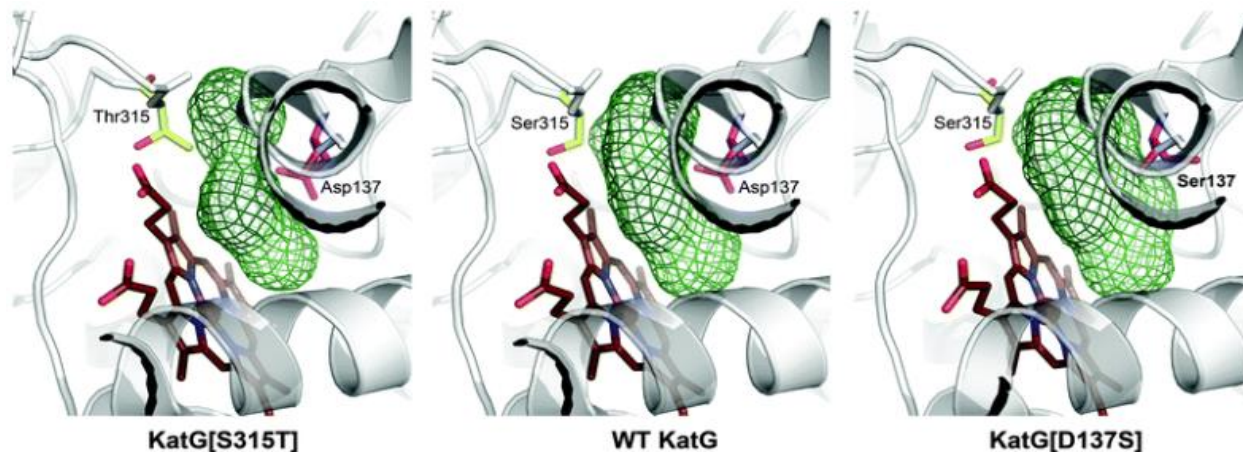


Figura 9. Canal de acceso al sitio activo de *MtKatG*. De izquierda a derecha se muestra la comparación del canal de acceso al sitio activo (en verde) en la mutante *KatG S315T*, *WT KatG* y la mutante *KatG D137S* de *M. tuberculosis* (Zhao *et al.*, 2013).

En los últimos años se han reportado cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH, pero solo la variante *KatG L333V* ha sido reportada en un estudio realizado en México recientemente. Por lo anterior, se sugiere que esta mutación podría ser exclusiva de la población mexicana. Sin embargo, la incidencia de esta mutación resistente a INH es baja (aproximadamente ~2%) (Uribe, 2017).

La mutante *L333V* ya ha sido caracterizada bioquímicamente y se ha visto que cinéticamente se comporta diferente respecto a otras mutantes resistentes a INH (*A256T*, *E287K*, y *A556S*) (Uribe, 2017). Por lo anterior, se planteó una aproximación para analizar los cambios estructurales en la enzima *MtKatG L333V* debidos a la mutación y que pudieran explicar la resistencia a la INH. La aproximación consiste en determinar su estructura tridimensional por cristalografía de proteínas, que es el método más utilizado.

1.5. Cristalización de proteínas

El detalle en una estructura tridimensional de una macromolécula es importante, por ejemplo, para el diseño de drogas, para mejorar enzimas con aplicaciones en la industria, para analizar cambios conformacionales, para analizar la interacción proteína-proteína, proteína-ácido nucleico y proteína-ligando, entre otras. Existen tres técnicas principales para la determinación de estructuras de macromoléculas: la RMN,

la microscopía electrónica y la cristalografía. La cristalografía es la técnica más exitosa para determinar la estructura de macromoléculas, pero solo puede ser aplicada cuando se obtienen cristales adecuados.

La cristalización es un paso difícil y representa un cuello de botella en la determinación de una estructura cristalográfica.

La cristalización de proteínas es una herramienta que se desarrolló en la segunda mitad del siglo XIX logrando sus primeros objetivos: proporcionar un medio para la purificación de proteínas específicas en una muestra y demostrar que una proteína había sido purificada (McPherson, 2004). Actualmente la cristalización de proteínas es la base para conocer la estructura tridimensional de una macromolécula y así entender, por ejemplo, su funcionamiento.

La palabra “cristal” proviene del griego *krustallas* que significa “solidificado por enfriamiento”. Un cristal (**Figura 10**) está constituido por millones de unidades idénticas conocidas como celdas unitarias. Estas celdas están empaquetadas junto con otras en tres dimensiones en forma paralela y el número de moléculas por cada celda unitaria es el mismo en todas las celdas de un cristal (Branden, 1999).

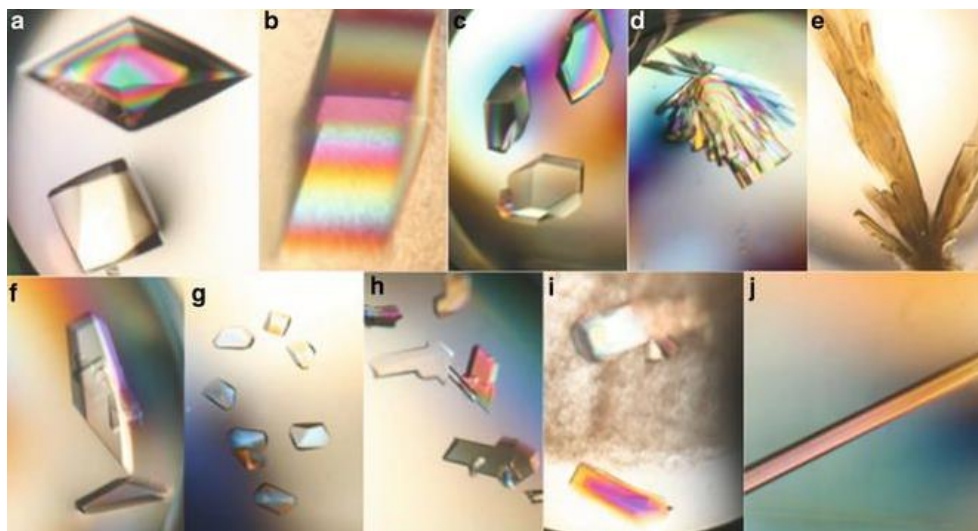


Figura 10. Cristales de proteína. a) taumatina, b) tripsina bovina, c) lisozima tetragonal, d) lisozima monoclinica, e) catalasa de hígado de bovino, f-h) tres formas cristalinas de RNasa S bovina, i) beta-lactoglobulina, j) concanavalina (Tomada de McPherson A. 2017).

Para obtener cristales de una proteína es importante que la proteína esté muy pura (más del 97%) y homogénea. Además, la proteína debe estar soluble en un solvente, que generalmente es una solución buffer a un determinado pH. La solución de proteína debe ser llevada a la sobresaturación, donde comienzan a formarse pequeños agregados pre-nucleares en condiciones controladas de pH, fuerza iónica y temperatura.

La cristalización se desarrolla en dos pasos, la nucleación y el crecimiento. La nucleación puede ser el paso más difícil ya que representa una transición de fase de primer orden, donde las moléculas pasan de un estado completamente desordenado a uno ordenado, formando núcleos críticos. Posteriormente los núcleos crecen por la adición de moléculas al núcleo (McPherson, 2004). El crecimiento de cristales generalmente ocurre de manera lenta y solo se formarán cristales bajo condiciones fisicoquímicas favorables, aunque el empaquetamiento no sea tan estable debido a las moléculas de agua que llenan huecos (Rudiño-Piñera, 2010).

Tanto la nucleación como el crecimiento dependen críticamente de la sobresaturación de las soluciones madre que dan lugar a los cristales. La sobresaturación es una condición de no equilibrio en la que cierta cantidad de la proteína excede el límite de solubilidad, bajo condiciones fisicoquímicas específicas presentes en la solución. El equilibrio se restablece mediante la formación y el desarrollo de un estado sólido, como los cristales. La base de la cristalización de proteínas está determinada en diagramas de fases de solubilidad. La solubilidad se divide en una región de baja saturación y una de sobresaturación. La región de sobresaturación se divide en las regiones metaestables y lábiles. En la región metaestable, los núcleos se desarrollan en cristales, pero no se da la nucleación. En la región lábil pueden ocurrir la nucleación y el crecimiento. La región final representa una sobresaturación muy alta, es la región de precipitación, donde obtener núcleos es más probable (**Figura 11**) (McPherson, 2017).

