

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA
“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



Ocurrencia de mutaciones en el gen *pncA* y mutaciones en otros genes (*rpsA*, *panD* y *clpC1*) asociados a la resistencia a la pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis* a través del análisis de 3016 genomas de aislados clínicos de Lima y Callao

AUTORES: CAMILA JULIA CARLOS BARRON
ANALUCIA DIAZ LOSTAO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO
EN BIOLOGÍA

ASESORA: PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA

LIMA - PERÚ
2022

Ocurrencia de mutaciones en el gen *pmcA* y mutaciones en otros genes (*rpsA*, *panD* y *clpC1*) asociados a la resistencia a la pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis* a través del análisis de 3016 genomas de aislados clínicos de Lima y Callao

AUTORES: CAMILA CARLOS BARRON Y ANALUCIA DIAZ
LÓSTAO

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

ASLORA: PATRICIA SILEN CORTAVARRIA

LIMA, PERÚ
2022

Resumen de coincidencias

4 %

1	hdl.handle.net	1 %
	Fuente de Internet	
2	doku.pub	<1 %
	Fuente de Internet	
3	lpi.oregonstate.edu	<1 %
	Fuente de Internet	
4	aahs.org	<1 %
	Fuente de Internet	
5	teloinformo.com	<1 %
	Fuente de Internet	
6	Entregado a Universida...	<1 %
	Trabajo del estudiante	
7	esenciasflorales.net	<1 %

Índice

I.	Introducción	5
II.	Hipótesis	8
III.	Objetivos	9
IV.	Materiales y métodos	9
V.	Resultados	11
VI.	Discusión	17
VII.	Conclusión	24
VIII.	Bibliografía	26

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que afecta principalmente a los pulmones. La pirazinamida (PZA) es uno de los antibióticos más usados para combatirla ya que elimina a los bacilos latentes, sin embargo, el número de cepas resistentes a la PZA está aumentando. Su principal mecanismo de resistencia está relacionado a una amplia variedad de mutaciones en el gen *pncA*, el cual codifica a la enzima pirazinamidasa (PZAse), necesaria para la activación de la droga.

Adicionalmente, se han encontrado mutaciones en otros genes asociados al mecanismo de acción de la PZA, como *rpsA*, *panD* o *clpC1*, pero la presencia exclusiva de mutaciones en dichos genes en cepas resistentes a la PZA es casi nula. Por lo que la presencia de estas mutaciones junto con mutaciones en el gen *pncA* en cepas resistentes, podría explicar el nivel de resistencia a la PZA en combinación con la reducción de la actividad de la PZAse.

De esa manera, el presente estudio tiene como objetivo determinar la asociación entre las mutaciones en el gen *pncA* y las mutaciones en otros genes asociados a la resistencia a la PZA en *M. tuberculosis*. Para ello se analizaron 3016 genomas de aislados clínicos de Perú y se verificó la significancia estadística de estas comparaciones mediante el test de proporciones y chi cuadrado. Demostramos que existe una asociación entre las cepas resistentes y las mutaciones en los genes *rpsA* y *clpC1*, lo cuál podría explicar la resistencia a la PZA en *M. tuberculosis* a través de un efecto aditivo.

Palabras clave: pirazinamida, mutaciones, *Mycobacterium tuberculosis*, resistencia, genomas

Abstract

Tuberculosis is a disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*, which mainly affects the lungs. Pyrazinamide (PZA) is one of the most widely used antibiotics to combat it since it eliminates latent bacilli, however, the number of PZA-resistant strains is increasing. Its main resistance mechanism is related to a wide variety of mutations in the *pncA* gene, which encodes the enzyme pyrazinamidase (PZAse), necessary for drug activation.

In addition, mutations have been found in other genes associated with the mechanism of action of PZA, such as *rpsA*, *panD* or *clpCI*, but the exclusive presence of mutations in these genes in resistant strains to PZA is almost nonexistent. Therefore, the presence of these mutations together with mutations in the *pncA* gene in resistant strains could explain the level of resistance to PZA in combination with the reduction of PZAse activity.

Thus, the present study aims to determine the association between mutations in the *pncA* gene and mutations in other genes that explain resistance to PZA in *M. tuberculosis*. For this, 3016 genomes of clinical isolates from Peru were analyzed and the statistical significance of these comparisons was verified using the test of proportions and chi square. We show that there is an association between resistant strains and mutations in the *rpsA* and *clpCI* genes, which could explain PZA resistance in *M. tuberculosis* through an additive effect.

Key words: pyrazinamide, mutations, *Mycobacterium tuberculosis*, resistance, genomes

I. Introducción

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que afecta principalmente los pulmones [1]. El tratamiento que se utiliza actualmente es un régimen de 6 meses y una combinación de antibióticos: isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida (PZA) [2]. La PZA es una prodroga de gran valor debido a que tiene la capacidad de matar a los bacilos latentes de los entornos inflamatorios ácidos, permitiendo acortar el tiempo de tratamiento de 9 a 6 meses, y reduciendo las tasas de recaída de la enfermedad [1,2]. Al ser una prodroga, debe ser convertida a ácido pirazinoico (POA) para ejercer su actividad bactericida. La enzima pirazinamidasa (PZAsa), codificada por el gen *pncA*, es la que realiza esta acción mediante un ataque nucleofílico [1,2]. Sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo de acción completo de la PZA.

La PZA actúa de manera diferente a otros antibióticos comunes ya que probablemente puede inhibir múltiples vías moleculares como la producción de energía, la transcripción y la síntesis de coenzima A, necesarios para la supervivencia del bacilo. Por lo que se han propuesto varios modelos para explicar su mecanismo de acción. El modelo más aceptado propone que esta droga ingresa al bacilo por difusión pasiva hasta el citoplasma, donde es convertida en POA por acción de la PZAsa. Luego, POA sale de la célula y en un medio extracelular ácido, se protona formando HPOA y entra nuevamente. En el citoplasma, el HPOA se disocia en H^+ y POA^- , y este ciclo continúa, lo que resulta en la acumulación intracelular de protones, colapso del potencial de la membrana celular y acidificación del citoplasma [1].

Apoyando a este modelo, se ha demostrado que el POA interfiere con la función de transporte de la membrana inhibiendo simultáneamente el transporte de metionina y uracilo necesaria para la síntesis de proteínas y ARN [3]. También, se ha observado que la inhibición de las enzimas generadoras del potencial de membrana como la ATPasa, NADH deshidrogenasa y citocromo c oxidasa tienen el mismo efecto que la actividad de la PZA, lo que favorece la idea de que este antibiótico reduce el potencial de membrana y tiene un efecto inhibitorio en la producción de ATP [5].

Por otro lado, a través de espectrometría de masas, se logró identificar otro potencial blanco molecular de POA: la proteína ribosomal S1 de la subunidad 30S, RpsA [6]. RpsA es esencial en la trans-traducción, un proceso involucrado en el rescate de ribosomas que han quedado bloqueados durante la traducción. De esa manera, el segundo mecanismo de acción propone que el POA interrumpe el proceso de trans-traducción cuando se une a RpsA, siendo letal para el bacilo ya que no permite la síntesis de proteínas.

Posteriormente, se propuso que la enzima aspartato descarboxilasa (PanD) es un blanco de la POA al encontrar cepas resistentes con mutaciones en el gen que la codifica [8]. Esta enzima participa en la síntesis de β -alanina, un precursor de la biosíntesis de pantotenato y coenzima A (CoA) [9]. CoA es importante para la síntesis y oxidación de ácidos grasos y la oxidación del piruvato en el ciclo del ácido tricarboxílico para generar ATP [8]. Por lo que la unión de POA a PanD inhibe estos procesos y altera el metabolismo energético.

Finalmente, el más reciente modelo del mecanismo de acción de la PZA propone que POA se une en el sitio activo de PanD y actúa como un inhibidor competitivo [12]. Esto causa cambios conformacionales que resultan en una mayor exposición del péptido señal carboxilo terminal, necesario para promover la degradación de PanD mediada por el complejo de proteasa caseinolítica ClpC1-ClpP, aumentando la tasa de degradación de PanD e interrumpiendo indirectamente la síntesis de CoA [13, 14].

A pesar de que existen varios modelos que tratan de explicar el mecanismo de acción de la PZA, como se describió anteriormente, el número de cepas de tuberculosis multidrogo resistente (TB-MDR) está aumentando a nivel mundial; y más del 30% de las cepas peruanas también son resistentes a la PZA [16]. Se sabe que el principal mecanismo de resistencia se correlaciona con la pérdida de la actividad de la PZAsa, ya que el mal funcionamiento de esta enzima evita que la droga pueda ser hidrolizada al POA y anula su efecto bactericida. Esto es causado por mutaciones en su gen codificante (*pncA*), siendo este el gen más asociado a la resistencia (72-98%) [16].

La PZAsa está involucrada en la ruta de rescate para la síntesis del cofactor esencial NAD. Debido a que esta vía no es esencial para la virulencia de *M. tuberculosis*, no existe una

presión selectiva y las mutaciones encontradas en este gen son diversas, incluyendo sustituciones, inserciones y deleciones distribuidas a lo largo de todo el gen y en sus regiones promotoras, que pueden ser encontradas tanto en cepas sensibles como resistentes a la PZA [15,17]. Se ha demostrado que estas mutaciones pueden inhibir la actividad de la PZAsa; sin embargo, hasta un 30% de los aislados resistentes a la PZA retienen la actividad de la PZAsa y poseen un gen *pncA* nativo [1,4], lo que indica la existencia de mecanismos adicionales de resistencia [1, 4, 17].

Debido a que las mutaciones en el gen *pncA* no explican totalmente la resistencia a la PZA, mutaciones en los genes que codifican a los posibles blancos del POA también han sido asociados a la resistencia a este antibiótico. Entre ellos se encuentran, las mutaciones en *rpsA*. En el estudio realizado por Zhang et al. se encontró una cepa clínica resistente a la PZA, denominada DHM444, sin mutaciones en *pncA* y con una deleción en el aminoácido Ala438 en RpsA [6]. Otros autores estudiaron esta mutación y la mutación D123A [6] y encontraron que al ser introducidas en el cromosoma de *M. tuberculosis* nativo eran responsables de otorgar resistencia a la PZA [18]. Asimismo, en el estudio de Sheen et al. encontraron que las mutaciones en *rpsA* estaban presentes sólo en cepas resistentes que ya tenían mutaciones en *pncA* conocidas por conferir resistencia a la PZA [17].

Por otro lado, las mutaciones en *panD* también han sido relacionadas a la resistencia a esta droga. La mayoría de estudios han caracterizado y estudiado mutaciones en este gen a partir de experimentos *in vitro* [8,25,26] pero pocas mutaciones se han encontrado en cepas clínicas [28, 25, 15]. Entre las mutaciones encontradas *in vivo*, Zhang et al. identificaron un aislado clínico resistente a la PZA con la mutación T400C en el gen *panD*. Esta mutación fue encontrada también por Liu et al. en 4 de 291 aislados clínicos donde uno de estos aislados también contenía una mutación en *pncA* [15,25].

