



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“BÚSQUEDA DE GENES
RELACIONADOS A VÍAS ALTERNAS
DE LA RESISTENCIA A
PIRAZINAMIDA EN CEPAS CLÍNICAS
DE *Mycobacterium tuberculosis*
MEDIANTE TRANSCRIPTÓMICA
(RNASEQ)”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

JEN JHANINA CAMPOS TINEO

LIMA – PERÚ

2022

ASESOR

PhD. Patricia Sheen Cortavarría.

JURADO DE TESIS

DR. JORGE ENRIQUE RODRIGUEZ BAILON

PRESIDENTE

DR. PABLO TSUKAYAMA CISNEROS

VOCAL

MG. JUAN CARLOS AGAPITO PANTA

SECRETARIO (A)

DEDICATORIA.

Dedicado a Dios que ilumina cada uno de mis pasos, a mi mamá por todo su esfuerzo, amor y apoyo incondicional y a mi papá por sus enseñanzas, fortaleza y valentía transmitida. A todos ellos que merecen toda mi admiración y son mucho más que mi motivación.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a Dios por su guía y sabiduría en cada momento, a mis amados padres Paulina Tineo y Miguel Campos, por cada uno de sus consejos, por su dirección, dedicación, apoyo, fortaleza y valentía enseñada, porque con sus acciones me enseñaron lecciones de vida invaluable. A mi mamá por todo su amor y ayuda más sincera y a mi papá por sus sabias palabras.

A los amigos auténticos y de gran valor que con sus consejos me alentaron a proseguir, por la confianza brindada y por su apoyo sincero.

A la doctora Patricia Sheen y el doctor Mirko Zimic, que me dieron la oportunidad de desarrollar investigación en el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) y la oportunidad de aprender junto a un grupo multidisciplinario, así como por sus enseñanzas.

Al programa de financiamiento mediado por Concytec (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú) - Fondecyt (Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación) – PROCIENCIA a través del Grupo Banco Mundial, que permitieron que este proyecto concrete en los resultados hallados.

Y a todas las personas que me ayudaron y me mostraron su afecto y buenos deseos.

Muchas gracias a todos.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

El presente trabajo de investigación fue financiado por Concytec (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú) - Fondecyt (Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación) – PROCENCIA a través del Grupo Banco Mundial, en el marco de la convocatoria Proyecto EQUIPAMIENTO CIENTIFICO 2018-01, E044-2018-01-BM. Contrato N° 003-2018-FONDECYT/BM.

BÚSQUEDA DE GENES RELACIONADOS A VÍAS ALTERNAS DE LA RESISTENCIA A PIRAZINAMIDA EN CEPAS CLÍNICAS DE *Mycobacterium tuberculosis* MEDIANTE TRANSCRIPTÓMICA (RNASEQ)

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|---|--|-----|
| 1 | www.frontiersin.org Fuente de Internet | 1% |
| 2 | repositorio.uni.edu.pe Fuente de Internet | <1% |
| 3 | open.uct.ac.za Fuente de Internet | <1% |
| 4 | repository.nwu.ac.za Fuente de Internet | <1% |
| 5 | d-nb.info Fuente de Internet | <1% |
| 6 | Christoph Grohmann, Danushka S. Marapana, Gregor Ebert. "Targeted protein degradation at the host-pathogen interface", <i>Molecular Microbiology</i> , 2021 Publicación | <1% |
| 7 | thesesups.ups-tlse.fr Fuente de Internet | |

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

| | | |
|---------|--|----|
| I. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. | PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN | 5 |
| 2.1 | Planteamiento del problema | 5 |
| III. | MARCO TEÓRICO | 7 |
| 3.1 | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 7 |
| 3.2 | Tuberculosis | 7 |
| 3.3 | Epidemiología | 8 |
| 3.4 | Patología | 9 |
| 3.5 | Drogas contra tuberculosis | 9 |
| 3.6 | Pirazinamida | 10 |
| 3.6.1 | Nicotinamidasas/pirazinamidasas | 11 |
| 3.6.2 | Mecanismo de acción de PZA | 12 |
| 3.6.3 | Resistencia a PZA | 12 |
| 3.6.4 | Mecanismos alternos | 13 |
| 3.6.4.1 | Bombas de eflujo | 13 |
| 3.6.4.2 | Target de POA | 14 |
| 3.7 | Transcriptómica – RNAseq | 16 |
| IV. | JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO | 19 |
| V. | HIPÓTESIS | 21 |
| VI. | OBJETIVOS | 22 |
| 6.1 | Objetivo General | 22 |
| 6.2 | Objetivos Específicos | 22 |
| VII. | METODOLOGÍA | 23 |
| 7.1 | Diseño del estudio | 23 |
| 7.2 | Material biológico | 24 |
| 7.3 | Procedimiento experimental | 25 |
| 7.3.1 | Caracterización de cepas en estudio | 25 |
| 7.3.1.1 | Verificación de POA extracelular (Prueba Wayne convencional) | 25 |
| 7.3.1.2 | Cuantificación de POA extracelular (Wayne cuantitativo) | 25 |

| | | |
|---------|---|----|
| 7.3.1.3 | Determinación de susceptibilidad mediante MGIT 960. | 27 |
| 7.3.1.4 | Amplificación y verificación de mutaciones en el gen <i>pncA</i> y promotor. | 28 |
| 7.3.2 | Condiciones de cultivo para expresión de genes (RNA-seq). | 29 |
| 7.3.2.1 | Extracción de ARN total. | 30 |
| 7.3.2.2 | Caracterización de muestras de ARN total. | 30 |
| 7.3.3 | Secuenciamiento de siguiente generación (NGS), RNA-seq | 32 |
| 7.3.3.1 | Preparación de librerías y secuenciamiento. | 32 |
| 7.3.4 | Análisis bioinformático | 33 |
| 7.3.4.1 | Control de calidad del secuenciamiento | 34 |
| 7.3.4.2 | Mapeo de secuencias con el genoma de referencia. | 34 |
| 7.3.4.3 | Cuantificación de expresión diferencial | 35 |
| 7.3.4.4 | Evaluación de vías metabólicas, Gene Ontology (GO-seq) | 36 |
| VIII. | RESULTADOS..... | 37 |
| 8.1 | Caracterización de cepas en estudio. | 37 |
| 8.1.1 | Verificación de POA extracelular (Wayne convencional). | 37 |
| 8.1.2 | Cuantificación de POA extracelular de POA (Wayne cuantitativo). | 38 |
| 8.1.3 | Determinación de susceptibilidad mediante MGIT 960. | 42 |
| 8.1.4 | Amplificación y verificación de mutación en el gen <i>pncA</i> y promotor... .. | 42 |
| 8.2 | Condiciones de cultivo para expresión de genes (RNA-seq). | 44 |
| 8.2.1 | Extracción de ARN total. | 44 |
| 8.2.2 | Caracterización de ARN total | 47 |
| 8.3 | Secuenciamiento de siguiente generación (NGS), RNA-seq. | 48 |
| 8.3.1 | Preparación y obtención de librerías..... | 48 |
| 8.4 | Análisis bioinformático | 48 |
| 8.4.1 | Control de calidad de secuenciamiento | 48 |
| 8.4.2 | Análisis de dispersión de datos..... | 50 |
| 8.5 | Cuantificación de expresión diferencial | 50 |
| 8.5.1 | Evaluación de datos (PCA)..... | 50 |
| 8.5.2 | Evaluación de expresión diferencial de genes | 53 |
| 8.5.2.1 | Expresión diferencial de genes. | 53 |
| 8.5.2.2 | Genes con expresión diferencial (DEGs)..... | 55 |
| 8.5.2.3 | Comparación de DEGs entre cepas..... | 62 |
| 8.5.3 | Análisis de enriquecimiento de vías | 63 |
| IX. | DISCUSIÓN..... | 72 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| X. CONCLUSIONES..... | 85 |
| XI. RECOMENDACIONES | 87 |
| XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 89 |
| XIII. ANEXOS | |

RESUMEN

El aumento de casos de resistencia y el reducido hallazgo de nuevas drogas han limitado el avance en las estrategias de control terapéutico contra tuberculosis (TB). Pirazinamida (PZA), droga de primera línea tiene capacidad de eliminar micobacterias latentes y está incluida en los nuevos regímenes del tratamiento contra TB. A pesar de su importancia, el mecanismo de acción de PZA aún no es claro. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) resistente a PZA está asociado a mutaciones en el gen *pncA* que afectan la actividad de PZAsa. Actualmente han sido reportadas cepas resistentes a PZA, *pncA* wild-type, sugiriéndose la posibilidad de mecanismos de resistencia alterna. Este trabajo tiene como objetivo hallar genes potencialmente involucrados a resistencia alterna a PZA, a través de la evaluación del transcriptoma completo de H37Rv-WT y de 3 aislados clínicos resistentes a PZA, secuenciados mediante NextSeq550, Illumina. Los resultados evidenciaron cambios transcripcionales por PZA en las cepas *pncA* funcional, sugiriéndose una acción transcripcional mediado por POA. Este trabajo constituye un importante hallazgo en la exploración de genes involucrados en el mecanismo alterno de resistencia a PZA. Entre los principales genes con posible función biológica en resistencia alterna a PZA están genes del metabolismo de lípidos, proteínas reguladoras de metales, reguladores transcripcionales y bombas de eflujo.