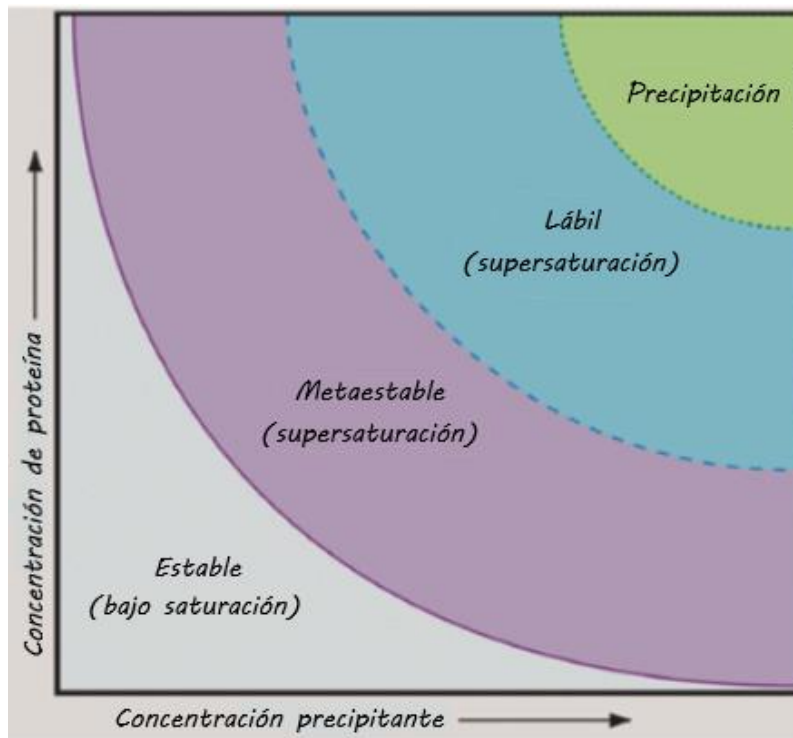


Figura 11. Diagrama de fases para la cristalización de proteínas. La línea morada representa un equilibrio entre la fase sólida y la fase de moléculas libres (tomada y modificada de McPherson, 2017).

La cristalografía de rayos X constituye la herramienta más poderosa para el estudio de la estructura tridimensional de las macromoléculas. Los rayos X interactúan con la materia a través de los electrones que la forman y que se están moviendo a velocidades menores que la velocidad de la luz. Cuando la radiación electromagnética de los rayos X alcanza un electrón, éste se convierte en una fuente de radiación secundaria. Cuando se incide un haz de rayos X sobre un cristal, éste choca con los átomos haciendo que los electrones que se encuentren en su trayectoria vibren con una frecuencia idéntica a la de la radiación incidente (Rudiño-Piñera, 2010).

El resultado que se obtiene de difractar un cristal de proteína son los patrones de difracción. El patrón de difracción de un cristal está directamente correlacionado con su grado de orden interno y cuanto mayor sea la resolución a la que se extiende, estructuralmente habrá más información del detalle de las moléculas en el cristal. La aplicación de cristalografía de rayos X depende de cristales de tamaño y calidad suficiente para una colecta de datos que permita determinar la estructura de una proteína (McPherson, 2004).

1.5.1. Técnicas de cristalización

Existen diversas técnicas (**Tabla 4**) para cristalizar una proteína. Por los resultados y la facilidad, algunas técnicas son más utilizadas que otras.

Tabla 4. Técnicas de cristalización (información tomada de Drenth, 2007, Rudiño-Piñera, 2010).

Técnica	Descripción
Microbatch	Es un método simple y muy utilizado. Consiste en mezclar la solución de proteína con la solución de cristalización formando una gota, llevando la solución a la sobresaturación. Posteriormente la gota se cubre con un aceite que evita la evaporación.
Difusión líquido-líquido	La solución de proteína se coloca sobre la solución precipitante, en relación 1:1 dentro de un poro pequeño para que después entre en un tubo capilar.
Difusión de vapor: Gota colgante	La gota se prepara sobre un cubreobjetos siliconado, adicionando la misma cantidad de proteína y agente precipitante. El cubreobjetos con la gota se coloca sobre un pozo con 1 ml de solución precipitante. Se cierra al vacío para alcanzar el equilibrio por difusión de vapor.
Difusión de vapor: Gota sentada	Suele utilizarse cuando la proteína tiene una baja tensión de superficie y no puede ponerse sobre un cubreobjetos siliconado.
Microdiálisis	La composición de la solución es alterada por difusión de componentes de bajo peso molecular a través de una membrana semi permeable hasta alcanzar el equilibrio.

Hay dos etapas en la búsqueda de cristales de proteínas para la difracción de rayos X. La primera es identificar las condiciones en las que se producen los cristales y la segunda consiste en optimizar las condiciones, es decir se realiza una variación sistemática de las condiciones iniciales para obtener mejores cristales.

2. ANTECEDENTES

En el proyecto de Maestría de la M. en C. Brenda Georgina Uribe Vázquez, realizado en el Instituto de Biotecnología, UNAM, se estudiaron y caracterizaron

bioquímicamente nuevas variantes de la enzima KatG de *M. tuberculosis* encontradas por el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en pacientes mexicanos enfermos de TB resistentes a INH. Hasta ese entonces, la relación entre la resistencia INH con la actividad de catalasa y peroxidasa de la KatG había sido poco estudiada.

En su proyecto, la M. en C. Brenda Uribe trabajó con 4 nuevos polimorfismos de nucleótido simple (SNP) que generan el cambio de un aminoácido en *Mt*KatG. Dentro de estas 4 variantes se encuentra la mutante L333V. Además, utilizó *Mt*KatG-WT como control sensible y como control resistente a INH la variante S315T, las cuales ya tienen sus estructuras tridimensionales determinadas (Zhao *et al.*, 2006).

La metodología del proyecto consistió en amplificar el gen de *katG* y realizar Secuenciación de Sanger. Posteriormente realizó la construcción de plásmidos de expresión utilizando el vector de expresión pkk223-3 para producir el plásmido pkk-KatG-S315T. También se realizó mutagénesis sitio dirigida para la construcción de las 4 variantes: A256T, E287K, L333V y A556S utilizando el plásmido pKK-KatG-WT. Para facilitar la purificación, el vector añade una etiqueta de 6 histidinas en el N-terminal de la enzima. Los plásmidos se utilizaron para transformar la cepa MC1061 Δ bioH/pREP4 de *Escherichia coli*. Posterior a los métodos de transformación, expresión y purificación, se realizaron los ensayos enzimáticos correspondientes para determinar la actividad de catalasa, actividad de peroxidasa, producción de radicales libres y, por último, se determinó la formación del aducto INH-NAD.

Se sabe que varias cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH presentan cambios específicos en el dominio catalítico de KatG, aunque ninguna de las mutaciones, a excepción S315T, está cerca al grupo hemo. Se encontró que la variante L333V puede afectar el enlace de coordinación de la H270 con el hierro del grupo hemo. Analizando la ubicación de la mutación generada ésta se encuentra a una distancia de 9.8 Å entre el C α de la H270 y el C γ 2 de la V333 (**Figura 12**).

Se ha observado durante mucho tiempo que la resistencia a INH en micobacterias causantes de TB, a menudo se ha relacionado con niveles reducidos de actividad de catalasa (Bertrand *et al.*, 2004). Al cuantificar la actividad de catalasa, se observó que para la variante L333V, la actividad aumenta cerca de un 200%, por lo que se piensa,

podría estar relacionada con la resistencia a INH. Sin embargo, para las otras actividades (peroxidasa, radicales libres y formación del aducto) sí hay una disminución de la actividad más no de la eficiencia catalítica para el caso de la formación del aducto (Uribe, 2017).

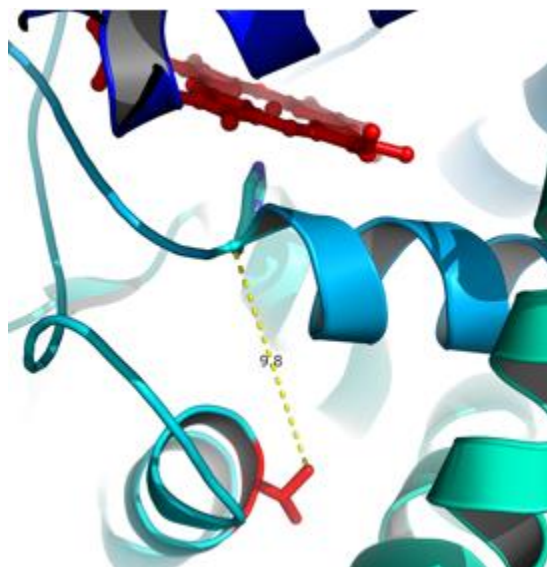


Figura 12. Distancia de la mutación L333V respecto a la histidina que coordina al hierro del hemo. En rojo, se muestra la valina en la posición 333 y la distancia del C α de la His270 al C γ 2 de la Val333.

2.1. Localización estructural de la mutación L333V en *MtKatG*

Previo a obtener la estructura cristalográfica de la *MtKatG* L333V, analizamos la ubicación de la mutación L333V en la *MtKatG* WT (PDB ID: 1SJ2). Lo que observamos a continuación es que la mutación se encuentra a 14.7 Å de distancia del hierro del hemo (hierro del hemo al C γ 2 de la Val333) (**Figura 13**).

La M. en C. Brenda Uribe, menciona en su proyecto de maestría que, aunque la mutación L333V no se encuentra cerca del hemo, la distancia que tiene con respecto a la H270 está provocando una afectación en el enlace de coordinación de la histidina con el hierro del hemo. Se piensa que este cambio de aminoácidos provoca que interacciones hidrofóbicas cercanas de las hélices puedan estar afectando la unión, la estabilidad o puedan estar cambiando el ambiente en que se encuentra el grupo hemo.