Finalmente, también las mutaciones en el gen *clpC1* han sido asociadas a la resistencia a la PZA [23]. En un estudio *in vitro* realizado por Gopal et al., encontraron que 8 de 9 cepas contenían mutaciones no sinónimas en *clpC1*, las cuales eran resistentes a POA y a PZA [22]. Además, Modlin et al. reportó la presencia de mutaciones en *panD* en 11 de

19 aislados clínicos, que además contenían la mutación V63A en la región amino terminal de *clpCI*, con un nivel bajo de resistencia a la PZA [24].

A pesar de que existen varios genes asociados a la resistencia a la PZA en *M. tuberculosis*, el principal mecanismo de resistencia sigue estando más asociado a la amplia variedad de mutaciones en el gen *pncA*, las cuales generan diversos efectos en la actividad de la enzima PZAsa. Sin embargo, no todas estas mutaciones son suficientes para explicar la resistencia a la PZA, debido a que no causan necesariamente un fallo crítico en la enzima. Sheen et al. reportaron que la presencia exclusiva de mutaciones en genes asociados a la resistencia en cepas resistentes a la PZA es casi nula [17]. Por lo que la acumulación de mutaciones es una posibilidad en cepas con mutaciones en *pncA* que mantienen su actividad de PZAsa.

Esto sugiere que los mecanismos adicionales en cepas resistentes a la PZA con mutaciones en *pncA* podrían eventualmente explicar los niveles de resistencia en combinación con la reducción de la actividad de PZAsa. Por lo tanto, falta estudiar la asociación que existe entre la presencia de mutaciones en *pncA* y la presencia de mutaciones en otros genes asociados a la resistencia a la PZA. Para ello, a partir de una base de datos de genomas de aislados clínicos de *M. tuberculosis*, se comparó la proporción de cepas resistentes (con mutación en *pncA*) con mutaciones en genes asociados a la resistencia a la PZA (*rpsA*, *panD* y *clpCI*) con la proporción de cepas sensibles (sin mutación en *pncA*) con mutaciones en genes asociados a la resistencia a la PZA (*rpsA*, *panD* y *clpCI*) con el objetivo de determinar la asociación que existe entre las mutaciones en el gen *pncA* y los demás genes mencionados anteriormente.

II. Hipótesis:

La proporción de cepas con mutaciones en genes asociados a la resistencia (*rpsA*, *panD* y *clpCI*) a la PZA es MAYOR en cepas resistentes (con mutación en *pncA*) que sensibles (sin mutación en *pncA*).

III. Objetivos:

Objetivo general: Determinar la asociación entre las mutaciones en el gen *pncA* y las mutaciones en otros genes asociados a la resistencia a la pirazinamida (PZA) en *Mycobacterium tuberculosis* a través del análisis de 3016 genomas de aislados clínicos de Lima y Callao.

Objetivos específicos:

1. Determinar el número de cepas resistentes (con mutación en *pncA*) y sensibles (sin mutación en *pncA*).
2. Comparar la proporción de mutaciones totales, sinónimas y no sinónimas en *rpsA*, *panD* y *clpC1* entre cepas resistentes y sensibles.
3. Comparar las mutaciones simultáneas encontradas en dos genes (*rpsA* y *clpC1*) entre cepas resistentes y sensibles
4. Comparar el índice de variabilidad de mutaciones sinónimas y no sinónimas en *rpsA* y *clpC1* entre cepas sensibles y resistentes
5. Determinar la asociación entre las mutaciones totales, sinónimas y no sinónimas en *rpsA* y *clpC1* y la resistencia a la PZA

IV. Materiales y métodos

Secuencias de 3016 genomas de aislados clínicos de *M. tuberculosis* en Lima, Perú

En este estudio se analizaron 3016 secuencias de cepas de *M. tuberculosis* aisladas entre 1997 y 2018 de muestras de pacientes con tuberculosis del hospital María Auxiliadora en Lima, Perú. Los aislados fueron secuenciados con la tecnología de Illumina. Esta base está ordenada en 4 archivos de Excel, con 760 secuencias cada uno. Se especifica el número de la cepa, la resistencia, las mutaciones específicas en cada una y los genes en las que se encuentran.

Programas y análisis

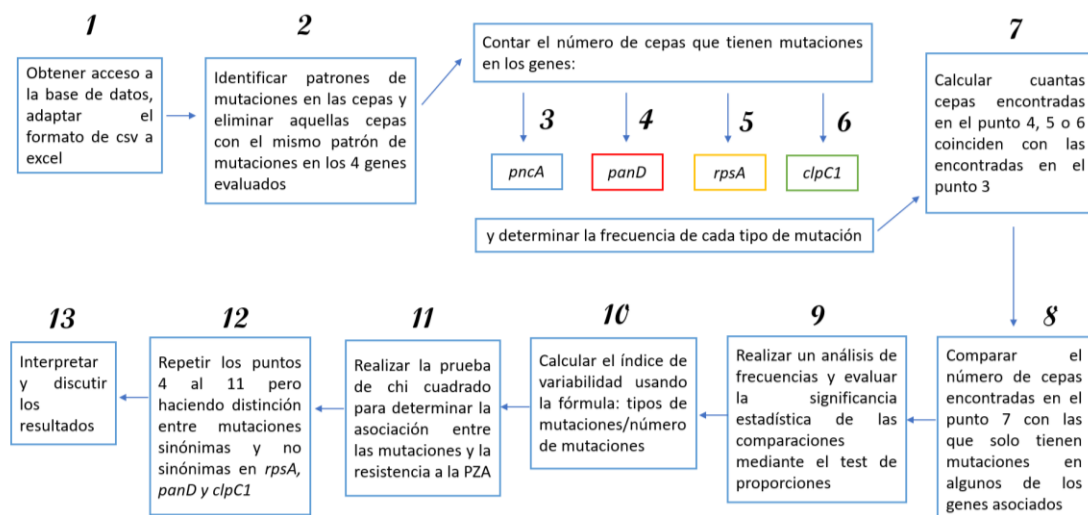
Para obtener acceso a la base de datos primero se adaptó el formato de csv a excel. Se contó el número de cepas que tienen mutaciones en los genes *pncA*, *panD*, *rpsA* y *clpC1*, haciendo distinción entre mutaciones sinónimas y no sinónimas, y se determinó la frecuencia de cada tipo de mutación en un nuevo archivo de excel. Se identificaron los

patrones de mutaciones y se eliminaron aquellas cepas con el mismo patrón de mutaciones en los 4 genes evaluados. Se utilizó el programa estadístico STATA para evaluar la significancia estadística de las comparaciones entre las mutaciones en los diferentes genes en cepas sensibles y resistentes a través de un test de proporciones. La asociación entre las mutaciones en los diferentes genes y la resistencia a la PZA se analizó a través de la prueba de chi cuadrado.

El índice de variabilidad se calculó para las mutaciones totales, sinónimas y no sinónimas encontradas en cada gen en cepas sensibles y resistentes. El cálculo fue hecho dividiendo el número de los tipos de mutaciones entre el número de mutaciones encontradas (Tabla 2). Si el índice de variabilidad está más cerca a 1, indica una mayor variabilidad entre las mutaciones encontradas y por el contrario, si está más cerca a 0, indica una menor variabilidad.

Se determinó el número de cepas con mutaciones simultáneas, en más de un gen evaluado (*panD*, *rpsA* y *clpC1*), y se realizó un gráfico de 3 círculos para representar las cepas sensibles y de 2 círculos para las cepas resistentes. Finalmente, se realizó un gráfico de barras en excel para representar las mutaciones específicas que fueron encontradas tanto en cepas sensibles como resistentes.

Flujo de trabajo



V. Resultados:

En las bases de datos se encontró información de 3016 genomas de cepas de *M. tuberculosis*. Debido a la falta de ensayos de susceptibilidad a la PZA, se consideraron como resistentes las cepas con mutaciones en el gen *pncA* al ser el gen más asociado a la resistencia a este antibiótico (72-98%). Asimismo las mutaciones encontradas han sido reportadas en estudios previos en cepas resistentes [15,16,17,20,21,27,29,31]. En la base de datos se encontraron 69 tipos diferentes de mutaciones en el gen *pncA*, donde 65 eran mutaciones no sinónimas y solo 4 sinónimas (Tabla 7). 257 (9%) cepas presentaron mutaciones en *pncA* por lo que se consideraron resistentes a la PZA y 2759 (91%) cepas no presentaron mutaciones en *pncA* por lo que se consideraron sensibles a la PZA.

El análisis de las mutaciones encontradas en los 3 genes relacionados a la resistencia de la PZA se muestran en la Tabla 1. Los resultados muestran: 1. *panD*, 13 cepas sensibles a la PZA presentaron mutaciones y ninguna de las cepas resistentes presentó mutaciones; la diferencia entre el porcentaje de cepas con mutaciones en *panD* entre cepas resistentes y sensibles no fue significativo ($p=0.2701$); 2. *clpC1*, se encontraron 1169 mutaciones en 1074 cepas; el porcentaje de cepas resistentes ($170/257=66.2\%$) con mutaciones *clpC1* fue mayor que en cepas sensibles ($903/2759=32.8\%$) ($p=0.00$) y 3. *rpsA*, se encontraron 558 mutaciones en 496 cepas; el porcentaje de cepas resistentes con mutación en *rpsA* ($94/257=36.6\%$) fue mayor al porcentaje que en cepas sensibles ($402/2759=14.6\%$) ($p=0.00$).

Tabla 1: Proporción de cepas sensibles y resistentes a la PZA con mutaciones totales, sinónimas y sinónimas en los genes *panD*, *rpsA* y *clpC1*

Genes	Número (%) de cepas sensibles con mutación	Número (%) de cepas resistentes con mutación	p-value
Mutaciones totales	N=2759	N=257	
<i>panD</i>	13 (0.5%)	0 (0.0%)	0.2701
<i>rpsA</i>	402 (14.6%)	94 (36.6%)	<0.001
<i>clpC1</i>	903 (32.8%)	170 (66.2%)	<0.001
Mutaciones en al menos un gen (<i>panD</i> , <i>rpsA</i> y <i>clpC1</i>)	1255 (45.5%)	188 (73.2%)	<0.001

Mutaciones no-sinónimas			
<i>panD</i>	8 (0.3%)	0 (0%)	0.3874
<i>rpsA</i>	47 (1.7%)	71 (27.6%)	<0.001
<i>clpC1</i>	49 (1.8%)	4 (1.6%)	0.7978
Mutaciones sinónimas			
<i>panD</i>	5 (0.2%)	0 (0%)	0.4946
<i>rpsA</i>	355 (12.87%)	23 (8.9%)	0.0696
<i>clpC1</i>	854 (31%)	166 (64.6%)	<0.001

El p-value corresponde a la comparación de los porcentajes.