Palabras claves: RNA-seq, genes, expresión diferencial, resistencia, pirazinamida (PZA), ácido pirazinoico (POA), *Mycobacterium tuberculosis* (MTB).

ABSTRACT

The increase in cases of resistance and the reduced discovery of new drugs have limited progress in therapeutic control strategies against tuberculosis (TB). The first-line drug PZA has the ability to eliminate latent mycobacteria and is included in new TB treatment regimens. Despite its importance, the mechanism of action of PZA is still unclear. PZA-resistant MTB is associated with mutations in the *pncA* gene that affect PZAse activity. Currently, strains resistant to PZA, *pncA* wild-type, have been reported, suggesting the possibility of alternative resistance mechanisms. This work aims to find genes potentially related to alternate resistance to PZA, through the evaluation of the complete transcriptome of MTB-H37RV and 3 strains resistant to PZA, sequenced by NextSeq550, Illumina. The results evidenced transcriptional changes by PZA in the functional *pncA* strains, suggesting a transcriptional action mediated by POA. This work constitutes an important finding in the exploration of genes involved in the alternative mechanism of resistance to PZA. Among the main genes with a possible relationship to alternative resistance to PZA are lipid metabolism genes, metal regulatory proteins, transcriptional regulators, and efflux pumps.

Keywords: RNA-seq, genes, differential expression, resistance, pyrazinamide (PZA), pyrazinoic acid (POA), *Mycobacterium tuberculosis* (MTB).

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad transmitida vía aérea originada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Según el Organismo Mundial de la Salud (OMS) 1.7 mil millones de personas (aproximadamente la cuarta de la población mundial) estarían infectadas y con riesgo de desarrollar TB (World Health Organization, 2019). MTB fue aislado por primera vez en 1882 por Robert Koch (Barberis, Bragazzi, Galluzzo, & Martini, 2017); controlándose por fármacos recién a partir de 1943 con la aparición de estreptomycin seguido de otras drogas como isoniacida (INH) en 1951, pirazinamida (PZA) en 1952, rifampicina (RIF) en 1957 y etambutol (EMB) en 1962. Posteriormente el uso inadecuado de los fármacos generó los primeros casos de resistencia, seguido de casos de MTB multidrogoresistente (MTB-MDR) o resistentes a isoniacida y rifampicina (Keshavjee & Farmer, 2012).

MTB puede adaptarse a diferentes entornos dentro del hospedero, así en fase activa se desarrolla bajo un entorno con disposición de nutrientes, pH neutro y ambiente aerobio; mientras MTB en fase latente se desarrolla en entornos de bajos nutrientes, pH ácido y anaerobiosis como el hallado en las vacuolas de los macrófagos o en los granulomas. (Lee, 2016). Cabe recalcar que MTB tiene la capacidad de mantenerse en estado latente durante largos periodos de tiempo, representando un reservorio importante de la enfermedad (P. Ling, J. Flynn, 2012).

La mayoría de fármacos eliminan a MTB en estado activo, mientras PZA es la principal droga con efecto bactericida sobre bacilos latentes, capaz de actuar en

entornos ácidos. Pese a la importancia de esta droga el mecanismo de acción de PZA aún no ha sido explicada a profundidad.

Actualmente el mecanismo de acción de PZA propuesto por Zhang exige un entorno ácido que permita la protonación del ácido pirazinoico (POA), molécula expulsada al medio externo por bombas de eflujo desconocidas y generada dentro de MTB tras la acción catalítica de pirazinamidasa (PZAsa) sobre PZA. La protonación de POA en el medio externo ácido le permite reingresar a la célula por difusión pasiva, una vez dentro libera el protón ganado pasando a su forma aniónica para salir nuevamente de la célula. Sucesivos reingresos de POA genera una acidificación del medio intracelular de la bacteria el cual se cree es la causa de la acción bactericida de PZA (Ying Zhang, Shi, Zhang, & Mitchison, 2013). La resistencia a PZA es causada por ciertas mutaciones en *pncA*, gen que codifica a la enzima PZAsa alterando su actividad enzimática y los niveles de POA generados, así también por mutaciones en la región promotora del gen *pncA* (Cheng, Thibert, Sanchez, Heifets, & Zhang, 2000) (Ramirez-Busby & Valafar, 2015) (Khan et al., 2019).

El modelo actual de PZA no explica el rol que cumple POA dentro de la célula además de la conocida acidez intracelular; tampoco explica los casos de resistencia a PZA en cepas con gen *pncA* wild type (WT) o PZAsa funcional, sugiriéndose probables mecanismos alternos (Ying Zhang & Mitchison, 2003) (Miyagi, Yamane, Yogesh, Ano, & Takashima, 2004) (Singh et al., 2006) (Gene-mutated, Werngren, Alm, & Mansjö, 2017). En la actualidad se han postulado varias moléculas como posibles blancos de POA, así como probables bombas de eflujo que expliquen los

casos de resistencia a PZA en cepas con *pncA* WT o *pncA* mutantes con actividad enzimática funcional (Yumeng Zhang, Zhang, Cui, Zhang, & Zhang, 2017a).

Entre los candidatos a blancos de POA están: RpsA, proteína involucrada en el proceso conocido como trans-traslación, mediante el rescate de ribosomas en bacterias no replicativas (W. Shi et al., 2011); FAS-I, involucrada en la síntesis de ácidos grasos (Zimhony, Cox, Welch, Vilchèze, & Jacobs, 2000); PanD, enzima de la ruta de síntesis de acetyl-CoA (W. Shi et al., 2014); ClpC1, una proteína encargada de la degradación de proteínas (W. Shi, Chen, Zhang, Zhang, & Zhang, 2018), Rv2783, enzima bifuncional con afinidad a POA (Njire et al., 2017a), LprG entre otros (W. Shi et al., 2018). A pesar de estos hallazgos las investigaciones continúan, actualmente los estudios más informativos son los generados con tecnología de secuenciación masiva de siguiente generación "Next Generation Sequencing" (NGS), la cual además de brindar información global y completo del genoma, es rápida, altamente exacta y robusta. Hasta la fecha, sin embargo no se ha podido concluir la existencia de blancos de PZA, pero los estudios recientes vislumbran la probabilidad de una ruta alterna de resistencia a PZA, siendo más estudios complementarios necesarios.

En este estudio se trabajaron con 4 cepas, la cepa sensible H37Rv-wild type (H37Rv-WT), la cepa resistente H37Rv-*pncA*_Knock-out (H37Rv-*pncAKO*), y las cepas clínicas resistentes a PZA seleccionadas TBCON464-C9 *pncA*_V125F y SLM059-C1 *pncA*_A102V. Es importante mencionar que las mutaciones V125F y A102V mostraron, en ensayos previos de proteínas recombinantes, actividad enzimática de 80% a 100% respecto a la PZAsa-WT. De esta manera las actividades enzimáticas fueron en PZAsa-WT 27.7 $\mu\text{mol POA /min x mg PZAsa}$ (+/- 3.9), en

PZAsa-V125F 20.45 $\mu\text{mol POA /min x mgPZAsa}$ (± 1.96) (Quispe Hualpa, 2018) y en PZAsa-A102V 34.32 $\mu\text{mol POA /min x mg PZAsa}$ con rango intercuartil (4.45) (Dato no publicado). Este trabajo exploratorio tiene como objetivo a partir de un análisis comparativos de perfiles transcriptómicos, una búsqueda global de genes transcritos ante la exposición a la concentración mínima inhibitoria (MIC) de 50 $\mu\text{g/ml}$ de PZA en el caso de la cepa sensible H37RV-WT y de 100 $\mu\text{g/ml}$ de PZA en cepas resistentes, para identificar posibles genes candidatos con expresión diferencial involucrados a resistencia a PZA, en una vía alterna, por inferencia de sus roles biológicos dentro de las células resistentes ante la exposición de PZA.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Planteamiento del problema

La tuberculosis (TB) está catalogada según el OMS como una de las 13 principales causas de muerte a nivel mundial (World Health Organization, 2021), pese a que su descubrimiento fue aproximadamente hace 140 años la TB no ha sido controlada en su totalidad. Entre sus principales problemáticas están la aparición progresiva de cepas resistentes. En los últimos años Perú se encuentra posicionada como uno de los 30 países con mayor incidencia en casos de TB-multidrogo resistente (MDR) (World Health Organization, 2019). En 2016, un estudio reveló asociación significativa entre resistencia a rifampicina (RIF) y resistencia a PZA, a pesar de ello PZA aún sería efectiva en un 19% a 63% de pacientes con resistencia a RIF, ratificando nuevamente la importancia de PZA en casos de resistencia en los esquemas terapéuticos (Zignol et al., 2016). PZA en la actualidad esta prescrita no solo en los casos de MTB sensibles sino también está incluida en los nuevos regímenes (fase II y III) del tratamiento contra TB-MDR y TB-susceptible (World Health Organization, 2019). TB en fase latente es otra problemática de esta patología, debido a su difícil diagnóstico supone un riesgo potencial en la progresión de TB de fase latente hacia fase activa, principalmente en casos de reinfección o recaídas de pacientes curados. Aunque la terapia contra TB está basada en drogas de primera línea (isoniacida, INH; rifampicina, RIF; etambutol, EMB y PZA) y drogas de segunda línea, éstas no han sido suficientes para contener la diseminación de esta enfermedad particularmente en lo referido a casos de resistencia.