Al analizar el ambiente en el que se encuentra la mutación, localizamos los residuos hidrofóbicos que son: la F332 en la misma hélice que V333, las L398 y L404 en una hélice vecina cercana y la V267 en la hélice donde se encuentra la histidina que coordina al hierro. La V267 y la V333 correspondiente a la mutación están a una distancia de 4.4 Å. Y el resto de los aminoácidos se encuentran en un intervalo de distancias de 3.9 y 4.5 Å siendo la distancia más corta entre la V333 y L398 debido a la orientación de la Val333 (**Figura 14**).

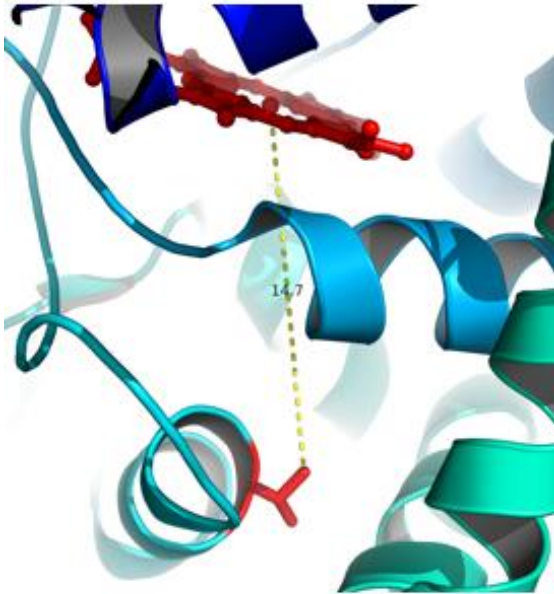


Figura 13. Localización de la mutación L333V con respecto al hierro del hemo. La valina se muestra en rojo.

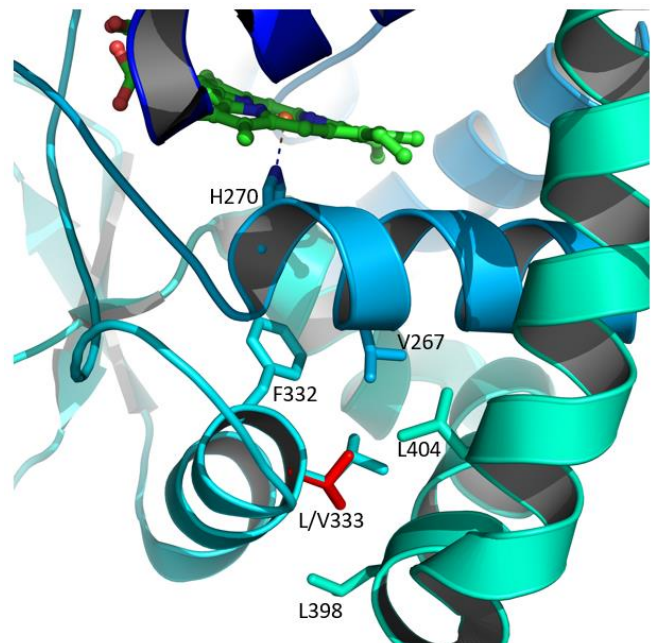


Figura 14. Residuos hidrofóbicos cercanos a la L333V. En azul se muestra la L333 y sobrepuesta con la V333 en rojo.

Lo que observamos es que el ambiente hidrofóbico en la mutante, probablemente se mantenga sin cambios en general. Aunque habrá que analizar con cuidado la estructura cristalográfica de la *MtKatG* L333V para revisar si hay cambios respecto a la *MtKatG* WT.

3. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a INH ha ocasionado un problema global en el tratamiento contra la TB. Este proyecto será la base para determinar la estructura cristalográfica de la mutante *KatG* L333V de *M. tuberculosis*, para en el futuro determinar la estructura de la *MtKatG* L333V en complejo con INH. La información que se obtenga de la estructura cristalográfica ayudará a conocer la enzima en su forma tridimensional y saber con más precisión qué cambios está ocasionando la mutación en un aminoácido y cómo es que se relaciona con la resistencia a INH.

4. HIPÓTESIS

Los ensayos de cristalización de *KatG* L333V de *Mycobacterium tuberculosis* nos permitirán obtener cristales de la enzima que difracten para coleccionar datos de difracción de rayos X.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Obtener cristales que difracten de la *KatG* L333V de *Mycobacterium tuberculosis*.

5.2. Objetivos específicos

- Expresar y purificar la mutante L333V de *MtKatG*.
- Realizar pruebas de cristalización para la enzima mutante *MtKatG* L333V.
- Optimizar las condiciones de cristalización que resulten exitosas para la *MtKatG* L333V.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Transformación

Se prepararon placas Petri de medio LB con 200 µg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de kanamicina (el vector presenta resistencia a ampicilina y la cepa de *E. coli* es resistente a kanamicina). Se pipetearon 2 µL (a 89 ng/µL) del vector de la variante L333V de *MtKatG* y se adicionó a 60 µl de células competentes con glicerol al 10% de la cepa MC1061 ΔbioH/pREP4 de *E. coli*. Después las células se pipetearon a una celda de electroporación y se electroporaron a 1.8 Volts por 3 ms. A la celda se le adicionaron 980 µl de medio SOB (triptona 2% w/v, extracto de levadura 0.5% w/v, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM y MgSO₄ 20 mM) más 20 mM de glucosa y 10 mM de cloruro de magnesio. Se vació el contenido en un tubo de ensaye para enzima. Posteriormente se incubó el tubo durante una hora a 30° C con agitación. Por último, en las cajas Petri ya preparadas se plaquearon 50 µL de las células transformadas y se incubaron a 30° C durante toda la noche. Al día siguiente se almacenaron a 4° C.

6.2. Expresión de *MtKatG* L333V

Para la expresión de la enzima se realizó un cultivo preinóculo con 15 mL de medio LB con 200 µg/mL de ampicilina y 50 µg/mL de kanamicina. El precultivo se inoculó picando con una punta de micropipeta una colonia de las células transformadas. El preinóculo se incubó a 30 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se preparó un cultivo de 1 L de medio LB con ampicilina/kanamicina adicionando 30 mg/L de cloruro de hemina disuelta previamente en NaOH 0.2 N. Este nuevo medio se inoculó con 10 mL de preinóculo y se incubó a 30 °C hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.6 a 600 nm. La expresión se indujo con 0.5 mM de IPTG y se continuó incubando durante 3.5 horas. Posteriormente se centrifugaron las células a 4900 rpm por 15 min a 4 °C. Las células centrifugadas se guardaron a – 70 °C.

6.3. Purificación

La pastilla de células de la enzima *MtKatG* L333V se resuspendió en 15 mL de buffer A con fosfato de sodio 50 mM, pH 7.5 con NaCl 0.5 M e imidazol 5 mM para sonicar por 25 s durante 5 ciclos, en hielo. La muestra se centrifugó a 10000 rpm por 20 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Para la purificación se utilizó una columna de níquel Ni - NTA de 5 mL y una bomba peristáltica. La columna se equilibró con 15 mL de buffer A, y después se pasó el sobrenadante. La columna se lavó con 50 ml de buffer A y 30 ml de buffer B que contenía fosfato de sodio 50 mM, pH 7.5 con NaCl 0.5 M e imidazol 35 mM. La *MtKatG* se eluyó con 5 ml de buffer C que contenía fosfato de sodio 50 mM, pH 7.5 con NaCl 0.5 M e imidazol 300 mM, y se colectó la muestra que se distingue por su color café característico (este protocolo se realizó junto con la M. en C. Brenda Uribe).

Para analizar la pureza de la enzima se realizó un SDS-PAGE al 10% y se analizó también el sobrenadante de la WT como control de expresión. El gel se corrió a 100 V y se tiñó con azul de Coomassie. Las bandas de *MtKatG* se observaron a 80 kDa aproximadamente. Las muestras se dializaron en 1 L de buffer de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.5 con 3 mg de cloruro de hemina y 20 mM de imidazol. La enzima se puso en una membrana de diálisis con corte de 6 – 8 kDa y se dializaron a 4 °C con agitación durante toda la noche. Se realizó una segunda diálisis con 1 L de buffer de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.5 con 3 mg de cloruro de hemina sin imidazol por 3 h. Después de la diálisis se realizó otro SDS-PAGE al 10%.

También se realizó una segunda purificación, para un nuevo sobrenadante, con el equipo BioLogic de Bio Rad utilizando también la misma columna de níquel Ni - NTA de 5 mL y los mismos buffers. La purificación se realizó a una velocidad de 2 mL por minuto. De esta purificación se colectaron fracciones de 2 mL y se realizó un cromatograma.

Se realizó un SDS-PAGE al 10% del sobrenadante y las fracciones colectadas. Se realizó una única diálisis durante toda la noche en 1 L de buffer de fosfatos 20 mM pH 7.5 con 3 mg de cloruro de hemina.