	Número (%) de mutantes en cepas sensibles con mutaciones en <i>rpsA</i> y/o <i>clpC1</i>	Número (%) de mutantes en cepas resistentes con mutaciones en <i>rpsA</i> y/o <i>clpC1</i>	p-value
	N=1249	N=188	
Mutaciones en <i>rpsA</i> y <i>clpC1</i>	56 (4.5%)	76 (40.4%)	<0.001

Al evaluar la diferencia del porcentaje de cepas con al menos una mutación en uno de los 3 genes (*rpsA*, *panD* y *clpC1*) entre cepas sensibles y resistentes a la PZA, se observó que la proporción fue mayor en cepas resistentes ($188/257=73.2\%$) que en cepas sensibles ($1255/2759=45.5\%$) ($p<0.001$) (Tabla 1, Anexo 1).

Debido a que algunas cepas presentaron mutaciones en más de 1 gen se estudió la prevalencia de mutaciones en *rpsA* y *clpC1* en cepas sensibles y resistentes a la PZA (Tabla 1, Figura 1). No se consideró mutaciones en *panD* debido a su baja prevalencia y que no se encontraron en cepas resistentes. La proporción de cepas con mutaciones en *rpsA* y *clpC1* fue mayor en cepas resistentes ($76/188=40.4\%$) que en cepas sensibles ($56/1249=4.5\%$).

Considerando las 1255 cepas sensibles con mutaciones, 339 (27.0%) solo tenían mutaciones en *rpsA*, 847 (67.5%) solo en *clpC1* y 6 (0.4%) solo en *panD*. Asimismo, se encontraron 56 (4.5%) cepas con mutaciones en *rpsA* y *clpC1* y 7 (0.6%) con mutaciones en *rpsA* y *panD*. No se encontró ninguna cepa que tenga mutaciones en *clpC1* y *panD*, ni tampoco ninguna que tenga mutaciones en los 3 genes mencionados anteriormente (Figura 1 y 2)

Figura 1: Gráfico de 2 círculos que muestra la intersección del número de cepas sensibles y resistentes que tienen mutaciones en al menos un gen que explica la resistencia a la PZA (*rpsA* y *clpC1*).

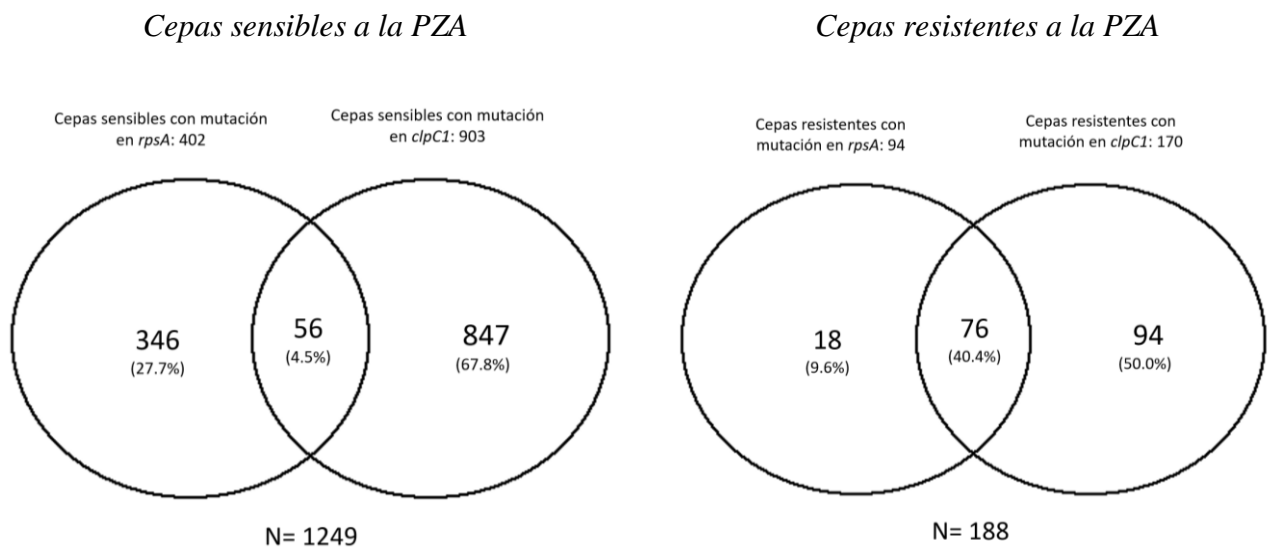
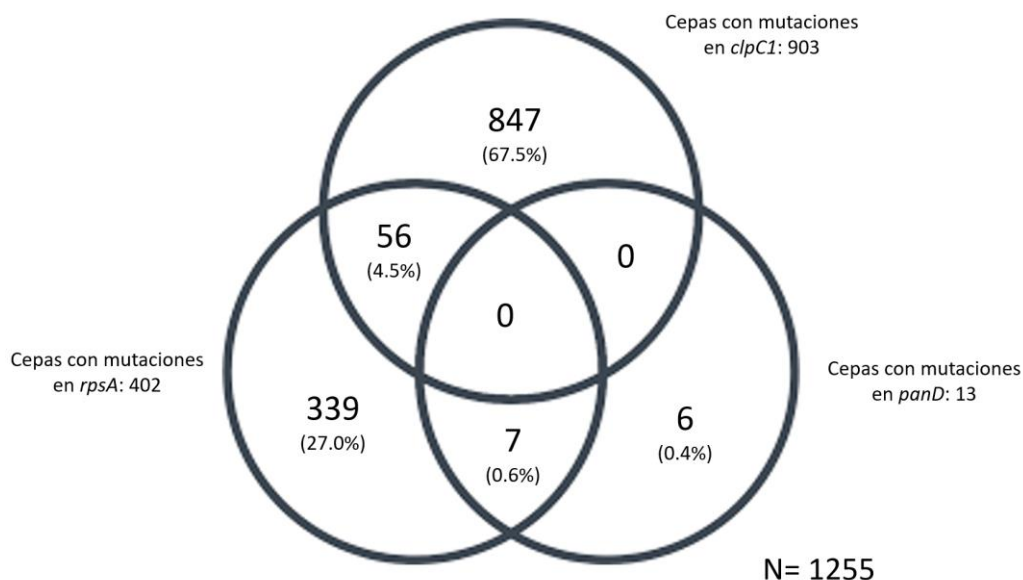


Figura 2: Gráfico de 3 círculos que muestra la intersección del número de cepas sensibles a la PZA que tienen mutaciones en al menos un gen que explica la resistencia a la PZA (*rpsA*, *panD*, y *clpC1*)



Las mutaciones encontradas en *rpsA*, *clpC1* y *panD* fueron sinónimas y no sinónimas tanto en cepas sensibles como resistentes (Tabla 1). En cepas sensibles, se encontraron 13 cepas mutantes en *panD* con 4 diferentes tipos de mutaciones. Entre estas 4 mutaciones, habían 3 no sinónimas (Ala89Thr, Val138Ala, Arg99Gly) (3/4= 75%) presente en 8 cepas (8/13=61.5%) y 1 sinónima (Asp19Asp) presente en 5 cepas. En cuanto al gen *rpsA*, se encontraron 404 mutaciones en 402 cepas, es decir 2 cepas tenían 2 mutaciones y el resto solo una. Entre las 404 mutaciones habían 27 diferentes, de las cuales 11 fueron no sinónimas (11/27=40.7%) presentes en 47 cepas (47/402=11.7%) y 16 sinónimas presentes en las cepas restantes. Ambas cepas con más de una mutación en este gen, tienen mutaciones sinónimas. Finalmente, en cuanto al gen *clpC1*, se encontraron 917 mutaciones en 903 cepas y en este caso una cepa con 3 mutaciones diferentes y 12 con 2. Entre las 917 mutaciones había 37 diferentes tipos: 25 no sinónimas (25/37=67.6%) presentes en 49 cepas (49/917=5.4%) y 12 sinónimas presentes en las cepas restantes. De las cepas con más de una mutación en este gen, 2 tenían 2 mutaciones no sinónimas y el resto todas sinónimas (Tabla 2).

En cepas resistentes, se encontraron 94 mutaciones en *rpsA*, una en cada cepa diferente. Entre estas 94 mutaciones habían 6 diferentes tipos: 4 no sinónimas (4/6=66.6%) (Ala381Val, Met432Thr, Ala440Thr, Pro375Ser) en 71 cepas (71/94=75.5%) y 2 sinónimas (Arg212Arg, Thr279Thr) en 23 cepas. La diferencia de la proporción de

mutaciones entre cepas sensibles y resistentes con mutaciones en *rpsA* fue significativa para las mutaciones totales y no sinónimas. Asimismo, se encontraron 170 mutaciones en el gen *clpCI*, una en cada cepa diferente. Entre estas 170 habían 5 diferentes tipos: 3 no sinónimas (Phe595Cys, Pro165Leu, Lys564Asn) en 4 cepas (4/170=2.4%) y 2 sinónimas (Asn806Asn, Leu768Leu) en 166 cepas (166/170=97.6%) (Tabla 2). La diferencia de la proporción de mutaciones entre cepas sensibles y resistentes con mutaciones en *clpCI* fue significativa para las mutaciones totales y sinónimas.

Algunas de las mutaciones encontradas en los genes *rpsA* y *clpCI* se repitieron en cepas resistentes y sensibles. En el caso de *rpsA*, se encontraron tanto en cepas sensibles como resistentes 5 mutaciones (Arg212Arg, Met432Thr, Thr279Thr, Ala440Thr y Ala381Val). A excepción de Arg212Arg, la cual también es la única mutación sinónima, todas las mutaciones eran más frecuentes en cepas resistentes que sensibles. La mutación Arg212Arg fue la más frecuente en cepas sensibles y Ala381Val en cepas resistentes. En cuanto al gen *clpCI*, solo se repitió la mutación Asn806Asn tanto en cepas sensibles como resistentes (93.3% vs 97.1%), siendo más frecuente en cepas resistentes, pero igual con un alto porcentaje de cepas sensibles (Figura 3).