Dada la importancia de PZA no solo como principal droga con efecto bactericida sobre bacilos latentes, sino también en los diversos esquemas profilácticos, así como en el acortamiento de la terapia contra tuberculosis de 12 a 6 meses (Johnson et al., 2006). Surge la necesidad de realizar más estudios exploratorios en MTB que permitan conocer la magnitud y complejidad de su interacción con PZA, con la finalidad de identificar posibles genes candidatos involucrados a resistencia a PZA, vía alterna, permitiéndonos inferir un posible rol biológico determinante de estos genes en la patología de resistencia a PZA.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (MTB) es una bacteria del *Phylum Actinobacteria*, *Género Mycobacterium*, clasificado por estudios de 16S ARN ribosomal como gram positivos y desde la perspectiva genómica relacionado a las gram negativas (Fu & Fu-Liu, 2002). Caracterizada por un alto contenido de GC (60%) en su genoma, crecimiento lento (2 a 3 semanas) con un tiempo de generación *in vitro* de aproximadamente 20 horas y una pared celular compleja compuesta por una membrana plasmática, espacio periplásmico, peptidoglucano, arabinogalactano, ácidos micólicos (capa interna) y lípidos externos (capa externa) que actúa como una barrera impermeable a algunas drogas y contribuye a su virulencia. (Delogu, Sali, & Fadda, 2013). MTB posee un ADN genómico de 4,411 529 pares de base (bp) con 3,924 marcos de lectura identificados de los cuales el 40% tienen funciones asignadas y 44% con funciones probables y 16% de genes huérfanos (Saunders & Mcfadden, 2003).

3.2 Tuberculosis

Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa de transmisión aérea, originado por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) que afecta principalmente los pulmones, pero puede afectar también otras partes del cuerpo. TB puede clasificarse en 2 estados de infección: 1) TB latente o no transmisible, caracterizada por ser asintomática y de difícil diagnóstico; y 2) TB infección activa o transmisible, caracterizada por presentar síntomas como fiebre, sudoración nocturna,

disminución de peso, tos, fatiga etc. y para la cual están prescritas las drogas actuales (Pai et al., 2016). Esta enfermedad afecta principalmente regiones de bajos recursos económicos, aunque se estima que 2 mil millones de personas estarían infectados con TB en estado latente con riesgo de progresión a infección activa. (Zumla, Raviglione, Hafner, & Fordham von Reyn, 2013).

3.3 Epidemiología

TB es considerada como una de las 13 principales causas de muerte a nivel mundial (World Health Organization, 2021). Se estima que alrededor de 1.7 mil millones de personas estarían infectadas mientras 1.2 millones de personas fallecieron con esta enfermedad en 2018. Según reportes de OMS aproximadamente 10 millones de personas enferman por año, de los cuales 55% corresponden a hombre, 31% a mujeres y 14% a niños (World Health Organization, 2019). La prevalencia de esta enfermedad puede disminuir controlando algunos factores de riesgo como tabaquismo, diabetes, infección por VIH, desnutrición, exceso de alcohol, entre otros. (World Health Organization, 2019)

En 2001, en Perú se registró alrededor de 32% de cepas MDR también resistentes a PZA (Vásquez-Campos et al., 2004) posicionándose en el puesto décimo quinto de las causas de muerte. La incidencia entre 2011 a 2015 de TB mostró un lento descenso alrededor de 2% por año. En el Perú el control de esta enfermedad está estipulada bajo la Ley 30287, que declara la lucha contra la TB de interés nacional (Alarcón, Alarcón, Figueroa, & Mendoza-Ticona, 2017) Según el OMS entre 2016 al 2020 Perú se encuentra entre uno de los países con más carga de casos TB-MDR (World Health Organization, 2019).

3.4 Patología

Los bacilos de MTB tras su ingreso al hospedero a través de la inhalación de aerosoles son reconocidos por células del sistema inmune innato como las células dendríticas y macrófagos, los cuales los internalizan por fagocitosis para combatir la infección. Sin embargo aunque en algunos casos la infección es eliminada en otras la infección se establece desarrollándose como fase activa o latente (Getahun, Matteelli, Chaisson, & Raviglione, 2015).

MTB evade los sistemas de defensa del hospedero mediante mecanismos moleculares como el de arresto de maduración de fagosoma que inhibe la formación del fagolisosoma permitiendo la supervivencia de MTB en los macrófagos (Seto, Tsujimura, & Koide, 2011). Así mismo MTB es capaz de adaptarse a diversas condiciones dentro del hospedero y desarrollarse como fase activa bajo condiciones aerobias, pH 7, y con disponibilidad de alimentos; y como fase latente en ambientes con poco oxígeno, pH 6, y con bajos nutrientes (Gupta, Kaul, Tsolaki, Kishore, & Bhakta, 2012). El establecimiento de MTB en el hospedero implica también en algunas casos formación de granulomas ante la falta de una respuesta rápida de eliminación del patógeno por parte del sistema inmune innato ni adaptativa. Los granulomas están conformadas en el centro por macrófagos infectados y no infectados, rodeados por linfocitos T y B, células dendríticas, granulocitos, células endoteliales y fibroblastos; con lo cual la infección queda contenida en forma localizada, evitando su dispersión (Gupta et al., 2012).

3.5 Drogas contra tuberculosis

El tratamiento para contrarrestar TB abarca una serie de fármacos denominados drogas de primera línea como INH, RIF, EMB, y PZA y drogas de segunda línea como fluoroquinolonas, capreomicina, kanamicina, etionamida, ácido para-amino-salicílico, cicloserina, macrolides, clofazimina, este último grupo administrado en casos de MTB resistentes (Palomino & Martin, 2014). Dentro de las drogas mencionadas cabe destacar la acción relevante de PZA, principal droga con acción bactericida que actúa sobre bacilos latentes en entornos ácidos. El tratamiento en casos MTB sensibles actualmente consta de 6 meses de un esquema multidroga y de 9 a 20 meses en los casos de MTB resistentes a drogas (World Health Organization, 2019).

3.6 Pirazinamida

Pirazinamida (PZA) es una pro-droga análoga a nicotinamida que se transforma a su forma activa por acción del gen *pncA*, mutaciones en este gen y su promotor están relacionados a su resistencia. Su empleo dentro del tratamiento permite una reducción de tiempo de profilaxis de 11 a 6 meses (Palomino & Martin, 2014). PZA es la principal droga con capacidad de inhibición de bacilos dormantes, su acción requiere ambientes ácidos, por lo que puede actuar en entornos con esta condición característicos de esta patología (Lohrasbi et al., 2018). Es importante señalar sin embargo que un reciente estudio empleando MGIT, actual Gold Standard para determinación de resistencia, registró que PZA también tiene acción sobre bacilos a pH neutro siempre que el crecimiento se ejecute a bajas temperaturas (28°C) (den Hertog et al., 2016).

Actualmente PZA además ser una de las drogas de primera línea, está incluida en los esquemas de tratamiento para casos de MTB-resistentes (World Health Organization, 2019). MTB registra una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 16-100 $\mu\text{g/ml}$, mientras la dosis diaria en el tratamiento asciende entre 30 a 40 mg/ml por día (Lohrasbi et al., 2018).

3.6.1 Nicotinamidasas/pirazinamidasas

Nicotinamidasas/pirazinamidasas (EC 3.5.1.19) es una amidohidrolasa que cataliza nicotinamida o su análogo PZA y los transforma respectivamente en ácido nicotínico o ácido pirazinoico (POA), moléculas empleadas en la generación y homeostasis de NAD^+ (Cabanes & Takami, 2017). Esta enzima está presente en algunos microorganismos como MTB donde juega un rol muy importante en la vía de salvataje del nicotinato, observándose una sobreexpresión de genes de esta vía en condiciones de hipoxia (H. I. M. Boshoff et al., 2008).

La caracterización enzimática de la recombinante PZAsa-WT MTB mostró una actividad enzimática de 38.4 $\mu\text{mol POA/min.mg PZAsa}$ IQR (rango intercuartil) 18.36. Cabe resaltar que los parámetros cinéticos de las nicotinamidasas recombinantes mutantes varían ampliamente en referencia a los valores registrados para la recombinante PZAsa WT, dependiendo de la mutación asociada a sus aminoácidos (aa.) (Sheen et al., 2009).