6.4. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de la enzima mutante *MtKatG* L333V se determinó por el método de Bradford realizado en placas de Elisa y midiendo a una longitud de onda de 595 nm. Una vez determinada la concentración, se utilizó un centricon Amicon de 15 mL para concentrar la mutante *MtKatG* L333V.

6.5. Pruebas de cristalización

Para cristalizar la mutante *MtKatG* L333V se trabajó con la enzima sin ligandos. Se utilizaron dos métodos de cristalización, *microbatch* y difusión de vapor de la gota sentada y gota colgante.

El método de *microbatch* consistió en mezclar 1 μ L de enzima con 1 μ L del agente precipitante y cubrirlos con 10 μ L de parafina para evitar la evaporación. Este método se realizó manualmente a 18^o C en placas de 72 pozos para la mutante *MtKatG* L333V. Los kits de cristalización que se utilizaron fueron *Wizard I-IV* de la marca *Jena Bioscience*, los kits *Index 1-2* y *PEG Ion-Crystal Screen Cryo* de la marca *Hampton Research*.

Para el método de difusión de vapor de la gota sentada se utilizó el robot de cristalización “Mosquito LCP” y placas de 96 pozos. Las gotas se formaron con 0.3 μ L de enzima *MtKatG* L333V y 0.3 μ L de agente precipitante. En el pozo se colocaron 40 μ L del agente precipitante. Las placas fueron selladas herméticamente. El único Kit utilizado para poner pruebas con el robot fue *Wizard I-II* de la marca *Jena Bioscience*. También, de manera manual, se prepararon placas empleando un volumen de 0.8 μ L para la enzima y el agente precipitante para formar las gotas. Los kits utilizados en esta prueba fueron *Wizard III-IV*, *Index 1-2* y *PEG Ion-Crystal Screen Cryo* de la marca *Hampton Research*.

6.6. Optimización

De las pruebas de cristalización se hallaron condiciones en las que se encontraron cristales probablemente de la enzima, ya que presentaron color café. Con estos hallazgos se procedió a realizar matrices de optimización de dichas condiciones. El método de cristalización utilizado fue el de difusión de vapor de la gota colgante en placas de 24 pozos. Este método consistió en pipetear 1 ml del agente precipitante en cada pozo. La gota se formó sobre un cubreobjetos siliconizado mezclando 1 μL de enzima con 1 μL del agente precipitante. El cubreobjetos se sella con el pozo utilizando grasa para vacío. En cada optimización se varió la concentración del agente precipitante y de la sal, dependiendo de la condición de cristalización.

También se realizó la optimización de una condición de cristalización en una placa de 96 pozos, con el método de difusión de vapor de la gota sentada. Aquí se varió la concentración del agente precipitante y el pH. La placa se preparó con el robot de cristalización “Mosquito LCP”.

6.7. Sobreenfriado de cristales, colecta de datos y determinación de la estructura

Los cristales se sobreenfriaron de manera individual utilizando *loops* y haciéndolos pasar por la solución Crioprotectora propia de cada condición para sumergirlos en nitrógeno líquido dentro de un *puck*. El sobreenfriado de los cristales lo realizó el Dr. Enrique Rudiño Piñera.

La colecta de datos de difracción de rayos X y la determinación de la estructura la realizó la Dra. Adelaida Díaz Vilchis.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Selección de células transformadas

La cepa MC1061 Δ bioH/pREP4 de *E. coli* fue previamente construida para seleccionar clonas con actividad de complementación de BioH en medio mínimo sólido (M9 MM) con glucosa como fuente principal de carbono y con la introducción del plásmido pREP4 (Invitrogen), el cual expresa el represor de lactosa *LacI* y le confiere resistencia a kanamicina (Flores, *et al.*, 2012). Para sobreexpresar la enzima *MtKatG* L333V en dicha cepa, se utilizó el vector de expresión pKK223-3 que tiene clonado el gen *katG* en los sitios EcoRI y HindIII. El plásmido, resultado de la ligación, PKK-KatG-WT, que también tiene el promotor *tac*, se utilizó como molde para que, por el método de *megaprimer*, se incorporara la variante *MtKatG* L333V que se obtuvo por medio de mutagénesis sitio dirigida y que, a su vez, adiciona una etiqueta de 6 histidinas en el N-terminal de la enzima. Este plásmido de 6786 pb cuenta también con un gen de resistencia a ampicilina (**Figura 15**). La construcción del plásmido con la adición de la etiqueta de histidinas la llevó a cabo la M. en C. Brenda Uribe.

Debido a las dos transformaciones de la cepa de *E. coli*, fue necesario crecer las bacterias en placas de agar LB con ambos antibióticos (ampicilina y kanamicina) para asegurar únicamente la obtención de las células transformadas con la enzima *MtKatG* L333V. La adición de 0.5 mM de IPTG fue suficiente para conseguir una buena inducción de la expresión de la enzima ya que, el promotor *tac* es entre 7 y 11 veces más eficiente que *lac* (DeBoer, *et al.*, 1983). Además, la adición de cloruro de hemo garantiza que *E. coli* tenga grupo hemo suficiente para la sobreexpresión de la enzima.

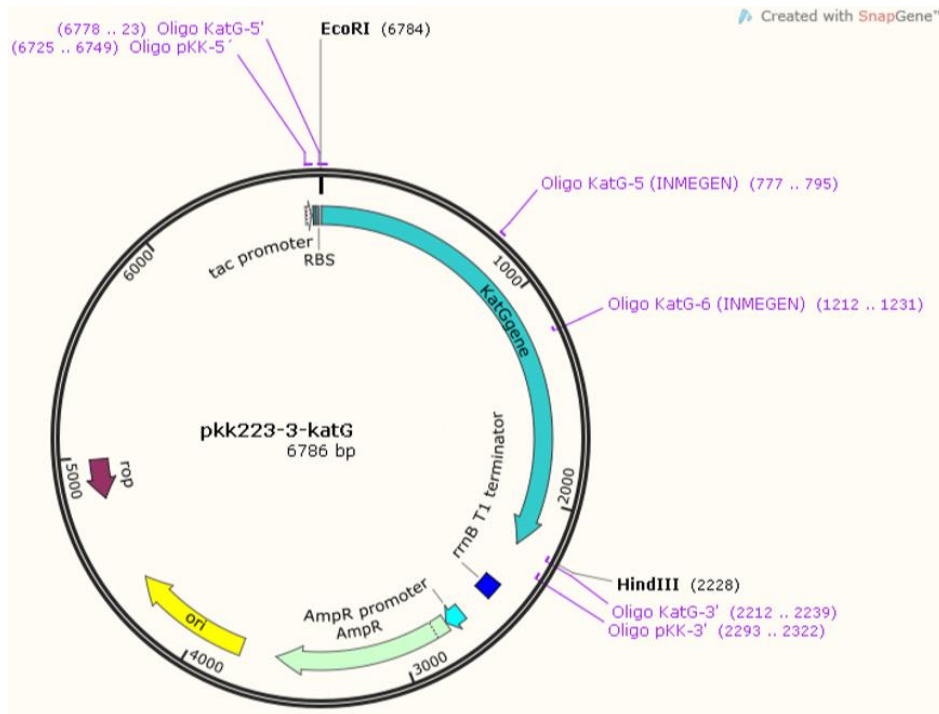


Figura 15. Construcción del plásmido pKK223-3-*katG* (tomada de Uribe, B. 2017).

7.2. Purificación de *MtKatG* L333V

Después de obtener el sobrenadante de las bacterias lisadas, se procedió a realizar la purificación por cromatografía de afinidad, para lo cual se utilizó una bomba peristáltica donde el flujo se controló manualmente y una columna de afinidad a níquel (Ni-NTA). La elución de la enzima se realizó de forma cualitativa, utilizando un buffer de elución con una concentración de imidazol de 300 mM, descartando aproximadamente 1 mL al comienzo de la aparición de la enzima en solución color café, característico de la enzima y descartando también 1 mL al finalizar la elución. El color café de la enzima en solución se debe a la presencia de un grupo hemo con el Fe^{3+} con una banda de absorción alrededor de 400 nm.

La función de la baja concentración de imidazol (35 mM) en el buffer de lavado es para evitar que se unan proteínas celulares inespecíficamente, las cuales no fueron etiquetadas con histidina. Aumentar gradualmente la concentración de imidazol provoca, primero, la selectividad por las proteínas que presentan una etiqueta de

histidinas y finalmente a una alta concentración (300 mM) el imidazol desplaza a las moléculas de histidina y como consecuencia la enzima se eluye de la columna.

Después de la purificación se realizó un SDS-PAGE con el extracto de la lisis celular en comparación con la *MtKatG* L333V purificada para analizar la pureza (**Figura 16**). Así mismo, se utilizó como control el sobrenadante de la *MtKatG* WT proporcionado por la M. en C. Brenda Uribe. En el gel podemos observar una banda ancha con una masa molecular de 80 kDa aproximadamente en cada una de las muestras, que corresponden al monómero de las enzimas *MtKatG* WT y *MtKatG* L333V.