Tabla 2: Variabilidad de las mutaciones no sinónimas y sinónimas en *rpsA*, *clpCI* y *panD*

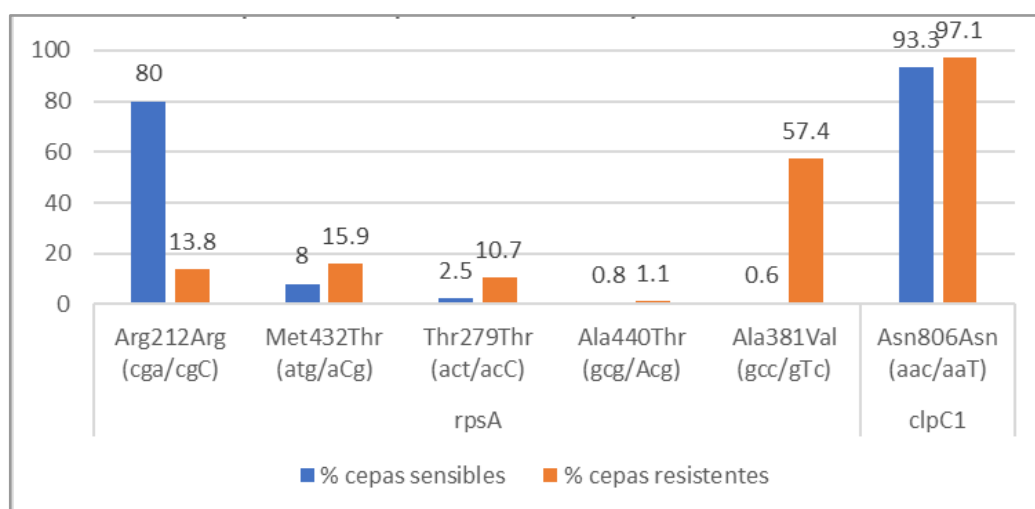
Total de mutaciones					
	<i>Cepas sensibles</i>			<i>Cepas resistentes</i>	
Gen	<i>panD</i>	<i>rpsA</i>	<i>clpCI</i>	<i>rpsA</i>	<i>clpCI</i>
No. cepas	13	402	903	94	170
No. mutaciones	13	404	917	94	170
Tipos de mutaciones	4	27	37	6	5
Índice de Variabilidad	0.3	0.07	0.04*	0.06	0.029*
Mutaciones no sinónimas					
	<i>Cepas sensibles</i>			<i>Cepas resistentes</i>	

Gen	<i>panD</i>	<i>rpsA</i>	<i>clpC1</i>	<i>rpsA</i>	<i>clpC1</i>
No. cepas	8	47	49	71	4
No. mutaciones	8	47	51	71	4
Tipos de mutaciones	3	11	25	4	3
Índice de Variabilidad	0.38	0.23**	0.49	0.05**	0.75
Mutaciones sinónimas					
	<i>Cepas sensibles</i>			<i>Cepas resistentes</i>	
Gen	<i>panD</i>	<i>rpsA</i>	<i>clpC1</i>	<i>rpsA</i>	<i>clpC1</i>
No. cepas	5	355	854	23	166
No. mutaciones	5	357	863	23	166
Tipos de mutaciones	1	16	12	2	2
Índice de Variabilidad	0.2	0.04	0.01	0.09	0.012

*p-value entre 0.05 y 0.01

**p-value menor de 0.01

Fig 3: Mutaciones en *rpsA* y *clpC1* encontradas en cepas sensibles y resistentes



VI. Discusión:

En este trabajo de investigación, se analizaron 3016 genomas completos de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes de TB en Perú y se identificaron mutaciones y genes asociados a la resistencia a la PZA. La resistencia a esta droga sigue en aumento a nivel mundial, siendo más difícil tratar la enfermedad y encontrar un régimen adecuado de antibióticos para combatirla. El principal mecanismo de resistencia a la PZA (70-98%) en *M. tuberculosis* está asociado a una amplia variedad de mutaciones en el gen *pncA* que codifica a la PZAsa, generando diversos efectos en la actividad de esta enzima [16]. Estudios anteriores han encontrado mutaciones que reducen la actividad de la PZAsa en cepas que siguen siendo resistentes a la PZA. En el estudio de Sheen et al. se observó cepas resistentes a la PZA que mantenían su actividad de PZAsa. Asimismo, la mayoría de estas cepas con mutaciones en *pncA* también tienen mutaciones en otros genes con distintas funciones [17]. *rpsA*, *clpCI* y *panD* son genes relacionados con la resistencia a la PZA. Por lo tanto, mutaciones en estos genes, presentes en cepas con mutaciones de *pncA*, podrían explicar algún nivel de resistencia a la PZA en combinación con la reducción de la actividad de la PZAsa. Por lo que es importante estudiar cómo se asocian las mutaciones en los genes asociados a la resistencia con mutaciones en el gen *pncA*.

Los resultados del presente trabajo respaldan la hipótesis que el porcentaje de cepas con mutaciones en genes asociados a la resistencia a la PZA es mayor en cepas resistentes (con mutación en *pncA*) que sensibles (sin mutación en *pncA*). La proporción de cepas con mutaciones en al menos uno de los genes estudiados *panD*, *rpsA* y *clpCI* es mayor en cepas resistentes (73.2%) que en cepas sensibles (45.5%).

También se encontró que el 40.4% de las cepas resistentes a la PZA y 4.5% de las cepas sensibles tienen mutaciones en ambos genes: *rpsA* y *clpCI*; posiblemente esto se deba a la epistasis, la cuál impulsa la evolución de los organismos en la resistencia a los antibióticos como la PZA. La propagación conjunta de las mutaciones en genes diferentes, como *rpsA* y *clpCI*, sugiere una coadaptación de alelos en la población la cual se puede ver favorecida. En el estudio de Nguyen et al. señalan que la calidad del tratamiento juega un rol importante en la aparición de mutaciones particulares causantes de resistencia, e impulsado por la epistasis positiva, es probable que las mutantes

resistentes a los antibióticos sean más propensas a acumular mutaciones, en el mismo gen o en genes diferentes, asociadas a la resistencia de drogas a una mayor frecuencia [32].

Asimismo, se encontraron mutaciones sinónimas y no sinónimas tanto en cepas sensibles como resistentes. La proporción de mutaciones no sinónimas en los genes *rpsA* y *clpC1* en cepas resistentes (75/264=28.4%) fue mayor a la proporción encontrada en cepas sensibles (96/1305=7.4%). El porcentaje de mutaciones sinónimas en los genes *rpsA* y *clpC1* en cepas resistentes (189/264=71.6%) fue menor al porcentaje encontrado en cepas sensibles (1209/1305=92.6%) (Anexo 2, Tabla 2).

Las mutaciones cromosómicas son el principal mecanismo de adquisición de resistencia en *M. tuberculosis*. La tasa de evolución de la resistencia a los principales antibióticos de primera y segunda línea oscila entre 10^{-6} y 10^{-10} mutaciones/célula/generación [32]. Las drogas afectan funciones biológicas importantes, por lo cual las mutaciones en los genes relacionadas a dichas funciones generan un costo biológico que reduce el fitness de las cepas resistentes en comparación con las sensibles en ausencia de antibióticos. Debido a esto, el primer cambio que hacen las bacterias para sobrevivir son mutaciones sinónimas, mutaciones que no causan cambios en las proteínas que estos codifican. Estas no tienen relevancia a nivel clínico; sin embargo, son indicadores de la variabilidad genética y permiten determinar los genes que son más propensos a mutar. Si una población de *M. tuberculosis* sigue evolucionando en respuesta a las presiones de selección impuestas por el medio ambiente dentro de los huéspedes puede adquirir mutaciones no sinónimas, las cuales cambian los aminoácidos de la proteína codificada. Si esta mutación, le permite a la bacteria sobrevivir, es más probable que se seleccione y se mantenga en las poblaciones resistentes a los antibióticos con un costo biológico bajo o nulo. De esta manera, existe una evolución constante del genoma debido a la adquisición de múltiples mutaciones independientes en la población bacteriana a pesar del cuello de botella evolutivo impuesto por la selección purificadora debido a la presión selectiva de fármacos [32]. A pesar de la gran diversidad de mutaciones encontrada, a continuación nos centraremos en las mutaciones no sinónimas encontradas en los genes asociados a la resistencia a la PZA.

Las mutaciones en *panD* fueron encontradas sólo en cepas sensibles a la PZA. Las mutaciones más frecuentes fueron la mutación Ala89Thr presente en 6 de 13 cepas, las

cuales también presentaron mutaciones en el gen *rpsA* (Arg212Arg) y la mutación Asp19Asp en *panD* encontrada en 5 de las 13 cepas. También se encontró una cepa con la mutación Arg99Gly en *panD* acompañada con la mutación Arg212Arg en *rpsA*. La última cepa encontrada presentó la mutación Val138Ala en el extremo carboxilo terminal de PanD, la cual fue previamente reportada por Shi et al. en una cepa resistente a POA que carecía de mutaciones en *rpsA* y *pncA* (Tabla 5 y 6).

La región carboxilo terminal de PanD, donde principalmente encontramos las mutaciones, es una región variable y específica en especies del género *Mycobacterium* y probablemente es el sitio de unión de POA y etiqueta de degradación de PanD para el complejo ClpC1-ClpP [8]. La presencia de mutaciones en el gen *panD* solamente en cepas sensibles a la PZA podría indicar la baja frecuencia de las mutaciones en este gen *in vivo*. En otros estudios, la mayoría de las mutaciones en *panD* en cepas resistentes han sido generadas *in vitro*. Posiblemente esto se deba a que *in vivo* las cepas resistentes a la PZA con mutaciones en *panD* sufren un costo en el fitness de la bacteria haciendo que sea inviable su supervivencia y que sea difícil competir con otras mutantes [26]. Uno de los pocos estudios que encontró cepas resistentes en aislados clínicos fue hecho por Liu et al. donde encontraron la mutación Thr400Cys en un aislado clínico de TB-MDR con mutaciones en *pncA*, demostrando que sí existe la posibilidad que algunas puedan sobrevivir *in vivo* [15, 29]; sin embargo, nosotros no encontramos ninguna.

En 2011, Shi et al. informaron que *rpsA* podría ser otro gen relacionado con la resistencia a la PZA [6]. Desde ese entonces, este gen ha ocupado una posición muy debatida dentro de la literatura, algunos estudios apoyan y otros descartan su papel en la resistencia a la PZA. El hecho de que RpsA sea un objetivo de la PZA está respaldado por la asociación de mutaciones de RpsA y resistencia a la PZA en cepas clínicas [17,19,20,21] y por estudios bioquímicos y estructurales que muestran la unión específica del fármaco a RpsA. Sin embargo, se dispone de datos limitados para explicar la relación entre la mutación *rpsA* y la susceptibilidad a la PZA. Alexander et al. encontraron algunas mutaciones del gen *rpsA* en cepas susceptibles y resistentes a la PZA, y la mayoría de ellas eran mutaciones sinónimas [19]; Bhujju et al. no encontraron ninguna mutación de *rpsA* entre los aislados resistentes a la PZA o los aislados susceptibles a la PZA [20]; Tan et al. informaron que 3 de 52 aislados clínicos resistentes a la PZA y 1 de 108 aislados

sensibles a la PZA tenían mutaciones en *rpsA* [21]. Todos los informes concluyeron que las mutaciones en el gen *rpsA* tienen una correlación baja o nula con la resistencia a la PZA.

En este estudio, el 36.6% (94/257) de los aislados clínicos resistentes a la PZA tienen mutaciones en el gen *rpsA*; incluidas 6 diferentes mutaciones puntuales de las cuales 4 eran no sinónimas y 2 sinónimas. Mientras que el 14.6% (402/2759) de los aislados susceptibles a la PZA también tenían mutaciones en *rpsA*; incluidas 27 diferentes mutaciones: 11 no sinónimas presentes en 47 cepas y 16 sinónimas presentes en las cepas restantes. La diferencia de la proporción de mutaciones en *rpsA* entre cepas sensibles y resistentes fue significativa para las mutaciones totales y no sinónimas ($p=0.00$). Asimismo, la prueba de chi cuadrado demostró que existe una asociación entre las mutaciones totales, sinónimas y no sinónimas en el gen *rpsA* con la resistencia a la PZA (Anexo 3).