PZAsa funciona con un cofactor metálico que varía dependiendo de la especie, en MTB este cofactor es Fe^{+2} , el cual coordina con los aa. Asp49, His51, His57 e His71. El sitio activo o centro catalítico por su parte abarca los siguientes

aminoácidos Cys138, Asp8 y Lys96. Mutaciones en estas 2 zonas están relacionados a resistencia a PZA (Petrella et al., 2011).

3.6.2 Mecanismo de acción de PZA

El mecanismo de acción de PZA es explicada parcialmente por el modelo de Zhang. Así tras el ingreso de PZA a MTB por difusión pasiva, ésta pro-droga es convertida por PZAsa a ácido pirazinoico (POA-), molécula que es emanada al medio externo por probables bombas de eflujo donde debido a un entorno ácido pasa a su forma protonada (HPOA), este evento permite su reingreso a la célula, donde libera el protón ganado del medio externo. Este proceso recirculante se repite sucesivamente generando acumulación de protones, acidificando el citoplasma de MTB y generando disrupción de la membrana, los que se cree que serían la causa de la acción bactericida de PZA (Ying Zhang et al., 2013).

Cabe mencionar que además del ingreso de PZA a MBT por difusión pasiva, una proteína de transporte dependiente de ATP también estaría involucradas en la toma de PZA (Raynaud et al., 1999).

3.6.3 Resistencia a PZA

Actualmente la principal causa relacionada a resistencia a PZA son ciertas mutaciones en el gen *pncA*, que codifica a PZAsa, las cuales alteran total o parcialmente su actividad enzimática. Ciertas mutaciones en las región promotora también estarían relacionadas a resistencia a PZA (Ramirez-Busby & Valafar, 2015). Por otra parte un bajo eflujo de POA también ha sido relacionado con

resistencia a PZA tanto en cepas con actividad enzimática como en cepas con mutaciones en el gen *pncA* con actividad enzimática afectada (Zimic et al., 2012).

Cabe resaltar que la resistencia a PZA varía dependiendo de la especie, así MTB es sensible a PZA mientras especies como *M. bovis* o *M. kansasii* son resistentes naturales a esta droga. (Raynaud et al., 1999).

3.6.4 Mecanismo alternos

El mecanismo actual no explica el rol que cumple el POA dentro de la célula, además de la acidez intracelular; tampoco explica los casos de resistencia a PZA en cepas con gen *pncA* wild type, donde su actividad enzimática no es afectada, sugiriéndose casos de probables mecanismos alternos. (Werngren, Alm, & Mansjö, 2017) (Singh et al., 2006). Así también se ha observado cepas con discrepancia en la resistencia a PZA con y sin mutaciones en el gen *pncA* con actividad enzimática (Ramirez-Busby & Valafar, 2015).

3.6.4.1 Bombas de eflujo

Estudios recientes han presentado como posibles bombas de eflujo a Rv1901, Rv3756c, Rv3008, Rv1667c las cuales han sido exclusivamente relacionados a resistencia a PZA y consideradas como posibles candidatos blancos de POA/PZA al evaluar la unión de éstos a POA. (Yumeng Zhang, Zhang, Cui, Zhang, & Zhang, 2017b). Actualmente otras bombas de eflujo relacionadas a resistencia a drogas, así como proteínas asociadas siguen en estudio como la lipoproteína LprG Rv1411, la proteína de eflujo Rv1410, Cyp128 proteína citocromo 450, Rv0521, entre otros

(W. Shi et al., 2018); también han sido asociadas a multidrogoresistencia las proteínas Rv1218c-Rv1217c (K. Wang et al., 2013).

3.6.4.2 Target de POA

Actualmente se han postulados varias moléculas como posibles blancos de POA, entre los que están RpsA; postulado que surgió tras hallar cepas resistentes a PZA sin mutaciones en *pncA*, con mutaciones en *rpsA* y verificar afinidad entre RpsA y POA; tras estos resultados se sugirió que POA estaría inhibiendo la función de “trans-translation” de RpsA, proceso biológico necesario para la supervivencia de bacterias no replicantes o latentes, siendo este un probable mecanismo de acción bactericida de PZA sobre los bacilos no replicativos (Shi Wanliang, Zhang Xuelian, Jiang Xin, Ruan Haiming, Barry Clifton, Wang Honghai, 2012). 5 años después se refutaría esta conclusión al no hallar evidencia de la afinidad entre POA y la molécula de RpsA, sugiriéndose mayor investigación (Dillon, Peterson, Feaga, Keiler, & Baughn, 2017).

Otra molécula postulada como posible blanco de POA es FAS-I al verificarse una reducción en la biosíntesis de ácidos grasos de 16 a 26 carbonos marcados con C¹⁴[acetato] en cultivos de MTB tratados con 5-Cl-PZA, POA y PZA en comparación con cultivos control (ausentes de drogas). Estos resultados solo se evidenciaron a partir de cultivos a pH 6 y no a pH 6.8 y en MTB susceptibles a PZA y no en cepas resistentes a PZA. Siendo FAS-I la enzima responsable de la síntesis de ácidos grasos de 16 carbonos a partir de acetyl-CoA, con capacidad de elongarlos hasta cadenas de 24 a 26 carbonos (Zimhony et al., 2000). A pesar de estos

resultados en 2002 Boshoff demuestra que solo existe inhibición de FAS-I por parte de 5-Cl-PZA, sobre la síntesis de ácidos grasos, pero no por parte de POA, ni por PZA, concluyendo que FAS-I no es target directo de PZA (H. I. Boshoff, Mizrahi, & Barry, 2002).

Aspartato alfa-descarboxilasa (PanD), enzima involucrada en la síntesis de b-alanina la cual es precursor de pantotenato y Coenzima A (CoA), es otra de las moléculas referidas como posible blanco de PZA. CoA con estructura molecular similar a NAD y FAD, funciona como transportador del grupo acetyl en la síntesis y oxidación de ácidos grasos, y oxidación de piruvato en el ciclo de ácido tricarbóxico para la generación de ATP (S. Zhang et al., 2013). Un estudio de ADN genoma completo, mediante NGS-Illumina Hi-Seq2000, reportó mutaciones en el gen *panD*, en cepas mutantes resistentes a PZA provenientes de H37Rv-WT sin mutaciones el gen *pncA*, ni *rpsA*, relacionándose la resistencia a PZA a las mutaciones halladas en PanD; sin embargo otras mutantes carente de mutaciones en *pncA*, *rpsA* y *panD* resistentes a PZA también fueron halladas, siendo otros genes no identificados la posible causa de resistencia a PZA, sugiriéndose más investigación (S. Zhang et al., 2013). Un estudio posterior demuestra la inhibición de la actividad del aspartato descarboxilasa en presencia de POA (W. Shi et al., 2014). Ese mismo año en 2014, Dillon y colaboradores demuestran que pantoteína y pantotenato antagonizan la actividad de PZA en MTB, y que la inhibición por PZA en cepas *panD* delecionadas sugiere que *panD* no es blanco principal de PZA (Dillon, Peterson, Rosen, & Baughn, 2014).

Recientemente se postuló a Clpc1 como otro posible target de POA al hallarse cepas resistentes a PZA con mutaciones en el gen *clpc1*, sin mutaciones en los genes *pncA*,

rpsA y *panD*. Así mismo se reportó que ClpC1 es target de 3 drogas, éstas son ciclomarina A, lasomicina y ecumicina. En este mismo estudio se demostró que la sobreexpresión del gen *clpC1* en cepas electroporadas con el vector clonado de *cplC1* y su control (vector sin gen *clpC1*), generaron niveles de susceptibilidad similar y no mayor de MIC de 50 µg/ml de PZA, no corroborándose como causa de resistencia a PZA a la sobreexpresión del gen *clpC1* (S. Zhang et al., 2017).

Una de las últimas moléculas postuladas como probable target a POA es Rv2783, tras hallarse en algunas cepas clínicas resistentes a PZA la mutación G199A, que codifica la sustitución D67N. Para verificar afinidad entre Rv2783 WT y Rv2783_D67N mutante, PZA y POA, se utilizó la técnica isothermal titration calorimetry (ITC), hallándose afinidad solo entre Rv2783 wild type con POA y no con PZA y ninguna afinidad entre Rv2783_D67N mutante ni con POA ni con PZA. A estos hallazgos se adicionó los datos de susceptibilidad de PZA medidos mediante Bactec-MGIT 960 de la recombinantes MTB H37Rv *rv2783c* WT, y MTB H37Rv *rv2783c_D67N* mutante, hallándose susceptibilidad de MIC 150 µg/ml y resistencia de MIC 500 µg/ml respectivamente (Njire et al., 2017b).