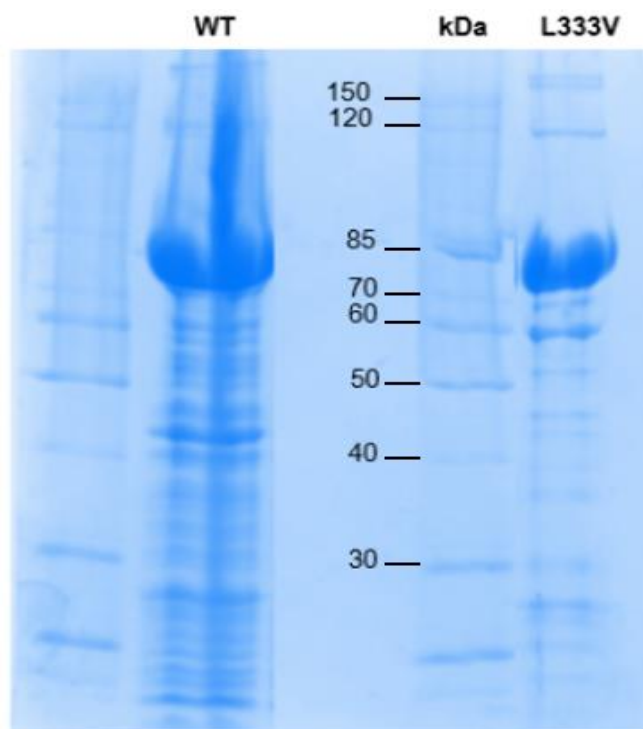


Figura 16. SDS-PAGE 10% con *MtKatG* WT y *MtKatG* L333V. Las bandas azul intenso presentan una masa molecular aproximada de 80 kDa y corresponden a las enzimas *MtKatG* WT y *MtKatG* L333V. Del lado izquierdo se muestra el sobrenadante de la *MtKatG* WT y del lado derecho la *MtKatG* L333V purificada.

Antes de purificar la enzima, se aprecian otras bandas de menor y mayor masa molecular, las cuales corresponden a otras proteínas celulares de *E. coli* contenidas en el sobrenadante. Aunque después de la purificación se siguen observando ciertas bandas, la banda correspondiente a la *MtKatG* L333V tiene una mayor proporción que las otras bandas de proteínas, lo que indica que es la enzima mayoritaria. De este gel

podemos decir que la enzima se encuentra con la pureza suficiente para realizar las pruebas de cristalización, y la cristalización es también un método de purificación.

Después medimos la concentración de la enzima por el método de Bradford. El primer resultado de la cuantificación nos indicaba una baja concentración, por lo que se concentró a 24 mg/mL (**Tabla 5**) para realizar las pruebas de cristalización.

Tabla 5. Concentración de la enzima *MtKatG* L333V

Enzima	Concentración inicial (mg/mL)	Concentración final (mg/mL)	Eficiencia de la purificación (mg/L)
<i>MtKatG</i> L333V	4.84	24.2	24.2

7.3. Pruebas de cristalización de *MtKatG* L333V

Todas las pruebas de cristalización se realizaron en la misma temperatura (18° C). Se pusieron un total de 816 condiciones diferentes empleando las técnicas de *microbatch* y difusión de vapor por gota sentada (de forma manual y con el robot de cristalización). De estas pruebas, se encontraron cinco condiciones en las que se obtuvieron cristales (**Tabla 6**). Estos cristales podían distinguirse de otras formaciones cristalinas (sal, por ejemplo) debido a que presentan un color café característico de la enzima (**Figura 17**). Como se muestra en la figura 17, estos cristales muestran una geometría diferente.

El tiempo en que se encontraron los cristales fue diferente para cada condición. Lo anterior pasa porque para que comience el proceso de nucleación, la concentración de proteína tiene que aumentar hasta alcanzar la sobresaturación. Para los cristales de las condiciones 1, 2, 4 y 5, el tiempo fue de 3 a 6 semanas. Con el paso del tiempo varios de estos cristales aumentaron un poco su tamaño original. Para la condición 3 el tiempo en formarse los cristales fue de aproximadamente 5 meses.

Tabla 6. Condiciones de cristalización.

Número de condición	Kit	Sal	Precipitante	Buffer
1	<i>PEG Ion-Crystal Screen Cryo</i>	0.2 M de acetato de zinc	20% de PEG 3350	
2	<i>PEG Ion-Crystal Screen Cryo</i>	0.16 M de acetato de magnesio tetra hidratado	16% de PEG 8000	0.08 M de cacodilato de sodio, pH 6.5
3	<i>Wizard 3-4</i>		10% de PEG 6000	100 mM de HEPES, pH 7
4	<i>Wizard 3-4</i>	200 mM cloruro de magnesio	30% de PEG 400	100 mM HEPES, pH 7.5
5	<i>Wizard 1-2</i>	200 mM acetato de zinc	10% de PEG 3000	100 mM acetato de sodio, pH 4.5

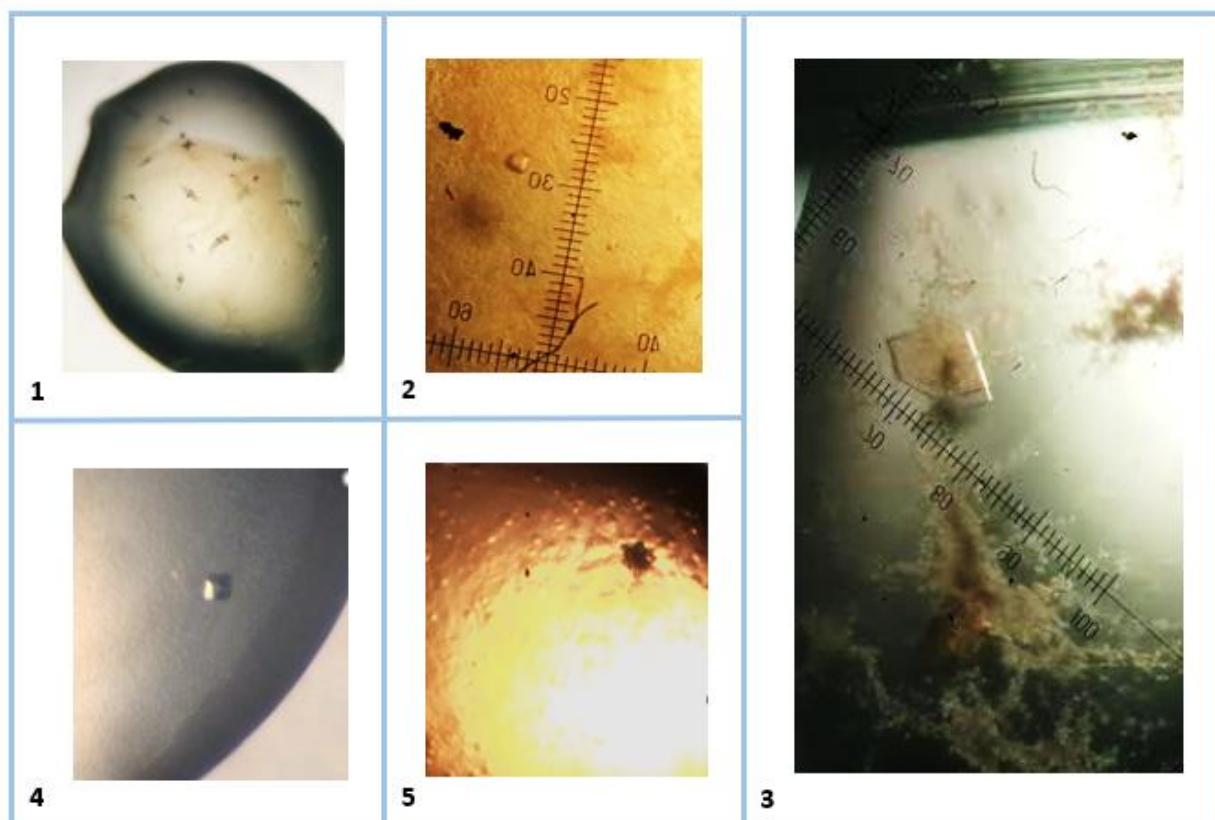


Figura 17. Cristales correspondientes a las condiciones de cristalización de *MtKatG* L333V. En la parte inferior izquierda de cada panel se muestra el número de la condición del cristal.

Con las condiciones de cristalización encontradas se realizaron matrices de optimización con el método de difusión de vapor de la gota colgante para las que contenían cristales mejor definidos. Lo anterior se hizo con la finalidad de obtener cristales en mayor cantidad y con mejor calidad para enviarlos a difractar. En las matrices se variaron las concentraciones de la sal y del agente precipitante (**Tablas 7, 8 y 9**). Las soluciones se prepararon a partir de reactivos comerciales y no directamente de los kits de cristalización. Las matrices de optimización se realizaron también a 18° C. Después de revisar continuamente las optimizaciones con el microscopio estereoscópico, no se encontró ningún cristal de proteína adecuado para difractar (**Figura 18**). Una posible causa a la que se le puede atribuir el problema es quizás, por la pureza de los reactivos que se emplearon para preparar las soluciones de optimización, o bien, que desde un principio no eran cristales de proteína.