La mutación en *RpsA* más frecuente en cepas resistentes fue el cambio no sinónimo previamente informado por Sheen et al., Ala381Val (57.4%). La mutación Ala381Val se encontró en 54 cepas resistentes y 2 sensibles; las cepas resistentes con esta mutación también tenían la mutación His51Arg en *pncA*, la cuál causa un fallo en la enzima PZAsa reduciendo su actividad a 0.02%. La segunda mutación más frecuente, Met432Thr (15.9%), fue encontrada en 15 cepas resistentes y mencionada anteriormente por Sheen et al. [17]. Ellos la encontraron en 2 cepas y en ambos casos junto con la mutación Asp49Asn en *pncA*, la cuál confiere un nivel bajo de la actividad de la PZAsa (0.12%) (Tabla 3 y 4).

Otra mutación que apareció reiteradas veces fue el cambio sinónimo Arg212Arg (13.8% en cepas resistentes y 80% en cepas sensibles), la cuál se encontró en 13 cepas resistentes y todas junto a mutaciones en el gen *panD*. Esta mutación había sido previamente encontrada en aislados clínicos por Alexander et al. en una cepa de la India Africana Oriental [19]. También, Gu et al. la encontraron en 16 de 142 aislados clínicos que también tenían mutaciones de *pncA* y eran resistentes [27].

Por otro lado, Alexander et al. encontraron mutaciones no sinónimas en *rpsA* en dos cepas [19]. Una de las cuáles también encontramos en este estudio, Ala440Thr (1.1%), sin embargo ellos la encontraron en una cepa de referencia de *M. bovis* BCG. La resistencia a la PZA en *M. bovis* es un fenómeno reconocido que se atribuye a la mutación en *pncA* A169G (His57Asp), pero el impacto del cambio de RpsA Ala440Thr aún no se ha determinado.

En cuanto al índice de variabilidad, en las mutaciones no sinónimas podemos ver que el índice de variabilidad es más alto en cepas sensibles que en cepas resistentes. Esto significa que hay más variabilidad de mutaciones pero estas no están afectando la resistencia a la PZA. En cepas resistentes las mutaciones son menos variables pero están en mayor proporción. Probablemente esto se deba a que para la célula es más difícil seleccionar una mutación que no afecte el fitness y a la vez confiera resistencia, son pocas las mutaciones que logran esto. En las cepas sensibles las mutaciones no tienen que conferir resistencia por lo que tienen más libertad de mutar en cualquier sitio ya que solo deben cumplir con la condición de no afectar el fitness. La diferencia entre los índices de variabilidad de las mutaciones no sinónimas en *rpsA* entre cepas sensibles y resistentes fue significativa.

Todas las mutaciones en *rpsA* se localizaron principalmente en la región carboxilo terminal (residuos 285-481) de la proteína, hallazgo que coincide con estudios de Tan et al., quienes reportaron 3 aislados resistentes a la PZA con mutaciones no sinónimas [21] y Gu et al. quienes reportaron mutaciones en *rpsA* y 7 de ellas en la región carboxilo terminal [27]. Sin embargo, el cuarto dominio S1 de RpsA es responsable de la unión del POA y el POA inhibe la trans-traducción al competir directamente por el sitio de unión de tmRNA. Específicamente los residuos Lys303, Phe307, Phe310 y Arg357 del dominio S1 estarían interactuando con POA y las mutaciones en estos residuos anulan la interacción (Figura 4). Sin embargo, no se han encontrado mutaciones en estos sitios de unión del POA en cepas clínicas. Yang et al. sugieren que esto puede deberse al hecho de que estos residuos son esenciales para la unión y trans traducción del tmRNA y por lo tanto para la viabilidad del bacilo. Por el contrario, es menos probable que las mutaciones en el extremo carboxilo terminal de RpsA afecten la actividad de unión del tmRNA, pero de igual manera inducen cambios conformacionales en los sitios de unión del POA debido

a que altera la interacción del extremo carboxilo terminal flexible con el cuarto dominio S1. Esto explica porque las mutaciones de RpsA asociadas con la resistencia a la PZA se encuentran principalmente en el extremo carboxilo terminal y no en el sitio de unión al POA[28].

En cuanto al gen *clpC1*, más de la mitad de las cepas resistentes tuvieron mutaciones en este gen (170/257=66.2%), mientras que solo el 38.2% de las cepas sensibles tuvieron mutaciones en este gen. La diferencia de la proporción de mutaciones en *clpC1* entre cepas sensibles y resistentes fue significativa para las mutaciones totales y sinónimas ($p=0.00$). Asimismo, la prueba de chi cuadrado demostró que existe una asociación entre las mutaciones totales y sinónimas en el gen *clpC1* con la resistencia a la PZA (Anexo 4).

La mayoría de cepas resistentes con mutaciones en *clpC1* (166 cepas, 97.6%) tuvieron mutaciones sinónimas (Asn806Asn y Leu768Leu); mientras que las 4 cepas restantes tuvieron las mutaciones no sinónimas: Phe595Cys, Lys564Asn y Pro165Leu. La mutación predominante (Asn806Asn) fue encontrada previamente en 2 cepas resistentes aisladas en Suecia; una cepa tenía la mutación Leu172Pro en *pncA*, por lo que su resistencia podría deberse en mayor parte a *pncA*. Mientras que la segunda cepa tenía un *pncA* nativo, pero estaba acompañada de la mutación Ile115Thr en el gen *panD*, sugiriendo que la resistencia podría deberse a mecanismos alternativos a *pncA* [24]. Asimismo, la mutación Asn806Asn fue encontrada en el estudio de Mok et al. en una cepa resistente a la PZA de linaje LAM (Latin American – Mediterranean) la cual tenía el *pncA* nativo y también estaba acompañada de la mutación Ile115Thr en *panD* [31].

Por otra parte, Modlin et al, encontraron la mutación Val63Ala en la región amino terminal de ClpC1 en 15 aislados pertenecientes al linaje EAI (East African-Indian). Sin embargo, observaron que 11 pertenecían a cepas las cuales habían sido consideradas falsamente como resistentes a la PZA y 4 eran resistentes a la PZA con el gen *pncA* nativo, donde dos de estas tenían además una mutación en el gen *rpsA* [24]. Esta misma mutación se encontró en este trabajo de investigación en 2 cepas sensibles, por lo que es posible que esta mutación conferiría un nivel de resistencia bajo a la PZA. De igual manera, la mutación Thr241Thr, encontrada en nuestro trabajo en una cepa sensible, también fue encontrada en el estudio de Mok et al. en una cepa resistente a la PZA con una mutación

en *pncA* y acompañada de la mutación Val63Ala en *clpC1*. Posiblemente su resistencia se puede explicar por la sumatoria de la mutación en *pncA* y la mutación Val63Ala, previamente mencionada [31].

Normalmente, la mayoría de mutaciones en *clpC1* encontradas en cepas resistentes se encuentran en la región N-terminal de la proteína, que se encarga de reconocer las proteínas mal plegadas para iniciar el proceso de degradación. En este trabajo, la mutación más frecuente en *clpC1* (Asn806Asn) tanto en cepas resistentes como sensibles se observó en la región C-terminal, la cual no está muy caracterizada. Las mutaciones en esta región probablemente no causan resistencia ya que no es el sitio de unión del POA y es por eso que encontramos principalmente mutaciones sinónimas.

Sin embargo, todavía no queda claro si las mutaciones observadas en las regiones codificantes de *clpC1* causan resistencia a la PZA a través de un mecanismo directo, por ejemplo, al evitar la unión del fármaco a la proteína ClpC1, o un mecanismo indirecto, por ejemplo, al afectar la selectividad de sustrato de ClpC1 y, por lo tanto, el nivel de algunas proteínas que deberían ser degradadas por el complejo de la proteasa caseinolítica [22].

Una limitante de nuestro estudio es que la base de datos no mostraba información sobre ensayos de susceptibilidad a la PZA. Por lo que consideramos que todas las cepas con mutaciones en *pncA* eran resistentes a la PZA debido a que existe evidencia de que el 70-98% de la resistencia a la PZA se debe a mutaciones en este gen [16]. Por lo que sería interesante poder complementar los datos obtenidos con el análisis experimental ya que permitiría abordar otras preguntas como el papel de las mutaciones no sinónimas en *rpsA*, *panD* y *clpC1* en cepas susceptibles a la PZA (sin mutaciones en *pncA*). También se necesitan estudios experimentales futuros para generar cepas con mutaciones en *pncA* y mutaciones en *rpsA*, *clpC1* y *panD*, individualmente y en forma conjunta para determinar si las mutaciones en los demás genes asociados a la resistencia son suficientes para conferir resistencia por sí solos o cuál es la interacción molecular con *pncA*. Por otro lado, los datos se limitan a Lima, Perú, ; por lo tanto, no representan al universo de “aislados clínicos”. Por lo que poder ampliar a otras áreas geográficas del Perú y del mundo

ayudaría a determinar con mayor precisión el papel de las mutaciones en *rpsA*, *clpCI* y *panD* en la resistencia a la PZA.

Un conocimiento profundo de las mutaciones asociadas con la resistencia a la PZA contribuiría con los esfuerzos de secuenciación y a medida que se prueben un número creciente de cepas, se descubrirán más mutaciones responsables. Por lo que una mejor base genética de la resistencia a la PZA ayudará a los médicos a planificar y ofrecer un tratamiento clínico más eficaz para los casos de tuberculosis, reduciendo la probabilidad de aparición de resistencia a los medicamentos. También contribuirá a los esfuerzos para el desarrollo de ensayos de diagnóstico en el lugar de atención basados en secuenciamiento de nueva generación con mejor sensibilidad, especificidad y rentabilidad. Asimismo, con la velocidad cada vez mayor y el costo reducido de la secuenciación del genoma bacteriano, esta podría ser una alternativa para determinar la susceptibilidad a los fármacos mediante pruebas moleculares.

Finalmente, aunque las evidencias han demostrado que las mutaciones de *rpsA* y *clpCI* están involucradas en la resistencia a la PZA en cepas sin mutaciones en *pncA* aún falta investigar el efecto de dichas mutaciones en cepas con mutaciones en *pncA*. En este estudio se ha demostrado que existe asociación entre las mutaciones en *pncA* y mutaciones en *rpsA* y *clpCI*. En estudios futuros será importante estudiar la contribución de dichas mutaciones en aislados clínicos de *M. tuberculosis* con el objetivo de predecir la resistencia a PZA en cepas con mutaciones en *pncA* que no afecten los sitios catalíticos y por lo tanto no disminuyan su actividad enzimática.