3.7 Transcriptómica – RNAseq

En los últimos años una de las técnicas empleadas para estudios transcriptómico de genoma completo ha sido NGS-RNA-seq, esta tecnología ha permitido entender mecanismos moleculares complejos aún no comprendidos, así como la evaluación de respuesta inducida de genes (Kukurba & Montgomery, 2016).

En MTB uno de los primeros estudios transcriptómicos fue referido al análisis transcriptómico de MTB persistentes empleando D-cicloserina. En este estudio se hallaron genes down-regulated de vías metabólicas y biosíntesis, y genes up-regulated como Rv2667 (*clpc2*), Rv3287c, Rv3286c, Rv2651c, Rv0840c, Rv2662, Rv2666, Rv0792c, Rv0142, Rv0837c, Rv2661c, Rv0849, Rv3370c, Rv2623, Rv1707, entre otros; concluyéndose que un set de genes “core” son inducidos ante estas condiciones. (Keren, Minami, Rubin, & Lewis, 2011) .

Otro trabajo de análisis transcriptómico, tipo RNA-seq evaluó la respuesta *in vitro* de MTB a estrés lisosomal, este trabajo evidenció DEGs relacionados a respuesta a estrés, respiración, estrés oxidativo, virulencia, reprogramación metabólica entre otros como la bomba de eflujo Rv1258c y una respuesta exclusiva a estrés lisosomal bajo el sistema toxina-antitoxina del grupo de proteínas VapBC (Lin et al., 2016).

Por otra parte también se han evaluado transcripcionalmente MTB en exposición a drogas a partir de muestras de esputo de pacientes bajo tratamiento de esquema sensible, los resultados mostraron genes down-regulated en función a crecimiento, síntesis de lípidos y metabolismo; y genes up-regulated referidos a respuesta a estrés, factor sigma, factores de transcripción, genes toxin -antitoxin y bombas de eflujo (Walter et al., 2015).

Así mismo otro estudio usando RNA-seq evaluó aislados clínicos “extensively drug resistant” para investigar el mecanismo de resistencia de etionamida; identificando mutaciones en el promotor del gen *ethA* como la causa de la reducción en la expresión de la monooxigenasa (EthA), enzima que cataliza etionamida (De Welzen et al., 2017).

Recientemente otro trabajo relacionado a análisis transcriptómico evaluó la respuesta de 2 cepas clínicas MDR y la cepa H37Rv con la finalidad de observar diferencias a nivel de expresión de genes. Los resultados evidenciaron en las cepas clínicas MDR enriqueciendo en biosíntesis de arginina, biosíntesis de ácidos grasos, y vías metabólicas, así mismo se registró represión de los genes del sistemas de secreción tipo IV e inducción de genes involucrados con respuesta a estrés (Tang, Liu, Shi, Zhan, & Qin, 2020).

En los últimos años los trabajos transcriptómicos en respuesta a antibióticos en MTB, han incrementado con la finalidad de conocer nuevos genes blancos para los tratamientos contra TB (Briffotiaux, Liu, & Gicquel, 2019), sin embargo a pesar que los trabajos de investigación de tipo NGS RNA-seq son más frecuentes, escasos son los asociados a respuesta a PZA. Siendo este uno de los trabajos pioneros transcriptómicos tipo RNA-seq, referido a resistencia a PZA, vía alterna en MTB.

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Hasta el momento no existe droga que sustituya la función de PZA en la contención de bacilos dormantes, usada actualmente para el acortamiento de la terapia en los casos confirmados de tuberculosis de 9 a 6 meses y esta prescrita tanto en casos de cepas sensibles como en cepas TB-MDR (World Health Organization, 2019). Pese a la importancia de PZA, 3 temas aún están en exploración y no han sido esclarecidos hasta la actualidad 1) No existen nuevos genes candidatos como targets terapéuticos, que sustituyan la función de PZA en casos de resistencia a esta droga, 2) Entre 10 y 25% de resistencia a PZA no es explicada por mutaciones en el gen *pncA*, modelo actual; lo que hace suponer la existencia de rutas alternas no vistas hasta el momento (Rodwell et al., 2017), 3) El mecanismo de PZA no es conocido totalmente en la actualidad. Trabajos recientes plantean blancos de POA, y bombas de eflujo como parte del mecanismo de PZA, que podrían explicar los casos de resistencia a PZA en cepas con *pncA* WT sin mutaciones o PZAsa funcional, sin embargo estos requieren aún mayor investigación que consoliden los resultados encontrados hasta el momento (Li et al., 2021).

En los últimos años se han realizados diversos estudios indagando los mecanismos moleculares, interconexión de vías metabólicas, vías alternas, entre otras. Actualmente los estudios más informativos han sido los realizados mediante NGS, dada su exactitud, confiabilidad, rapidez y robustez (De Welzen et al., 2017). En los últimos años los estudios referidos a blancos de POA, y bombas de eflujo se han basado en la mayoría de casos en secuenciamiento genómico, donde mutaciones puntuales han sido la explicación a una probable causa de resistencia a PZA.

Hasta la fecha todos los estudios sugieren mayor investigación y estudios complementarios que afirmen los resultados hallados. Siendo poco los estudios referidos a expresión de genes. Este estudio pretende emplear la tecnología NGS para evaluar la expresión de genes, mediante análisis transcriptómicos RNA-seq de MTB bajo diversas condiciones de crecimiento y en cepas con resistencia no convencional el cual busca identificar probables genes expresados diferencialmente en relación a vías alternas de resistencia a PZA.

En el caso de expresión de genes los trabajos de tipo microarrays y qPCR son informativos post-resultados de amplia data de tipo RNA-seq, involucrando solo un conjunto de genes particulares. En el caso de estudios de tipo exploratorio como el presente, es necesario el uso de técnicas robustas como RNA-seq, que además de generar perfiles transcriptómicos del genoma completo, también muestren un panorama global de los diversos genes co-expresados involucrados en vías metabólicas específicas.

v. HIPÓTESIS

La exposición a PZA en MTB H37Rv-WT y cepas clínicas con resistencia a PZA no convencional (con actividad enzimática *pncA*), promueve DEGs permitiendo mediante análisis transcriptómico la inferencia de posibles genes candidatos involucrados a resistencia a PZA vía alterna.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

- Identificar posibles genes candidatos con expresión diferencial involucrados en una vía alterna a resistencia a PZA en *M. tuberculosis*.

6.2 Objetivos Específicos.

- Caracterizar y seleccionar cepas con fenotipo de resistencia no convencional a PZA.
- Cuantificar, comparar y evaluar la expresión génica de las cepas de referencia sensible H37Rv-WT, resistente H37Rv-pncAKO y las cepas resistentes a PZA seleccionadas, expuestas a presencia y ausencia de PZA bajo los pHs 7 y 6.
- Identificar DEGs como posibles candidatos involucrados en resistencia a PZA vía alterna.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Diseño del estudio.

Este estudio exploratorio está basado en un diseño experimental de enfoque analítico correlacional, cuali-cuantitativo.

Todos los experimentos tuvieron un mínimo de 3 repeticiones biológicas, en tres tiempos distintos. Se consideró tanto un control positivo como un control negativo. Los parámetros de crecimiento fueron determinadas por ensayos de estandarización (Data no mostrada). La concentración de PZA 100ug/ml empleada corresponde a la MIC de PZA para determinar susceptibilidad o resistencia a PZA en MTB; en el caso de H37Rv se empleó 50ug/ml de PZA por ser susceptible a PZA.

Para la identificación de DEGs relacionados a resistencia a PZA en MTB, vía alterna, se seleccionaron 2 cepas clínicas resistentes de características específicas no relacionadas con el modelo actual de resistencia a PZA, y 2 cepas de referencia como controles, MTB H37Rv-WT y MTB H37Rv_ *pncA*-KO. Las cepas fueron cultivadas en 4 condiciones de crecimiento: Condición 1, 250 ml de medio caldo base BD Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado al 10% Oleic Albumin Dextrose Catalase (OADC), 0.05% Tween 80 (7H9-OADC-T) a pH7 con 0 µg/ml PZA; condición 2, 250ml de medio 7H9-OADC-T a pH7 con 100 µg/ml PZA; condición 3, 250ml de medio 7H9-OADC-T a pH 6 con 0 µg/ml PZA; condición 4, 250ml de medio 7H9-OADC-T a pH6 con 100 µg/ml PZA. Los cultivos fueron cosechados y empleados para la extracción de ARN total, preparación de librerías y secuenciamiento NGS. La identificación de DEGs fueron seleccionados del análisis de expresión diferencial (RNA-seq) y fueron evaluadas según su rol biológico.