Tabla 7. Matriz de optimización de las condiciones 1 y 5

*Las filas A y B corresponden a la condición número 1. Las filas C y D corresponden a la condición número 5, donde el acetato de sodio 100 mM, pH 4.5 se mantuvo constante.

PEG 3350	16 %	18 %	20 %	22 %	24 %	26 %
C4H6O4Zn						
A 0.18 M						
B 0.20 M						
PEG 3000	6 %	8 %	10 %	12 %	14 %	16 %
C4H6O4Zn						
C 0.18 M						
D 0.20 M						

Tabla 8. Matriz de optimización de la condición 2

PEG 8000	12 %	14 %	16 %	18 %	20 %	22 %
Mg (C ₂ H ₃ O ₂) ₂						
A 140 mM						
B 160 mM						
C 180 mM						
D 200 mM						

*En esta matriz, el buffer (cacodilato de sodio 0.08 M, pH 6.5) se mantuvo constante en todos los pozos.

Tabla 9. Matriz de optimización de la condición 4

PEG 400 \ MgCl2	24 %	26 %	28 %	30 %	32 %	34 %
A 160 mM						
B 180 mM						
C 200 mM						
D 220 mM						

*El buffer HEPES 100 mM, pH 7.5 se mantuvo constante en todos los pozos.

*Las condiciones están numeradas en la **Tabla 6**.

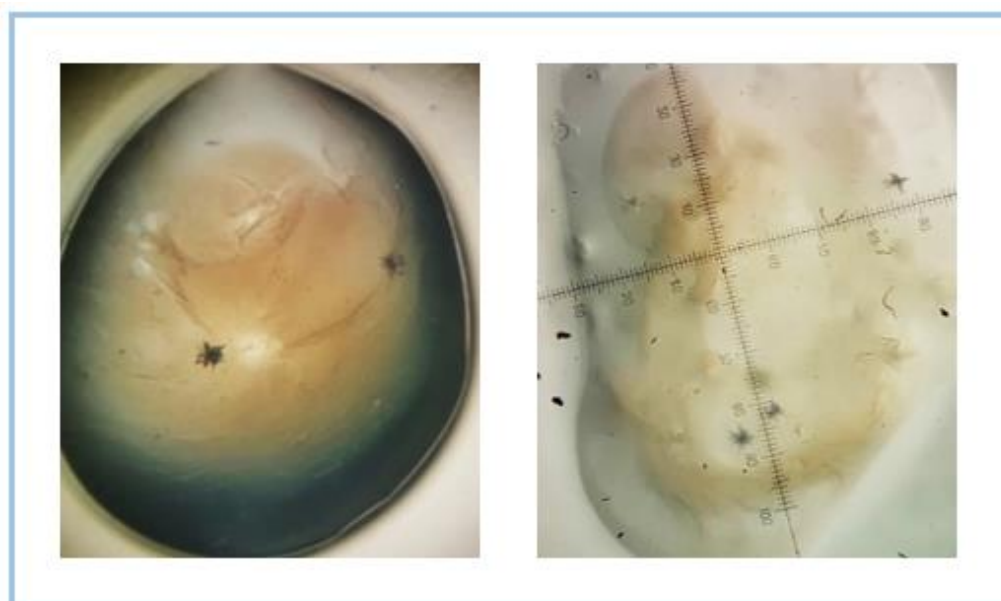


Figura 18. Cristales de optimización de la condición 5. Condición del kit *Wizard 1-2*; 200 mM de acetato de zinc, 10% de PEG 3000 y 100 mM de acetato de sodio, pH 4.5.

Hasta este momento no se había realizado la optimización de los cristales en la condición número 3 (**Figura 17**) ya que tardó aproximadamente 5 meses en que

observáramos los cristales. Estos cristales se observaban en su mayoría como placas múltiples con un tamaño de aproximadamente 0.1 x 0.1 x 0.05 mm.

Como de las matrices de optimización no se obtuvieron buenos resultados, entonces se sobreenfriaron utilizando una solución crioprotectora y se enviaron a difractar los cristales de las condiciones 3 y 4.

7.4. Colecta de datos de difracción de rayos X de la *MtKatG* L333V

El cristal de la condición 4 resultó ser de sal. El cristal de *MtKatG* L333V de la condición 3 difractó a 2.1 Å y se colectaron datos de difracción de rayos X. La solución crioprotectora para la condición 3 fue 10% de PEG 6000 y 100 mM de HEPES, pH 7.0 que es la condición original adicionando PEG 400 30%. Se colectaron 720 imágenes o *frames* con una oscilación de 0.5° en la línea ID19 del sincrotrón *Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory* (Argonne, IL, U.S.A.) con un detector Pilatus 6M a una longitud de onda de 0.979 Å. En la **Figura 19** se muestra uno de los patrones de difracción de la *MtKatG* L333V. La estructura cristalográfica de *MtKatG* L333V será

determinada y afinada por la Dra. Adelaida Díaz Vilchis, para después realizar su análisis y ver los cambios que esta mutante presenta.

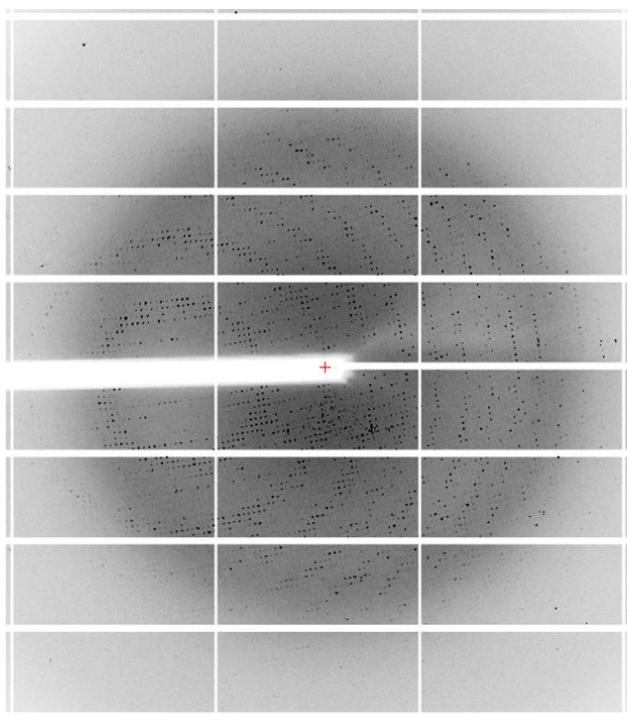


Figura 19. Patrón de difracción de la enzima *MtKatG* L333V. Los puntos corresponden a las reflexiones registradas. En la imagen se observa el primer patrón de difracción de los 720 colectados.

7.4.1. Optimización de *MtKatG* L333V condición 3

Después de coleccionar los datos de difracción de rayos X del cristal obtenido en la condición *Wizard* 3-4 (10% de PEG 6000 y 100 mM de HEPES, pH 7.0), se realizó una matriz de optimización con la finalidad de obtener más cristales para remojarlos con INH. Lo anterior tiene el propósito de obtener la estructura cristalográfica del complejo de la *MtKatG* L333V-INH y analizar la interacción de la enzima con la INH.

Para realizar la matriz fue necesario volver a expresar y purificar la enzima *MtKatG* L333V. Se siguió el mismo protocolo, pero ahora, utilizamos un equipo de Bio Rad modelo BioLogic donde conectamos la columna de afinidad a níquel. Los buffers de unión, lavado y elución se utilizaron en las mismas concentraciones. La columna utilizada fue Ni-NTA de 5 mL. La enzima eluída se coleccionó en 13 fracciones con 2 mL cada una. Paralelamente al realizar la elución se fue obteniendo el cromatograma donde se mostraba la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones. La enzima, de acuerdo con el cromatograma, se recuperó a partir de la fracción 7, teniendo como punto máximo 0.4 unidades de absorbancia (**Figura 20**). Posteriormente se realizó un SDS-PAGE al 10% con las fracciones de la 7 a la 13. Al teñir el gel se observó que la enzima se encontraba en su mayoría en las fracciones 9, 10 y 11. La *MtKatG* L333V presenta una masa molecular de aproximadamente 80 kDa por subunidad. Así mismo, se puede observar que la enzima tiene un buen grado de pureza (**Figura 21**).