VII. Conclusión

En este estudio se encontraron 257 (9%) cepas resistentes de 2759 (91%) cepas sensibles a la PZA. Existe una asociación entre las mutaciones en el gen *pncA* (resistentes) y en los genes *rpsA* y *clpCI*, lo cuál podría explicar la resistencia a la PZA en *M. tuberculosis* a través de un efecto aditivo; por lo que las mutaciones en *rpsA* y *clpCI* individualmente y en conjunto podrían tener un rol en la resistencia cuando las mutaciones en *pncA* no causan un fallo total de la enzima PZAsa. Encontramos diferencia significativa en mutaciones no sinónimas en *rpsA* y mutaciones sinónimas en *clpCI* entre cepas sensibles

y resistentes. Encontramos diferencia significativa entre el el índice de variabilidad en mutaciones no sinónimas en *rpsA* y sinónimas en *clpC1* entre cepas sensibles y resistentes.

VIII. Bibliografia:

1. Lamont EA, Dillon NA, Baughn AD. The bewildering antitubercular action of pyrazinamide. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2020 84:e00070-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR00070-19>.
2. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr.* 2014 Aug;2(4):MGM2-0023-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013. PMID: 26104205.
3. Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Nov;52(5):790-5. doi: 10.1093/jac/dkg446. Epub 2003 Oct 16. PMID: 14563891.
4. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003 Jan;7(1):6-21. PMID: 12701830.
5. Lu, P., Haagsma, A. C., Pham, H., Maaskant, J. J., Mol, S., Lill, H., & Bald, D. Pyrazinoic Acid Decreases the Proton Motive Force, Respiratory ATP Synthesis Activity, and Cellular ATP Levels. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011. 55(11), 5354–5357. doi:10.1128/aac.00507-11
6. Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE 3rd, Wang H, Zhang W, Zhang Y. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 2011 Sep 16;333(6049):1630-2. doi: 10.1126/science.1208813. Epub 2011 Aug 11. PMID: 21835980; PMCID: PMC3502614.
7. Dillon, N. A., Peterson, N. D., Feaga, H. A., Keiler, K. C., & Baughn, A. D. Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of trans-Translation and RpsA. *Scientific Reports.* 2017, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-06415-5
8. Shi W, Chen J, Feng J, Cui P, Zhang S, Weng X, Zhang W, Zhang Y. Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect.* 2014 Aug;3(8):e58. doi: 10.1038/emi.2014.61. Epub 2014 Aug 13. PMID: 26038753; PMCID: PMC4150287.
9. Dillon, N. A., Peterson, N. D., Rosen, B. C., & Baughn, A. D. Pantothenate and Pantetheine Antagonize the Antitubercular Activity of Pyrazinamide.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014. 58(12), 7258–7263. doi:10.1128/aac.04028-14
10. Gopal P, Yee M, Sarathy J, Low JL, Sarathy JP, Kaya F, Dartois V, Gengenbacher M, Dick T. Pyrazinamide Resistance Is Caused by Two Distinct Mechanisms: Prevention of Coenzyme A Depletion and Loss of Virulence Factor Synthesis. *ACS Infect Dis.* 2016 Sep 9;2(9):616-626. doi: 10.1021/acsinfecdis.6b00070. Epub 2016 Aug 8. PMID: 27759369; PMCID: PMC5731467.
 11. Gopal P, Nartey W, Ragunathan P, Sarathy J, Kaya F, Yee M, Setzer C, Manimekalai MSS, Dartois V, Grüber G, Dick T. Pyrazinoic Acid Inhibits Mycobacterial Coenzyme A Biosynthesis by Binding to Aspartate Decarboxylase PanD. *ACS Infect Dis.* 2017 Nov 10;3(11):807-819. doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00079. Epub 2017 Oct 18. PMID: 28991455; PMCID: PMC5734868.
 12. Sun Q, Li X, Perez LM, Shi W, Zhang Y, Sacchettini JC. The molecular basis of pyrazinamide activity on *Mycobacterium tuberculosis* PanD. *Nat Commun.* 2020 Jan 17;11(1):339. doi: 10.1038/s41467-019-14238-3. PMID: 31953389; PMCID: PMC6969166.
 13. Gopal P, Sarathy JP, Yee M, Ragunathan P, Shin J, Bhushan S, Zhu J, Akopian T, Kandror O, Lim TK, Gengenbacher M, Lin Q, Rubin EJ, Grüber G, Dick T. Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase. *Nat Commun.* 2020 Apr 3;11(1):1661. doi: 10.1038/s41467-020-15516-1. PMID: 32245967; PMCID: PMC7125159.
 14. Gopal, P., Grüber, G., Dartois, V., & Dick, T. Pharmacological and Molecular Mechanisms Behind the Sterilizing Activity of Pyrazinamide. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2019 doi:10.1016/j.tips.2019.10.005
 15. Liu W, Chen J, Shen Y, Jin J, Wu J, Sun F, Wu Y, Xie L, Zhang Y, Zhang W. Phenotypic and genotypic characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Hangzhou, China. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Sep;24(9):1016.e1-1016.e5. doi: 10.1016/j.cmi.2017.12.012. Epub 2017 Dec 26. PMID: 29288021.
 16. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, López-Llano J, Fuentes P, Valencia E, Zimic MJ. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2009 Mar;89(2):109-13. doi:

- 10.1016/j.tube.2009.01.004. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19249243; PMCID: PMC2691962
17. Sheen P, Requena D, Gushiken E, Gilman RH, Antiparra R, Lucero B, Lizárraga P, Cieza B, Roncal E, Grandjean L, Pain A, McNerney R, Clark TG, Moore D, Zimic M. A multiple genome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* reveals specific novel genes and mutations associated with pyrazinamide resistance. *BMC Genomics*. 2017 Oct 11;18(1):769. doi: 10.1186/s12864-017-4146-z. PMID: 29020922; PMCID: PMC5637355.
 18. Shi, W., Cui, P., Niu, H., Zhang, S., Tønjum, T., Zhu, B., & Zhang, Y. Introducing RpsA Point Mutations Δ 438A and D123A into the Chromosome of *Mycobacterium tuberculosis* Confirms Their Role in Causing Resistance to Pyrazinamide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019 63(6), e02681-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02681-18>
 19. Alexander DC, Ma JH, Guthrie JL, Blair J, Chedore P, Jamieson FB. Gene sequencing for routine verification of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a role for *pncA* but not *rpsA*. *J Clin Microbiol* 2012;50:3726–8
 20. Bhujra S, Fonseca Lde S, Marsico AG, de Oliveira Vieira GB, Sobral LF, Stehr M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Rio de Janeiro reveal unusually low correlation between pyrazinamide resistance and mutations in the *pncA* gene. *Infect Genet Evol* 2013;19:1–6
 21. Tan, Y., Hu, Z., Zhang, T., Cai, X., Kuang, H., Liu, Y., ... Zhao, Y. Role of *pncA* and *rpsA* Gene Sequencing in Detection of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Southern China. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013, 52(1), 291–297. doi:10.1128/jcm.01903-13
 22. Yee M, Gopal P, Dick T. Missense Mutations in the Unfoldase ClpC1 of the Caseinolytic Protease Complex Are Associated with Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jan 24;61(2):e02342-16. doi: 10.1128/AAC.02342-16. PMID: 27872068; PMCID: PMC5278685.
 23. Zhang, S., Chen, J., Shi, W., Cui, P., Zhang, J., Cho, S., ... Zhang, Y. Mutation in *clpC1* encoding an ATP-dependent ATPase involved in protein degradation is associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections*. 2017 6(2), e8–e8. doi:10.1038/emi.2017.1

24. Modlin SJ, Marbach T, Werngren J, et al. Atypical Genetic Basis of Pyrazinamide Resistance in Mono-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2021 Mar. DOI: 10.1128/aac.01916-20
25. Zhang S, Chen J, Shi W, Liu W, Zhang W, Zhang Y. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect*. 2013 Jun;2(6):e34. doi: 10.1038/emi.2013.38. Epub 2013 Jun 12. PMID: 26038471; PMCID: PMC3697303.
26. Gopal P, Tasneen R, Yee M, Lanoix JP, Sarathy J, Rasic G, Li L, Dartois V, Nuermberger E, Dick T. In Vivo-Selected Pyrazinoic Acid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Harbor Missense Mutations in the Aspartate Decarboxylase PanD and the Unfoldase ClpC1. *ACS Infect Dis*. 2017 Jul 14;3(7):492-501. doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00017. Epub 2017 Mar 16. PMID: 28271875; PMCID: PMC5514395.
27. Gu Y, Yu X, Jiang G, Wang X, Ma Y, Li Y, Huang H. Pyrazinamide resistance among multidrug-resistant tuberculosis clinical isolates in a national referral center of China and its correlations with pncA, rpsA, and panD gene mutations. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016 Mar;84(3):207-11. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.017. Epub 2015 Oct 28. PMID: 26775806.
28. Yang, J., Liu, Y., Bi, J., Cai, Q., Liao, X., Li, W., Guo, C., Zhang, Q., Lin, T., Zhao, Y., Wang, H., Liu, J., Zhang, X. and Lin, D. (2015), Structural basis for targeting Mtb RpsA by pyrazinamide. *Molecular Microbiology*, 95: 791-803. <https://doi.org/10.1111/mmi.12892>
29. Ramirez-Busby SM, Rodwell TC, Fink L, Catanzaro D, Jackson RL, Pettigrove M, Catanzaro A, Valafar F. A Multinational Analysis of Mutations and Heterogeneity in PZase, RpsA, and PanD Associated with Pyrazinamide Resistance in M/XDR *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 2017 Jun 19;7(1):3790. doi: 10.1038/s41598-017-03452-y. PMID: 28630430; PMCID: PMC5476565.
30. World Health Organization. Global Tuberculosis Report [Internet]. 2020. Recuperado de: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html
31. Mok S, Roycroft E, Flanagan PR, Montgomery L, Borroni E, Rogers TR, Fitzgibbon MM. 2021. Overcoming the challenges of pyrazinamide susceptibility

testing in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 65:e02617-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.02617-20>.

32. Nguyen QH, Contamin L, Nguyen TVA, Bañuls AL. Insights into the processes that drive the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Evol Appl*. 2018 Jun 21;11(9):1498-1511. doi: 10.1111/eva.12654. PMID: 30344622; PMCID: PMC6183457.

Anexos:

Anexo 1 Test de proporciones entre las cepas de *M. tuberculosis* resistentes y sensibles a la PZA con mutaciones en los genes asociados a la resistencia a la PZA (*rpsA*, *panD* y *clpC1*) y significancia estadística.

```
. prtest r ==s
```

Two-sample test of proportions

r: Number of obs = 257
s: Number of obs = 2759

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
r	.7315175	.0276442			.6773359 .7856991
s	.4780718	.0095099			.4594327 .4967108
diff	.2534457	.0292342			.1961477 .3107437
	under Ho:	.0326094	7.77	0.000	

diff = prop(r) - prop(s) z = 7.7722
Ho: diff = 0

Ha: diff < 0 Pr(Z < z) = 1.0000
Ha: diff != 0 Pr(|Z| < |z|) = 0.0000
Ha: diff > 0 Pr(Z > z) = 0.0000

La proporción de cepas sensibles que tienen al menos una mutación en los genes asociados a la resistencia a la PZA (*rpsA*, *panD* y *clpC1*) fue menor a la proporción de cepas resistentes que tienen al menos una mutación en los genes mencionados anteriormente. La diferencia entre proporciones fue significativa estadísticamente ($p < 0.001$).