7.2 Material biológico.

Este estudio se realizó con 4 cepas de MTB: H37Rv-WT sensible como control positivo, MTB H37Rv-*pncAKO* resistente como control negativo, el cual tiene el gen *pncA* bloqueado por inserción del cassette de higromicina (*pncA::hyg*), MTB H37Rv-TBCON464-C9 aislado clínico resistente, clona aislada, MTB H37Rv-SLM059-C1 aislado clínico resistente, clona aislada. Los aislados clínicos tanto como las cepas de referencia fueron obtenidas y seleccionadas del banco de cepas del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular (LBBM), ubicada en los Laboratorios de Desarrollo e Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia LID-UPCH (Tabla 1). Las 2 cepas clínicas seleccionadas, cumplieron con los rasgos requeridos para este estudio y se obtuvieron tras la evaluación de aproximadamente 40 cepas caracterizadas.

Tabla 1. Características de las cepas seleccionadas.

| CEPAS | Característica | Abreviación | Test-Wayne | Susceptibilidad (MGIT 960)** | Mutación puntual en gen <i>pncA</i> , deriva en mutación aa en PZAsa |
|--|-------------------------|----------------------|---------------------------------|------------------------------|--|
| <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Wild type | Control positivo (+) | H37Rv-WT | Positivo | Sensible | Sin mutación |
| <i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>pncA</i> Knock-out * | Control negativo (-) | H37Rv- <i>pncAKO</i> | Negativo | Resistente | gen noqueado, cassette higromicina |
| <i>M. tuberculosis</i> TBCON464 | Cepa de aislado clínico | TBCON464 | Negativo (Un ligero anaranjado) | Resistente | V125F |
| <i>M. tuberculosis</i> SLM059 | Cepa de aislado clínico | SLM059 | Negativo (Un ligero anaranjado) | Resistente | A102V |

(*) *M. tuberculosis* H37Rv *pncA*-Knock-out, fue donada por Helena Boshoff y colaboradores (University of the Witwatersrand Medical School, Johannesburg, South África).

(**) MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) 960

7.3 Procedimiento experimental.

7.3.1 Caracterización de cepas en estudio.

7.3.1.1 Verificación de POA extracelular (Prueba Wayne convencional).

Para la detección de POA extracelular se realizó la prueba Wayne convencional. En un tubo de 15 ml, conteniendo 5ml de medio Agar-Dubos con PZA 100 µg/ml se sembró una asada de MTB obtenida a partir de medio agar 7H10 BD Middlebrook (Difco) suplementado al 5 % OADC. Los tubos fueron incubados durante 14 días a 37°C. Para el revelado se adicionó 1ml de sulfato de amonio ferroso (SAF) al 1%, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se registró la coloración obtenida. El viraje de color de incoloro a rojizo es indicativo de la presencia de POA. Para la obtención de datos se compararon los resultados de las cepas clínicas con los resultados de los controles. Se usaron 3 controles, Control 1 (Blanco de reacción, incoloro): Medio Dubos sin cultivo MTB; control 2 (control positivo, coloración rojiza): Medio Dubos cultivado con la cepa de referencia MTB H37Rv-WT, sensible; control 3 (control negativo, incoloro): Medio Dubos cultivada con la cepa de referencia MTB H37Rv-*pncAKO*, resistente (Wayne, 1974).

7.3.1.2 Cuantificación de POA extracelular (Wayne cuantitativo).

Para la cuantificación de POA extracelular se utilizó el ensayo de Wayne en buffer citrato pH 7.0 (Meinzen et al., 2016) modificado. El ensayo fue realizado en un laboratorio de bioseguridad nivel 3, los procesos fueron realizados dentro de una cabina de flujo laminar clase II. Se resuspendió por vortex en tubos con beads de 2.5 mm de diámetro y 2 ml de buffer citrato pH 7, 3 asadas de cultivo de MTB

cosechadas a partir del medio 7H10 suplementado al 5 % OADC (Difco), se dejó reposar por 15 min, se colectó 100 µl de la suspensión e inoculó a tubos con 5 ml de buffer citrato pH 7, hasta ajustar a una turbidez Mac Farland 4 (1.2×10^9 células).

Inmediatamente se adicionó PZA hasta alcanzar una concentración final de 400 µg/ml. Los cultivos fueron incubados a 37°C por 3 días (un blanco y cultivo de MTB a turbidez Mac Farland 4 sin adición de PZA fueron considerados, el ensayo se realizó por triplicado). Después de la adición de PZA se colectaron de cada tubo alícuotas de 500 µl en los siguientes tiempos: 0, 24, 48 y 72 horas. Las alícuotas previamente homogenizadas fueron colectadas en tubos de 1.5 ml y centrifugadas a 12000 rpm por 15 min. Los sobrenadantes (450 µl) se traspasaron a tubos 1.5 ml y fueron hervidos a 100°C por 30 minutos, las tapas fueron aseguradas para evitar su apertura durante el procesos. Los sobrenadantes de cada muestra se llevaron a 3 pozos de una microplaca (Corning Microplate, 96 wells). Para el revelado de POA se añadió 20 µl de SAF al 10%, el cambio de color fue analizado usando un espectrofotómetro (SPECTRA MAX 190™ ELISA Microplate Reader with SoftMax®) a 450nm.

Para la cuantificación se realizó una curva estándar con POA comercial (Pyrazinocarboxylic, ACROS organics) a las concentraciones 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 mM leídas a 450nm. La curva estándar se ajustó a un modelo de regresión lineal de pendiente (m) 0.1897, intercepto (b) 0.113 y coeficiente de determinación (R²) de 0.9999 (Figura 2), indicando un comportamiento de regresión lineal apropiado, con el cual se determinó las concentraciones de POA (x). La ecuación se basó en el modelo matemático de mínimos cuadrados $y = mx \pm b$.

Donde:

y= Absorbancia leída a 450nm

m= Pendiente de la recta ajustada al modelo .

X= Concentración de la muestra o blanco

b= intercepto, punto de origen en la ordenada.

7.3.1.3 Determinación de susceptibilidad mediante MGIT 960.

Para determinar la susceptibilidad a 100 µg/ml PZA (MIC) de las cepas de MTB.

Se resuspendió por vortex en tubo con 2ml de solución salina tween 0.05% y beads de 2.5 mm de diámetro, 1 asada de cultivo MTB cosechadas a partir del medio Middlebrook 7H10 suplementado al 5 % OADC (Difco). Se reposó durante 20 minutos, se recuperó 1ml del sobrenadante y adicionó a un tubo con 3ml de solución salina hasta ajustar a una turbidez equivalente a 0.5 de la escala de Mac Farland. Adicionar 1 ml del cultivo MTB ajustado a 0.5 escala de Mac Farland a un tubo con 4ml de solución salina para obtener una dilución 1/5. A partir de la dilución 1/5 homogenizada se recuperó 1ml y se adicionó a otro tubo con 9ml de solución salina para obtener una dilución 1/50.

El kit BD BACTEC MGIT™ 960 contempla: 1) 2 tubos MGIT con medio base 7H9 a pH6; 2) Suplemento MGIT: Oleic-Albumine-Dextrose-Catalase; 3) PZA liofilizada equivalente a 20 000 µg.

Para evaluar la susceptibilidad a 100 µg/ml de PZA se empleó y acondicionó el kit BD BACTEC MGIT™ 960; así al Tubo MGIT (control) se adicionó 800 µl de Suplemento MGIT; Tubo MGIT (reacción) se adicionó 800 µl de Suplemento MGIT y 100 µl de PZA (20 000 µg, resuspendido en 2.5 ml de agua MQ estéril). Posteriormente se inocularon en el Tubo MGIT (control) 500 µl de la suspensión

de células MTB dilución 1/50 y en el Tubo MGIT (reacción) 500 µl de la suspensión de células MTB dilución 1/5. Ambos tubos MGIT fueron llevados al equipo BACTEC MGIT™ 960 para ser incubados y leídos. Los resultados en unidades de crecimiento (UC) están relacionados a la fluorescencia emitidos por el consumo de oxígeno detectado en los tubos MGIT control y MGIT reacción por supervivencia o muerte de los bacilos durante la incubación. Los resultados fueron emitidos entre 7 a 10 días después de la incubación en el equipo BD BACTEC MGIT™ 960.

7.3.1.4 Amplificación y verificación de mutaciones en el gen *pncA* y promotor.

Para verificar mutaciones en el gen *pncA* se extrajo ADN genómico mediante el método CTAB (N-cetyl-N,N,N trimethyl ammonium bromide) (De Almeida, Da Silva Carvalho, Rossetti, Costa, & De Miranda, 2013). La amplificación del gen *pncA* mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) se realizó con los primers: Forward P1 5'GTCGGTCATGTTTCGCGATCG3' y Reverse P6 5'GCTTTGCGGCGAGCGCTCCA3' que amplificaron 720 pares de base (pb), incluido 100 pb upstream y 60 pb downstream del gen *pncA*.

La reacción de amplificación se realizó usando Taq DNA Polymerase, recombinant Catalog number:10342053. El ciclo en el termociclador Bio-Rad Thermal Cycler fue 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 45 segundos, y finalmente se concluyó con 72°C por 5 minutos.