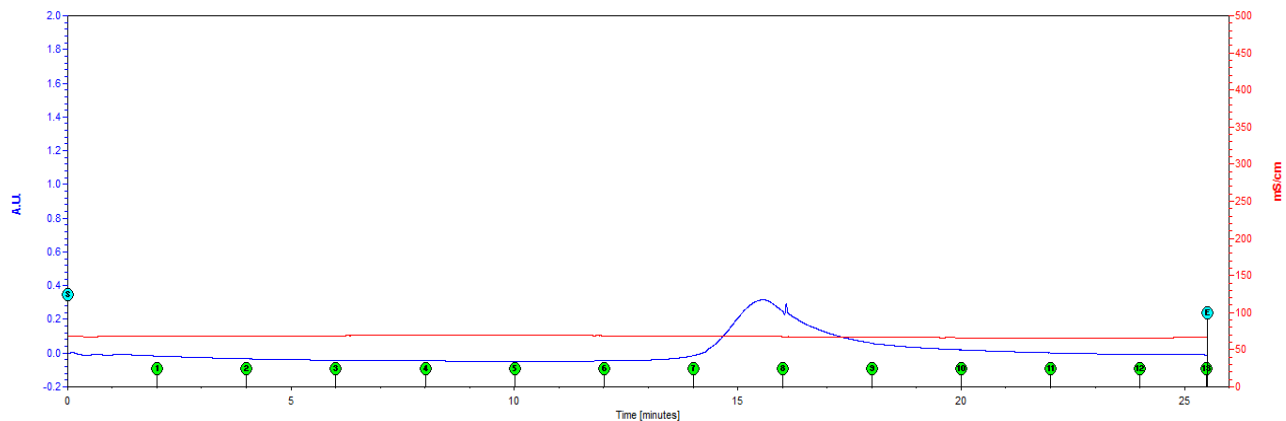


Figura 20. Cromatograma de la purificación de la enzima *MtKatG* L333V. En verde se indica el número de las fracciones, la línea azul indica la absorbancia de la enzima a 280 nm y la línea roja indica la conductancia.

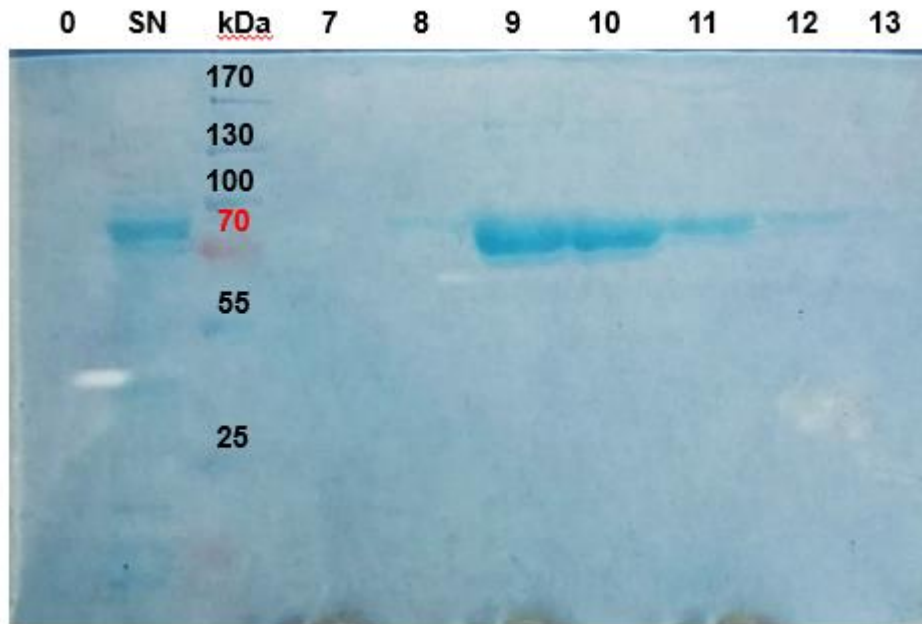


Figura 21. Purificación para la optimización de *MtKatG* L333V. SDS – PAGE 10%. De izquierda a derecha, 0) muestra recuperada que pasó por la columna de níquel, SN) sobrenadante de la sonicación de las células, 7 – 13) fracciones eluidas.

La enzima se eluyó con 300 mM de imidazol, así que dializamos una sola vez, durante toda la noche en buffer de fosfatos 20 mM, pH 7.5, con 3 mg de cloruro de hemina y en esta ocasión, ya sin imidazol. La muestra dializada fue la mezcla de las fracciones de la 7 a la 13, con una membrana de diálisis de corte de 10 kDa.

Posteriormente, se realizó la cuantificación de la enzima por método de Bradford y se concentró a un volumen de 150 μ L para tener una concentración final de 15 mg/mL.

Con esta muestra de enzima se procedió a realizar la matriz de optimización (condición 3). Esta vez utilizamos el método de difusión de vapor por gota sentada en una placa de 96 pozos y utilizando el robot de cristalización. En la placa se varió la concentración del PEG 6000 y el pH del buffer (**Tabla 10**). Para cada pozo se mezclaron 0.3 μ L de la enzima y 0.3 μ L de la solución de cristalización.

Tabla 10. Optimización de la condición 3

A												
PEG 6000	5 %	6 %	7 %	8 %	9 %	10 %	11 %	12 %	13 %	14 %	15 %	16 %
HEPES pH 7.0												
HEPES pH 7.0												
HEPES pH 7.0												
Cacodilato de sodio pH 6.6												
Cacodilato de sodio pH 6.8												
HEPES pH 7.2												
HEPES pH 7.4												

*En la fila A se repitió la condición original (10 % de PEG 6000 y 100 mM de HEPES, pH 7.0).

Hasta el momento hemos revisado las placas de optimización, pero aún no hemos encontrado cristales.

8. CONCLUSIONES

- La expresión y purificación de la catalasa – peroxidasa *MtKatG* L333V, una nueva mutante de *Mycobacterium tuberculosis* que presenta resistencia a INH permitió obtener buenas cantidades (24 mg/L de cultivo) y una pureza adecuada (>90%) de la enzima para probar cientos (816) de condiciones de cristalización diferentes.
- Los cristales de la *MtKatG* L333V permitieron colectar datos de difracción de rayos X a 2.1 Å de resolución lo cual indica que fueron cristales ordenados de la enzima.
- Las matrices de optimización realizadas algunas no permitieron obtener cristales adecuados para difractar, ya que resultaron ser cristales múltiples, pero otras matrices continúan en proceso.

9. PERSPECTIVAS

- Terminar de afinar la estructura tridimensional de la enzima *MtKatG* L333V.
- Obtener cristales de la matriz de optimización para remojarlos con INH con el fin de formar el complejo y enviarlos a difractar para posteriormente conocer de qué manera está interactuando la INH con la enzima y cómo es que ocurre la activación del fármaco.
- Probar la misma condición de cristalización (*Wizard* 3-4: 10% de PEG 6000 y 100 mM de HEPES, pH 7.0) con la *MtKatG* WT y con la mutante *MtKatG* S315T, esperando obtener cristales para remojarlos con INH y difractarlos para determinar sus estructuras tridimensionales.

10. REFERENCIAS

- Angala, S. K., Belardinelli, J. M., Huc-Claustre, E., Wheat, W. H., & Jackson, M. (2014). The cell envelope glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(5), 361–399. doi:10.3109/10409238.2014.925420
- Baker, R. D., Cook, C. O., & Goodwin, D. C. (2004). Properties of catalase-peroxidase lacking its C-terminal domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(3), 833–839. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.026>
- Branden, C. (1999). *Introduction to Protein Structure*. 19 Union Square West, New York: Garland Publishing, Inc.
- Bertrand, T., Eady, N. A. J., Jones, J. N., Jesmin, Nagy, J. M., Jamart-Grégoire, B., ... Brown, K. A. (2004). Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38991–38999. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402382200>
- Biology, S., Kamachi, S., Wada, K., Tamoi, M., & Tada, T. (2014). *The 2.2 Å resolution structure of the catalase- peroxidase KatG from Synechococcus elongatus*. (January), 288–293. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14002052>
- Cade, C. E., Dlouhy, A. C., Medzihradzsky, K. F., Salas-Castillo, S. P., & Ghiladi, R. A. (2010). Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG: Catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. *Protein Science*, 19(3), 458–474. <https://doi.org/10.1002/pro.324>
- Carpena, X., Loprasert, S., Mongkolsuk, S., Switala, J., Loewen P., Fita, I., (2003). Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 327(2), 475-489. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00122-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00122-0)
- Carpena, X., Melik-Adamyanyan, W., Loewen, P. C., & Fita, I. (2004). Structure of the C-terminal domain of the catalase-peroxidase KatG from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(10), 1824–1832. <https://doi.org/10.1107/S0907444904020621>

- de Boer, H. A., Comstock, L. J., & Vasser, M. (1983). The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(1), 21–25. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.1.21>
- Chollet, A., Mourey, L., Lherbet, C., Delbot, A., Julien, S., Baltas, M., ... Bernardes-Génisson, V. (2015). Crystal structure of the enoyl-ACP reductase of *Mycobacterium tuberculosis* (InhA) in the apo-form and in complex with the active metabolite of isoniazid pre-formed by a biomimetic approach. *Journal of Structural Biology*, 190(3), 328–337. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.04.008>
- Díaz, A., Loewen, P. C., Fita, I., & Carpena, X. (2012). Thirty years of heme catalases structural biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.011>
- Drenth, J. (2007). *Principles of Protein X-Ray Crystallography*. 233 Spring Street, New York.: Springer Science+Business Media, LLC
- Flores, H., Lin, S., Contreras-Ferrat, G., Cronan, J. E., & Morett, E. (2012). Evolution of a new function in an esterase: Simple amino acid substitutions enable the activity present in the larger paralog, BioH. *Protein Engineering, Design and Selection*, 25(8), 387–395. <https://doi.org/10.1093/protein/gzs035>
- García, E. L. (2015). *Cristalización de la catalasa-peroxidasa de Neurospora crassa*. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara. Pp 73
- Jena, L., Waghmare, P., Kashikar, S., Kumar, S., & Harinath, B. C. (2014). Computational approach to understanding the mechanism of action of isoniazid, an anti-TB drug. *International Journal of Mycobacteriology*, 3(4), 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.08.003>
- McPherson. (2004). UC Irvine UC Irvine Previously Published Works Title Introduction to protein crystallization Publication Date License Introduction to protein crystallization. 34, 254–265. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.019>