Anexo 2 Test de proporciones entre las cepas de *M. tuberculosis* resistentes y sensibles a la PZA con mutaciones no sinónimas en los genes *rpsA* y *clpC1* y significancia estadística.

```
Two-sample test of proportions
```

r: Number of obs = 264
s: Number of obs = 1305

Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
r	.2840909	.0277559			.2296903 .3384915
s	.0735632	.0072266			.0593994 .0877271
diff	.2105277	.0286813			.1543135 .2667419
	under Ho:	.0210297	10.01	0.000	

diff = prop(r) - prop(s) z = 10.0110
Ho: diff = 0

Ha: diff < 0 Pr(Z < z) = 1.0000
Ha: diff != 0 Pr(|Z| < |z|) = 0.0000
Ha: diff > 0 Pr(Z > z) = 0.0000

La proporción de cepas sensibles que tienen al menos una mutación no sinónima en los genes asociados a la resistencia a la PZA (*rpsA* y *clpC1*) fue menor a la proporción de cepas resistentes que tienen al menos una mutación en los genes mencionados anteriormente. La diferencia entre proporciones fue significativa estadísticamente ($p < 0.001$).

Tabla 3. Mutaciones en *rpsA*, *clpC1* y *panD* en cepas resistentes a la PZA

Gen	Mutación	Cantidad (%)	Mutaciones en otros genes
<i>rpsA</i>	Ala381Val (gcc/gTc)	54 (57.4%)	<i>clpC1</i> : 52 Asn806Asn (aac/aaT)
	Met432Thr (atg/aCg)	15 (15.9%) [17]	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
	Arg212Arg (cga/cgC)	13 (13.8%) [19, 27]	<i>clpC1</i> : Pro165Leu (ccg/cTg)
	Thr279Thr (act/acC)	10 (10.7%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
	Ala440Thr (gcg/Acg)	1 (1.1%) [19]	<i>clpC1</i> : Leu768Leu (ttg/Ctg)
	Pro375Ser (ccg/Tcg)	1 (1.1%)	-
<i>clpC1</i>	Asn806Asn (aac/aaT)	165 (97.1%) [24,31]	<i>rpsA</i> : 52 Ala381Val (gcc/gTc) 15 Met432Thr (atg/aCg) 10 Thr279Thr (act/acC)
	Phe595Cys (ttc/tGc)	2 (1.1%)	-
	Pro165Leu (ccg/cTg)	1 (0.6%)	<i>rpsA</i> : Arg212Arg (cga/cgC)
	Lys564Asn (aag/aaC)	1 (0.6%)	-
	Leu768Leu (ttg/Ctg)	1 (0.6%)	<i>rpsA</i> : Ala440Thr (gcg/Acg)
<i>panD</i>	-	-	-

Cepas con mutaciones en *rpsA*, *clpC1* y *panD* y en paréntesis los residuos que codifican. Mutaciones ordenadas de mayor a menor frecuencia por gen. El símbolo - significa que no se encontró ninguna mutación en ese gen.

Tabla 4. Mutaciones no sinónimas en los genes *rpsA*, *clpC1* y *panD* encontradas en cepas resistentes a la PZA

Gen	Mutación	Cantidad (%)	Mutaciones en otros genes
<i>rpsA</i>	Ala381Val (gcc/gTc)	54 (76.1%)	<i>clpC1</i> : 52 Asn806Asn (aac/aaT)
	Met432Thr (atg/aCg)	15 (21.1%) [17]	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
	Ala440Thr (gcg/Acg)	1 (1.4%) [19]	<i>clpC1</i> : Leu768Leu (ttg/Ctg)
	Pro375Ser (ccg/Tcg)	1 (1.4%)	-
<i>clpC1</i>	Phe595Cys (ttc/tGc)	2 (50%)	-
	Pro165Leu (ccg/cTg)	1 (25%)	<i>rpsA</i> : Arg212Arg (cga/cgC)
	Lys564Asn (aag/aaC)	1 (25%)	-
<i>panD</i>	-	-	-

Tabla 5 Mutaciones en *rpsA*, *clpC1* y *panD* en cepas sensibles a la PZA

Gen	Mutación	Cantidad (%)	Mutaciones en otros genes
<i>rpsA</i>	Arg212Arg (cga/cgC)	323 (80%)	<i>panD</i> : 6 Ala89Thr (gcg/Acg) 1 Arg99Gly (cgc/Ggc)
	Met432Thr (atg/aCg)	32 (8%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
	Thr279Thr (act/acC)	10 (2.5%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
	Gly209Gly (ggc/ggT)	8 (2%)	
	Arg329Arg (cgt/cgC)	3 (0.9%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
	Ala440Thr (gcg/Acg)	3 (0.8%)	
	Ala381Val (gcc/gTc)	2 (0.6%)	<i>clpC1</i> : 1 Asn806Asn (aac/aaT)

Val13Ala (gtc/gCc)	2 (0.6%)	<i>clpC1</i> : Met734Ile (atg/atA)
Tyr369Cys (tac/tGc)	2 (0.6%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
Val231Val (gtg/gtA)	2 (0.6%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
Leu304Leu (ttg/Ctg)	1 (0.2%)	<i>clpC1</i> : Glu267Glu (gaa/gaG)
Ala118Ala (gcg/gcC)	1 (0.2%)	
Ala88Ala (gcc/gcT)	1 (0.2%)	
Asn366Ser (aat/aGt)	1 (0.2%)	
Asp264Asp (gac/gaT)	1 (0.2%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
Asp382Asp (gac/gaT)	1 (0.2%)	<i>clpC1</i> : Val170Ala (gtg/gCg)
Ile219Val (atc/Gtc)	1 (0.2%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
Ile63Met (atc/atG)	1 (0.2%)	
Ile293Ile (atc/atT)	1 (0.2%)	
Leu191Leu (ctg/Ttg)	1 (0.2%)	
Leu304Phe (ttg/ttC)	1 (0.2%)	<i>clpC1</i> : Gln609Gln (caa/caG)
Pro4Leu (ccc/cTc)	1 (0.2%)	
Ser449Ser (tcg/tcA)	1 (0.2%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
Val126Phe (gtc/Ttc)	1 (0.2%)	
Thr370Thr (acc/acT)	1 (0.2%)	<i>clpC1</i> : Pro766Leu (ccg/cTg)
Val251Val (gtg/gtA)	1 (0.2%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
Val260Val (gtc/gtA)	1 (0.2%)	

<i>clpC1</i>	Asn806Asn (aac/aaT) [24,31]	853 (93.3%)	<i>rpsA</i> : 31 Met432Thr (atg/aCg), 2 Val231Val (gtg/gtA), 10 Thr279Thr (act/acC), Asp264Asp (gac/gaT), Ala381Val (gcc/gTc), 3 Arg329Arg (cgt/cgC), 2 Tyr369Cys (tac/tGc), Ser449Ser (tcg/tcA), Val251Val (gtg/gtA), Ile219Val (atc/Gtc)
	Asp326Asn (gac/Aac)	10 (1.1%)	
	Pro796Leu (ccg/cTg)	6 (0.7%)	
	Met734Ile (atg/atA)	5 (0.6%)	<i>rpsA</i> : 2 Val13Ala (gtc/gCc)
	Val767Ala (gtg/gCg)	4 (0.4%)	
	Ala181Ser (gcg/Tcg)	3 (0.3%)	
	Ala408Ser (gct/Tct)	2 (0.2%)	
	Gln784Pro (cag/cCg)	2 (0.2%)	
	Pro843Pro (ccg/ccA)	2 (0.2%)	
	Pro766Leu (ccg/cTg)	2 (0.2%)	<i>rpsA</i> : Thr370Thr (acc/acT)
	Val63Ala (gtc/gCc) [24]	2 (0.2%)	
	Arg706Arg (cgc/cgG)	1 (0.1%)	
	Gln609Gln (caa/caG)	1 (0.1%)	<i>rpsA</i> : Leu304Phe (ttg/ttC)
	Glu267Glu (gaa/gaG)	1 (0.1%)	<i>rpsA</i> : Leu304Leu (ttg/Ctg)
	Thr241Thr (acg/acA) [31]	1 (0.1%)	
Arg729Arg (cgg/cgA)	1 (0.1%)		
Arg824Cys (cgc/Tgc)	1 (0.1%)		

	Asp392His (gac/Cac)	1 (0.1%)	
	Asp689Asn (gac/Aac)	1 (0.1%)	
	Asp765Glu (gac/gaG)	1 (0.1%)	
	Glu161Gly (gag/gGg)	1 (0.1%)	
	Glu814Asp (gag/gaC)	1 (0.1%)	
	Glu793Gln (gag/Cag)	1 (0.1%)	
	Gly160Gly (gga/ggC)	1 (0.1%)	
	His515Asp (cac/Gac)	1 (0.1%)	
	Leu214Leu (ctg/ctC)	1 (0.1%)	
	Leu362Val (ctg/Gtg)	1 (0.1%)	
	Leu450Leu (ctg/ctA)	1 (0.1%)	
	Pro707Ser (ccg/Tcg)	1 (0.1%)	<i>rpsA</i> : Met432Thr (atg/aCg)
	Lys756Asn (aag/aaC)	1 (0.1%)	
	Lys148Gln (aag/Cag)	1 (0.1%)	<i>rpsA</i> : Arg212Arg (cga/cgC)
	Phe791Leu (ttc/Ctc)	1 (0.1%)	
	Ser736Asn (agc/aAc)	1 (0.1%)	
	Thr654Ala (acg/Gcg)	1 (0.1%)	
	Val238Val (gtg/gtA)	1 (0.1%)	
	Val170Ala (gtg/gCg)	1 (0.1%)	<i>rpsA</i> : Asp382Asp (gac/gaT)
	Ile26Ile (ata/atC)	1 (0.1%)	<i>rpsA</i> : Ser383Ser (agt/agC)
	Ala89Thr (gcg/Acg)	6 (46.2%)	<i>rpsA</i> : Arg212Arg (cga/cgC)

<i>panD</i>	Asp19Asp (gac/gaT)	5 (38.4%)	
	Val138Ala (gtg/gCg) [8]	1 (7.7%)	
	Arg99Gly (cgc/Ggc)	1 (7.7%)	<i>rpsA</i> : Arg212Arg (cga/cgC)

*1 cepa eliminada (29544_1-245) porque tenía 61 mutaciones en *rpsA* y 76 en *clpC1*

Tabla 6 Mutaciones no sinónimas en *rpsA*, *clpC1* y *panD* en cepas sensibles a la PZA