Los productos de PCR (50 µl), junto a sus respectivos primers de amplificación a 10 µM fueron enviados a la empresa Psomagen U.S.A. para un servicio de secuenciamiento Sanger, los resultados crudos son emitidos en formato fasta. Para

el análisis bioinformático se usaron la base de datos NCBI, y los software en línea Reverse Complement, Clustal Omega y Expasy.

7.3.2 Condiciones de cultivo para expresión de genes (RNA-seq).

Las cepas H37Rv-WT, H37Rv-*pncA*_KO, cepa clínica TBCON464_C9 y cepa clínica SLM059_C1, procedentes del Banco de cepas del LBBM, fueron reactivadas en placas 7H10 suplementadas al 5% OADC e incubadas durante 20 días a 37°C. Cada cepa se cosechó de placa e incorporó en tubos con beads con 3ml de medio 7H9-OADC, se resuspendió por vortex, se reposó por 15 minutos y se transfirió a un tubo con 15 ml de medio 7H9-OADC usándose como pre-inóculo ($OD_{600} = 0.7$).

Se prepararon 4 matraces de 500 ml con 250 ml de medio 7H9-OADC-T, cada matraz para una condición de cultivo: Condición 1, 250 ml de medio 7H9-OADC-T a pH 7 con 0 $\mu\text{g/ml}$ PZA; condición 2, 250 ml de medio 7H9-OADC-T a pH 7 con 100 $\mu\text{g/ml}$ PZA; condición 3, 250 ml de medio 7H9-OADC-T a pH 6 con 0 $\mu\text{g/ml}$ PZA; condición 4, 250 ml de medio 7H9-OADC-T a pH 6 con 100 $\mu\text{g/ml}$ PZA. Los preinóculos fueron incorporados en diferentes volúmenes a cada matraz dependiendo la condición del cultivo. Todos los matraces correspondientes a 1 misma cepa fueron incubados el mismo día a 37°C, sin agitación, durante 10 días hasta alcanzar un $O.D_{600} = 0.2$, este proceso se realizó para cada cepa. Finalmente los cultivos líquidos de MTB de cada cepa, expuestos a las 4 condiciones de crecimiento fueron cosechados para la extracción de ARN total que se usó para el estudio de expresión de genes mediante la tecnología NGS. Se realizaron 3 réplicas biológicas obteniéndose un total de 48 muestras.

7.3.2.1 Extracción de ARN total.

Los cultivos líquidos de MTB fueron cosechados por centrifugación a 3000 g durante 20 min a 4°C, el sobrenadante se decantó y el concentrado de células se lavó con 25 ml de buffer Tris-HCl 10 mM EDTA 50 mM, (TE) pH 8. Se centrifugó nuevamente a 3000 g por 20 min a 4°C y el concentrado de células fue resuspendido con 1 ml de Trizol Zymo Research. La mezcla con trizol fue transferida a tubos tapa rosca de 2 ml con 400 µl de microbeads (diámetro 0.1 mm). Las células fueron lisadas mediante Fast Prep (MP Biomedicals) con 2 ciclos intercalados y 3 minutos de reposo en hielo. Los microtubos se centrifugaron a 12000 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó, se mezcló con 300ul de cloroformo, se agitó el tubo por 15 segundos, se incubó con cloroformo por 2 minutos a T° ambiente y por 3 minutos en hielo. Finalmente se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y adicionó etanol frio al 100% a un volumen igual que el de la muestra. Para la purificación de ARN total, se empleó el Kit de purificación Direct-Zol™ RNA MiniPrep con tratamiento DNAsa I incorporado en columna. La mezcla anterior inmediatamente se incorporó a la columna para el tratamiento DNAsa I en columna. Los ARN purificados se eluyeron con agua libre de RNAsa Zymo Research. Para la verificación de calidad y pureza de las muestras de ARN total, éstas se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% TBE 1X a 90V durante 40 minutos; el revelado fue por tinción con bromuro de etidio y se midieron los índices de pureza A260/280 y A260/A230 en el espectrofotómetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific).

7.3.2.2 Caracterización de muestras de ARN total.

Los ARN fueron purificados durante el proceso de extracción mediante el Kit de purificación Direct-Zol™ RNA Mini Prep con tratamiento DNAsa I incorporado en columna, posteriormente fueron cuantificados en calidad (IQ), concentración (ng/μl) y ADN de doble cadena (ng/μl). Los ARN totales deben cumplir con los requerimientos de calidad, cantidad y presencia mínima o nula de ADN genómico.

- **Cuantificación de integridad o calidad de ARN**

La calidad de los ARN totales, asociados a la integridad de los ARN ribosomales 23S y 16S fueron medidos mediante el equipo Qubit 4 Fluorometer de Invitrogen. El kit que se empleo fue RNA IQ (integrity & quality) Assay Kit. Este proceso requirió de 1 a 5 μl de muestra conteniendo una cantidad no menor de 500ng a 100ng respectivamente, incorporados en 199 μl o 195 μl de una mezcla “Qubit Working Solution” compuesta de Qubit RNA IQ reagent y Qubit RNA IQ buffer a razón 1/20, respectivamente. Los valores de IQ son de 0 a 10, donde 0 es muy mala calidad y 10 es excelente calidad. Los resultados obtenidos se compararon con los resultados cualitativos obtenidos por electroforesis en gel de agarosa 1.5%, TAE 1X.

- **Cuantificación de cantidad de ADN genómico**

Para cuantificar el ADN genómico presente en las muestra de ARN total extraídas se usó el equipo Qubit 4 Fluorometer de Invitrogen. La cuantificación se realizó mediante el kit 1 dsDNA HS (High Sensitivity).

- **Cuantificación de ARN Total**

Para cuantificar las muestras de ARN total se usó el equipo Qubit 4 Fluorometer de Invitrogen. La cuantificación se realizó según indicaciones en el protocolo del kit RNA High Sensitive Assay.

7.3.3 Secuenciamiento de siguiente generación (NGS), RNA-seq

7.3.3.1 Preparación de librerías y secuenciamiento.

Para la preparación de Librerías se siguió el protocolo de Ribominus™ Transcriptome Isolation Kit (Yeast and Bacteria) y el protocolo de librerías TruSeq Stranded mRNA, Illumina. Se usó de 2ug a 10ug de ARN total contenido en menos de 20 µl de agua libre de ARNsas.

Para la remoción de los ARN ribosomales se acondicionaron por muestra 250 µl de beads del kit Ribominus™ en tubos 1.5 ml y se pusieron en reposo sobre barras magnéticas, el sobrenadante fue eliminado y los tubos fueron removidos de la barra magnética. Luego se resuspendieron los beads con 250 µl de agua libre de ARNsas y fueron colocados nuevamente en la barra magnética, el sobrenadante fue retirado y los beads fueron resuspendidos con 250 µl de Hybridization Buffer (B10). Seguidamente los beads fueron colocados en reposo sobre la barra magnética, el sobrenadante se eliminó y los beads fueron resuspendidos con 100 µl de B10. La resuspensión de beads fue mantenida a 37°C hasta su uso en los siguientes pasos.

Se preparó la mezcla de hibridación; en un tubo 1.5 ml libre de ARNsas se colocó: 2 - 10 µg de ARN total en un volumen no mayor de 20 µl, 4 µl de RiboMinus™ Probe (100 pmol/µl), y 100 µl de Hybridization Buffer (B10). Se incubó a 37°C durante 5 min e inmediatamente se colocó en hielo por al menos 30 segundos. Se transfirió los 124 µl de la mezcla de hibridación a los 100 µl de beads resuspendidos en B10 (mantenidos a 37°C). Se incubó la nueva mezcla a 37°C por 15 min, se homogenizó ocasionalmente. Se colocó los tubos en reposo sobre las barras magnéticas, se recuperó el sobrenadante a tubos 1.5 ml libres de ARNsas.

Para concentrar el ARN recuperado se adicionó al sobrenadante 1 μ l de glicógeno (20 μ g/ μ l), 1/10 de volumen de la muestra de acetato de sodio 3M y 2.5 volumen de la muestra de etanol grado molecular al 100%. La mezcla se homogenizó por inmersión 10 veces, se incubó a -80°C por al menos 30 min, se centrifugó a 12 000 g por 15 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y 500 μ l de etanol fresco de grado molecular al 70% fue añadido, se centrifugó el tubo por 5 min a 12000 g a 4 °C, eliminar el sobrenadante. Finalmente se dejó airear el concentrado de ARN recuperado. El proceso continuó inmediatamente con el protocolo de librerías TruSeq Stranded mRNA, Illumina y el ARN recuperado fue resuspendido con 19.5 μ l de Fragment Prime Finish Mix (FPF), los pasos posteriores fueron realizados, según el protocolo en mención de Illumina.

Finalizadas las librerías, estas se cuantificaron con el kit 1 dsDNA HS (High Sensitivity), a través del equipo portátil Qubit 4 Fluorometer de Invitrogen. La visualización de las librerías se realizó mediante una corrida electroforética en gel de agarosa 1.5% TAE 1X, 90V, su presencia corresponde a bandas de 260 pb y 280 pb. El revelado se realizó mediante bromuro de etidio en un transiluminador UV.