- McPherson A. (2017) Protein Crystallization. In: Wlodawer A., Dauter Z., Jaskolski M. (eds) Protein Crystallography. Methods in Molecular Biology, vol 1607. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1_2
- Philips, J. A., & Ernst, J. D. (2012). Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), 353–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132458>
- Pierattelli, R., Banci, L., Eady, N. A. J., Bodiguel, J., Jones, J. N., Moody, P. C. E., ... Brown, K. A. (2004). Enzyme-catalyzed mechanism of isoniazid activation in class I and class III peroxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 39000–39009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402384200>
- Rudiño-Piñera, E. (2010). *Cristalografía*. 1° ed. [ebook] Cuernavaca, Morelos. Visto en <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cristalografia.pdf> (Acceso el 10 de Abril. 2015)
- Smulevich, G., Jakopitsch, C., Droghetti, E., & Obinger, C. (2006). Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(4), 568–585. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.033>
- Srivastava, G., Tripathi, S., Kumar, A., & Sharma, A. (2017). Molecular investigation of active binding site of isoniazid (INH) and insight into resistance mechanism of S315T-MtKatG in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 105, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.04.002>
- Uribe, B. (2017). Caracterización funcional de mutaciones nuevas en KatG de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a isoniazida encontrada en aislados clínicos de pacientes mexicanos. Pp 73. Programa de Postgrado en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Vega-García, V., Díaz-Vilchis, A., Saucedo-Vázquez, J. P., Solano-Peralta, A., Rudiño-Piñera, E., & Hansberg, W. (2018). Structure, kinetics, molecular and redox properties of a cytosolic and developmentally regulated fungal catalase-peroxidase. *Archives of*

Biochemistry and Biophysics, 640(January), 17–26.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.12.021>

Vidossich, P., Alfonso-Prieto, M., & Rovira, C. (2012). Catalases versus peroxidases: DFT investigation of H₂O₂ oxidation in models systems and implications for heme protein engineering. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, 292–297.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.07.002>

World Health Organisation. (2018). *Global Health TB Report*.

Yamada, Y., Fujiwara, T., Sato, T., Igarashi, N., & Tanaka, N. (2002). The 2.0 Å crystal structure of catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Nature Structural Biology*, 9(9), 691–695. <https://doi.org/10.1038/nsb834>

Zámocký, M., García-Fernández, Q., Gasselhuber, B., Jakopitsch, C., Furtmüller, P. G., Loewen, P. C., ... Carpena, X. (2012). High Conformational Stability of Secreted Eukaryotic Catalase-peroxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), 32254–32262.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m112.384271>

Zhang, H., Li, D., Zhao, L., Fleming, J., Lin, N., Wang, T., ... Bi, L. (2013). Genome sequencing of 161 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China identifies genes and intergenic regions associated with drug resistance. *Nature Genetics*, 45(10), 1255–1260.
<https://doi.org/10.1038/ng.2735>

Zhao, X., Yu, H., Yu, S., Wang, F., Sacchertini, JC., Magliozzo, RS., (2006). Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant. *Biochemistry*, 45(13), 4131-4140.
<https://doi.org/10.1021/bi051967o>

Zhao, X., Hersleth, H. P., Zhu, J., Andersson, K. K., & Magliozzo, R. S. (2013). Access channel residues Ser315 and Asp137 in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) control peroxidatic activation of the pro-drug isoniazid. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 49(99), 11650–11652. doi:10.1039/c3cc47022a



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Presidente del Consejo Directivo del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **AVILA LINARES AYLIN** con número de matrícula **20154000489** cuyo título es:

“CRISTALIZACIÓN DE LA CATALASA – PEROXIDASA (KatG) DE Mycobacterium tuberculosis”.

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **Licenciado Ciencias Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular.**

Cuernavaca, Mor a 01 de octubre del 2020

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN
DR. CARLOS AMERO TELLO
DRA. ADELAIDA DÍAZ VILCHIS
DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
DRA. MARIA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2020-10-12 18:17:24 | Firmante

oYBGQBb3Vfitt7ap/dAiMa96f89VaTiUwwK7trZOrw6GBa86wI0tyToWH32bzrJHF8Ni/eeLtVxuE1wkngDxUeqpo4xb8pKloEvcO0nBkodDG6b0fdWzbHxOyNiOAK6PZLawXIGBo
mQIA7iqnC65oGnsI0szkNdUM3BJIRnXhyx8I3IUGEcGB7+aLihBrV8DNjV5gPmEjWFI829dNibUAYH4DsKoo5OXB78Qsmysz83oNFb7u4x5thvhc0j20T8MC6r722SOr8bLGN/tQNW
Q/lrwPZ20zDga6bNjlaGevpxZohVw0P96vUdYDo86/1BFOAiM8h/V11QrrTTQQO3rw==

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2020-10-12 19:40:29 | Firmante

xRuLfx39GxPliDkAHkjkzktAvlgYBLxGof5IRP38P3cYbZUVD545b85tQVYYPX5tJ2x8As64v2fpv7Zsao548icGdRbCqCBAPgh8uwpRWD3hUkTojPiYCUIEgNwmASlmcX+gGfCHLP
G9c3b4PtakRHvNOvLpaFrTaOtaMdGNLkXVOTqs4KmEHJ9+5O0UeDBgnUxnlnGHWXEPHKqGQf6I6W0chDZzRVkpi2kHD1Uc+9G2f5ujscP0tAdwscE93G/gg2zA0KNN9PHv+
/rEthDghxQ0vZmvXdbXjyv0bJjHPT5VCapZumChsFbniTsY3bOu/zZ8A002gtAPD5E80GMg==

CARLOS DANIEL AMERO TELLO | Fecha:2020-10-13 10:42:07 | Firmante

QP1t3xOMMIgN7LftUIBRKFh5cATexqfAMaU+1QkpMDM/k1JavPEViOTICmDwVjwnBVx3gYNAnIVDvMgdABLKMDNJ8Sg4eRhDIKTPRy4QasvPfg/fgs7KdrKQvgVlx/1r3UZjtmry
WBY6PcskchDnvWhy7n3NTuiE0+mA+mjYN/PJDo6OxUOjw8fY+qeWbCqswSg/z6bhh67/hlBxPd/qjbgUDCYQZGTpStYotSol1d5gz7cUPrjmBOMxGYBtUnlmcd0MUSg5F7UyBK
Cy/6P5wOs2m1ZbXKTVcT346+ufwFS2V1hldlqBxl0/ZgxPkYbKdLdfJ+Gm8w01ImU7W7NWqQ==

MARIA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ | Fecha:2020-10-13 12:44:17 | Firmante

UaJb/aka6t26InkbWnPPUHqAMtspqQGhv4rPMIBWVv6fo7++AgqqIiNiwzgrqyQLrBQXm4NMgrihdXOPUuEPoejVvwcBFd4/mC9ZgpXjtEyEXY2gFN4o0qiNVdea1j2EaC2o4+gTF
2Oie6+XY86FLzO11CS00EPw0U3oj0JfA8QaZ6wfQldM+5ndicPpN9eoSorM0ryN4Ina6iONfMeowMEyCXajS5W5kfBYjd7bs4utlJ8hfu+Zp53QBt/TZrGiDdj9EXrn9FbzP/Ni2Z+Pf89bZ
8uahV1hfzQoxLmtscXNHdQWptx/r1dG7ScmnePxSODB7IM77ZbkvjLmZSSMHbQ==

ADELAIDA DÍAZ VILCHIS | Fecha:2020-10-14 13:26:24 | Firmante

cnY54rZUsE7dV+L0DOFuyYg3Xn0jxVemHJiyXEK4szBmU5tli+F5fqISX8c2pWIOa1VZI3OCH3wigC11PuqEJCavfYWZv5alxsu60BkJjrCynF+4nm7A8sVLZ3VzPpHrw/x6uZBaPg
EF1YccFMhz05AXJJKcihLClcQSw2RpeRvfx0qw9OU6Yk0V00vsTfsW89XO0lpUi5iiD85PbuAPpS53cqhLZGg545W9gBtaun1oFH2VcdrXtRUaxNHGBh1+eoWOBbzI/TBjeSXhN
qWLtptm9CZ8jAJ8qYON1A6Re9XnRA1zvKDX9vbkI9Xm+I5TZ7PlzGx4zWaiwzRw+zQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



XEg8br

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/1rWDzeDSw8KYsR7Yni6ZYXsd2d1AikRa>