Gen	Mutación	Cantidad (%)	Mutaciones en otros genes
<i>rpsA</i>	Met432Thr (atg/aCg)	32 (68.1%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
	Ala440Thr (gcg/Acg)	3 (6.4%)	
	Ala381Val (gcc/gTc)	2 (4.3%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
	Val13Ala (gtc/gCc)	2 (4.3%)	<i>clpC1</i> : Met734Ile (atg/atA)
	Tyr369Cys (tac/tGc)	2 (4.3%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
	Asn366Ser (aat/aGt)	1 (2.1%)	
	Ile219Val (atc/Gtc)	1 (2.1%)	<i>clpC1</i> : Asn806Asn (aac/aaT)
	Ile63Met (atc/atG)	1 (2.1%)	
	Leu304Phe (ttg/ttC)	1 (2.1%)	<i>clpC1</i> : Gln609Gln (caa/caG)
	Pro4Leu (ccc/cTc)	1 (2.1%)	
	Val126Phe (gtc/Ttc)	1 (2.1%)	
<i>clpC1</i>	Asp326Asn (gac/Aac)	10 (19.5%)	
	Pro796Leu (ccg/cTg)	6 (11.7%)	
	Met734Ile (atg/atA)	5 (9.7%)	<i>rpsA</i> : 2 Val13Ala (gtc/gCc)
	Val767Ala (gtg/gCg)	4 (7.8%)	

	Ala181Ser (gcg/Tcg)	3 (5.9%)	
	Ala408Ser (gct/Tct)	2 (3.8%)	
	Gln784Pro (cag/cCg)	2 (3.8%)	
	Pro766Leu (ccg/cTg)	2 (3.8%)	<i>rpsA</i> : Thr370Thr (acc/acT)
	Arg824Cys (cgc/Tgc)	1 (2%)	
	Asp392His (gac/Cac)	1 (2%)	
	Asp689Asn (gac/Aac)	1 (2%)	
	Asp765Glu (gac/gaG)	1 (2%)	
	Glu161Gly (gag/gGg)	1 (2%)	
	Glu814Asp (gag/gaC)	1 (2%)	
	Glu793Gln (gag/Cag)	1 (2%)	
	His515Asp (cac/Gac)	1 (2%)	
	Leu362Val (ctg/Gtg)	1 (2%)	
	Pro707Ser (ccg/Tcg)	1 (2%)	<i>rpsA</i> : Met432Thr (atg/aCg)
	Lys756Asn (aag/aaC)	1 (2%)	
	Lys148Gln (aag/Cag)	1 (2%)	<i>rpsA</i> : Arg212Arg (cga/cgC)
	Phe791Leu (ttc/Ctc)	1 (2%)	
	Ser205Cys (tct/tGt)	1 (2%)	
	Ser736Asn (agc/aAc)	1 (2%)	
	Thr654Ala (acg/Gcg)	1 (2%)	
	Val170Ala (gtg/gCg)	1 (2%)	<i>rpsA</i> : Asp382Asp (gac/gaT)

<i>panD</i>	Ala89Thr (gcg/Acg)	6 (75%)	<i>rpsA</i> : Arg212Arg (cga/cgC)
	Val138Ala (gtg/gCg) [8]	1 (12.5%)	
	Arg99Gly (cgc/Ggc)	1 (12.5%)	<i>rpsA</i> : Arg212Arg (cga/cgC)

Anexo 3 Prueba de chi cuadrado entre las cepas de *M. tuberculosis* resistentes y las cepas resistentes con mutaciones en *rpsA*

Key
frequency
expected frequency

RESISTENCI A	RPSA		Total
	0	1	
0	2,520 2,305.3	239 453.7	2,759 2,759.0
1	0 214.7	257 42.3	257 257.0
Total	2,520 2,520.0	496 496.0	3,016 3,016.0

Pearson chi2(1) = 1.4e+03 Pr = 0.000

Existe asociación entre las mutaciones totales en rpsA y la resistencia a la PZA en M.tuberculosis. La prueba de chi cuadrado fue significativa estadísticamente (p<0.001).

Anexo 4 Prueba de chi cuadrado entre las cepas de *M. tuberculosis* resistentes y las cepas resistentes con mutaciones en *clpC1*

resistentes con mutaciones en *clpC1*

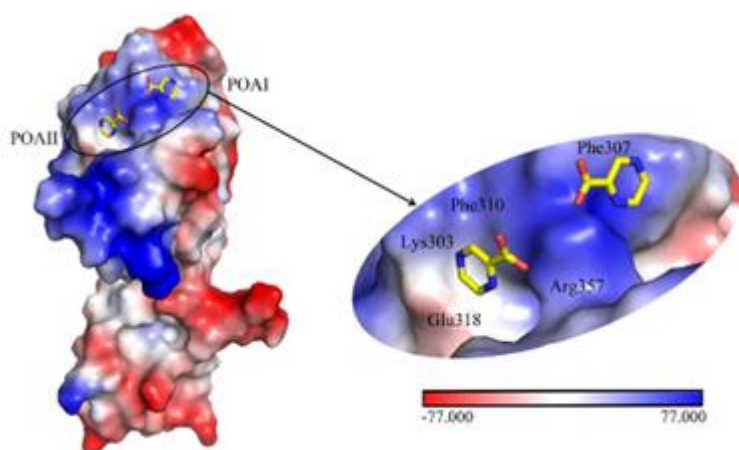
Key
frequency
expected frequency

RESISTENCI A	CLPC1		Total
	0	1	
0	1,943 1,777.4	816 981.6	2,759 2,759.0
1	0 165.6	257 91.4	257 257.0
Total	1,943 1,943.0	1,073 1,073.0	3,016 3,016.0

Pearson chi2(1) = 508.7282 Pr = 0.000

Existe asociación entre las mutaciones totales en clpC1 y la resistencia a la PZA en M.tuberculosis. La prueba de chi cuadrado fue significativa estadísticamente (p<0.001).

Fig 4. Interacción extremo carboxilo de RpsA con POA [28]



Representación de la superficie del potencial electrostático de la estructura del complejo extremo carboxilo de RpsA-POA con una vista de primer plano de los sitios de unión del ligando [28]

Tabla 7. Mutaciones sinónimas y no sinónimas en el gen *pncA*

	Mutación en <i>pncA</i>	Cantidad	Mutaciones en otros genes	
			<i>rpsA</i>	<i>ClpC1</i>
	Ala134Gly	1		
	Ala146Glu	2		
	Ala28Thr	1		
	Ala46Val	1		
	Arg29Ser	2		Asn806Asn
	Asp12Ala [16,17,29]	3	1 Arg212Arg	2 Asn806Asn
	Asp12Asn [27]	1		

Mutaciones no sinónimas	Asp12Gly [15,16,17]	4		
	Asp12Tyr	1	Met432Thr	Asn806Asn
	Asp136Gly [21,29]	2	Met432Thr	Asn806Asn
	Asp136Tyr [31]	7	Thr279Thr	Asn806Asn
	Asp49Asn [16,17]	7	Met432Thr	Asn806Asn
	Asp8Glu [29]	2	1 Arg212Arg	
	Cys14Gly [17]	2	Arg212Arg	1 Pro165Leu
	Gln10Arg [29]	36		Asn806Asn
	Gln10Pro [21,29]	5	2 Met432Thr	y Asn806Asn
	Gly105Asp	1	Thr279Thr	Asn806Asn
	Gly132Ser [29]	1		
	Gly97Asp	1	Met432Thr	Asn806Asn
	Gly97Ser [29]	1		
	His51Arg [16,17,27,29]	56	54 Ala381Val	53 Asn806Asn
	His57Arg [17]	1		
	His57Asp [29]	1	Ala440Thr	Leu768Leu
	His57Leu	6		Asn806Asn
	His71Arg	1		Asn806Asn
	His82Asp	2	1 Met432Thr	y Asn806Asn
Ile5Ser [29]	1			

Ile5Thr	2		Asn806Asn
Ile6Ser	1	Arg212Arg	
Leu116Pro [16]	12		Asn806Asn
Leu159Val	1	Met432Thr	Asn806Asn
Leu172Pro [20,29]	2		Asn806Asn
Leu182Phe	2		Asn806Asn
Leu182Trp [17,29]	2		
Leu35Pro [20]	1		
Leu4Ser [29,31]	2		Asn806Asn
Lys48Thr [16,17,29]	13		10 Asn806Asn
Met175Arg [21,29]	1		
Phe58Leu	1		Asn806Asn
Phe81Ser	1	Thr279Thr	Asn806Asn
Pro54Leu [21,29]	1	Thr279Thr	Asn806Asn
Pro54Ser	3		
Ser164Pro [29]	1	Pro375Ser	
Ser66Pro [21]	1	Arg212Arg	
Ser67Pro [29]	1		
Thr100Pro	1		
Thr135Pro [16,17,21]	5		

	Thr160Ala [17,29]	1	Arg212Arg	
	Thr160Lys [29]	1		
	Thr160Pro	2		Asn806Asn
	Thr76Pro [16,20,21,27,29]	6	3 Arg212Arg	
	Trp119Leu	3	1 Arg212Arg	2 Asn806Asn
	Trp68Arg [27,29]	1		
	Trp68Gly [27]	1		Asn806Asn
	Tyr103His [29]	1		Asn806Asn
	Tyr41_	2		Phe595Cys
	Tyr41Phe	1		
	Tyr95Ser	6		
	Val109Gly	4		Asn806Asn
	Val125Phe	1		
	Val131Gly [17]	5		
	Val139Ala [17,21,29]	4		1 Asn806Asn
	Val139Leu [21,27]	1		Asn806Asn
	Val155Met	3		
	Val157Gly	1		
Mutaciones sinónimas	Ala79Ala	2	Arg212Arg	
	Glu181Glu	1		Lys564Asn

	Gly75Gly	6		
	Thr167Thr	1		

Tabla 8. Origen y año de obtención de secuencias de los genomas de la base de datos

Código	Origen	N° de cepas	Año
HO-099	Hospitales lima	4	2003-2005
LE-001	Centros de salud Lima Este	34	2003-2005
LN-055	Centros de salud Lima Norte	39	2003-2005
MFR-001	Lima en general	97	2008-2009
MK-0024	Callao	138	2012
MOP-001	Lima en general	164	2012-2013
PAR-044	Diferentes centros de Lima	8	2005
SLM100	Lima en general	103	2007
SRO-017	C.S. Ollantay	14	2009
TAN-036	Diferentes centros de Lima	489	2014-2016
TPI-235	Lima en general	3	2007
CA001M	Callao	1123	2006-2012
LS001M_1	Lima Sur	69	2007-2012
CSV10399	Ventanilla	9	2003-2004
MDRDM1027	Hospital 2 de Mayo	9	1999-2002
MDRMA1565	Hospital Maria Auxiliadora	10	1999-2001
ME1473	Muestra Especial	1	2000
TBDM1057	Hospital 2 de Mayo	18	2003-2016

TBV4766	Ventanilla	6	2002-2006
LI2003209	Lima Sur	1132	2009-2011
Total		3470	