Posteriormente las librerías fueron normalizadas y acondicionadas para su carga en el Mid Out NextSeq reagent cartridge. Version V2, 150 ciclos e ingresadas para su lecturas pair-end de 75pb a través del secuenciador NextSeq 550. Cada librería cuenta aproximadamente con 5.4 millones de reads por muestra.

7.3.4 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático se realizó en el sistema operativo LINUX, UBUNTU con los servidores perteneciente al Laboratorio de Bioinformática y biología molecular

ubicados en los Laboratorios de investigación y desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

7.3.4.1 Control de calidad del secuenciamiento

El programa FastQC analizó por muestra 2 resultados de calidad correspondiente a 2 lecturas del fragmento secuenciado, read1 (R1) y read2 (R2). Los archivos con extensión Fast.q obtenidas del NextSeq 550 tras el secuenciamiento contienen la información de lecturas pair-end 75 pb (read 1 y read 2) asociadas a un valor de calidad bajo codificación ASCII (American Standard Code for Information Interchange). Fast QC versión 0.11.7 bajo un formato de tablas y gráficos mostró los valores de calidad de cada base nucleotídica a través de Phred score (QC), probabilidad en escala logarítmica de que una base sea leída incorrectamente durante el secuenciamiento. En este caso el QC definido como el promedio de puntaje Phred+33, medida de calidad estándar de todos los reads de una muestra para una posición determinada, usado como filtro de calidad fue $QC \geq 28$ con lo que la probabilidad de que la base está correctamente identificada fue aproximadamente de 99.9%. Cada muestra fue evaluada con dos gráficas: (1) la posición (base pair) vs. calidad (QC o Quality Control); y (2) porcentaje total de guaninas y citosinas (%GC) vs. número de secuencias en la muestra.

7.3.4.2 Mapeo de secuencias con el genoma de referencia.

Para el mapeo al genoma de referencia y estimación de abundancias se empleó el programa Salmon v0.8.0 (Patro, Duggal, Love, Irizarry, & Kingsford, 2017), el cual

utiliza la herramienta de alineación ligera, caracterizada por un menor costo computacional y modelo de sesgo de muestra específica; considerando evaluaciones de corrección de sesgo por contenido CG del fragmento, sesgo posicional en la cobertura, secuencia específica 5' 3' finales, y distribución de la longitud de fragmentos, los cuales mejoran la exactitud de las estimaciones de abundancias. Salmon puede ejecutarse tanto a partir de archivos alineados como BAM o SAM, o a partir de raw data como en este caso. Salmon fue empleado en modo cuasi mapeo con el que a través de la raw data en formato fasta.q (.faq) y el genoma de referencia en formato fasta (.fa) se generó un index, que permitió evaluar las secuencias obtenidas de las secuencias únicas en el transcriptoma de referencia, así como la estimación de abundancias relativas. Finalmente Python fue empleado para la obtención del archivo con los datos de counts usado para el análisis diferencial en R. El comando Python empleado para el cuasi mapeo mediante Salmon fue:

```
subprocess.call (salmon index -t h37rv_cds_modified.fa -i h37rv_index -p 8,  
shell=True)
```

7.3.4.3 Cuantificación de expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial se ejecutó en el software estadístico R (R studio versión 4.1.1), a través del paquete edgeR con el cual los reads counts estimados a partir de Salmon se usaron para generar una variable tipo dataframe en el que ejecutó la función DGEList, los datos obtenidos fueron normalizados mediante el método “trimmed mean of M” (TMM), obteniéndose datos en términos de CPM ó “counts per millon” filtrados. Se estimó la dispersión de la data global mediante el

coeficiente de Variación Biológica (BCV). Para evaluar los genes con expresión diferencial (DGE), se ajustó al modelo probabilístico denominado modelo generalizado lineal (GLM) y se evaluó mediante F-test, con un nivel de significancia $p\text{-value} \leq 0.05$ para los DEG y valores ajustados para el control de la tasa de falsos positivos FDR (False Discovery Rate) en el testeo múltiple. Los datos obtenidos fueron empleados para la construcción de “volcanos plots”, y datos cuantitativos de expresión diferencial. Así mismo se realizó un análisis de principales componentes (PCA) y escalamiento multidimensional (MDS), con la finalidad de evaluar la distribución de los datos de expresión génica global.

7.3.4.4 Evaluación de vías metabólicas, Gene Ontology (GO-seq)

Para el análisis de enriquecimiento de vías metabólicas se empleó la librería GOseq en Edge R (<http://bioconductor.org/biocLite.R>) biocLite(“goseq”), en el que través de su función GO se categorizaron los genes en 3 procesos celulares, siendo estos: Procesos biológicos (BP), función molecular (MF) o componente celular (CC), asociados a roles funcionales dentro de la célula. Los DEGs significativa, mediante GoSeq o categorías enriquecidas de GO tomó en cuenta el tamaño del transcripto. Los archivos input usados fueron los archivos data_frame de expresión diferencial. Los plots generados fueron de tipo bar-plot que permitieron un análisis de función biológica atribuida de las proteínas asociadas a los DEGs, inducidas o reprimidas en las condiciones experimentales en evaluación.

VIII. RESULTADOS

8.1 Caracterización de cepas en estudio.

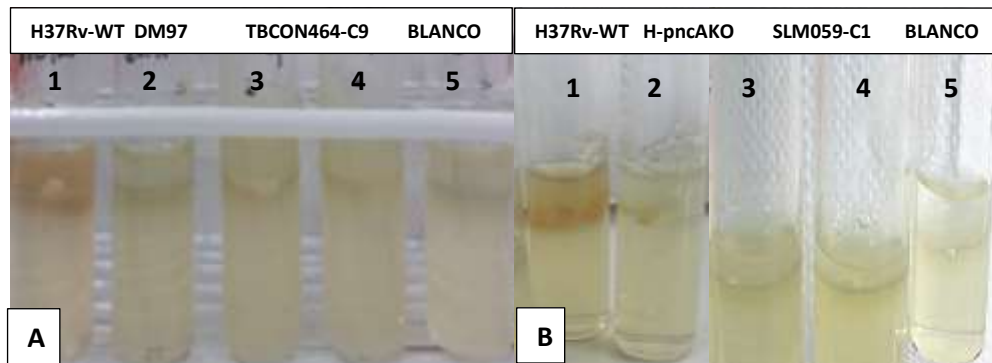
8.1.1 Verificación de POA extracelular (Wayne convencional).

Se realizó la prueba Wayne convencional para comprobar la presencia o ausencia de POA extracelular producto de la actividad enzimática de PZAsa tras la incubación de cada cepa de MTB expuesta directamente en medio Dubos conteniendo 100ug/ml de PZA. Los resultados hallados fueron (Tabla 2) la cepa H37RV-WT (control positivo) generó una coloración rojo intenso; la cepa DM97(control negativo) no generó ningún color al igual que el tubo control de reacción (carente de cepa) y el tubo H37Rv-pncA_KO. Las cepas SLM059-C1 y TBCON464-C9 evidenciaron un ligero viraje de color de incoloro a anaranjado tenue, siendo más notorio en TBCON464-C9 que en SLM059-C1. A pesar de ello los resultados de intensidad en las cepas clínicas fueron muy bajos calificándoseles como resultados no determinados (ND). Por tal razón se realizó el ensayo de POA cuantitativo en la siguiente sección.

Tabla 2: Resultados de la prueba Wayne convencional.

| Cepa | Coloración Wayne | Prueba Wayne convencional | Intensidad |
|---------------------------------|------------------|---------------------------|-----------------------|
| Control experimental (M. Dubos) | Incoloro | Negativo | - |
| MTB H37Rv-WT (Control positivo) | Rojo (Halo) | Positivo | +++ |
| MTB H37Rv-pncAKO | Incoloro | Negativo | - |
| MTB-TBCON464-C9 | ND | ND | Halo tenue anaranjado |
| MTB-SLM059-C1 | ND | ND | Halo tenue anaranjado |

Figura 1: Prueba Wayne convencional: Tubos con medio Agar-Dubos a 100ug/ml de PZA, revelados con 1% de SAF. Sección A) 1. H37RV-WT(Control positivo), 2. DM97(Control negativo), 3. y 4. TBCON464-C9, 5. Control de la reacción (blanco). Sección B) 1. H37RV-WT (Control positivo), 2. H37Rv-pncA-KO, 3. y 4. SLM059-C1, 5. Control de la reacción (blanco).



8.1.2 Cuantificación de POA extracelular de POA (Wayne cuantitativo).

Se realizó el test de Wayne cuantitativo para determinar las concentraciones de POA extracelular generado durante la incubación de las cepas de MTB en exposición a 400 µg/ml de PZA. La ecuación de la curva estándar basada en el modelo matemático de mínimos cuadrados fue:

$$y = m x \pm b$$

$$y = 0.1897X + 0.0008$$

Donde:

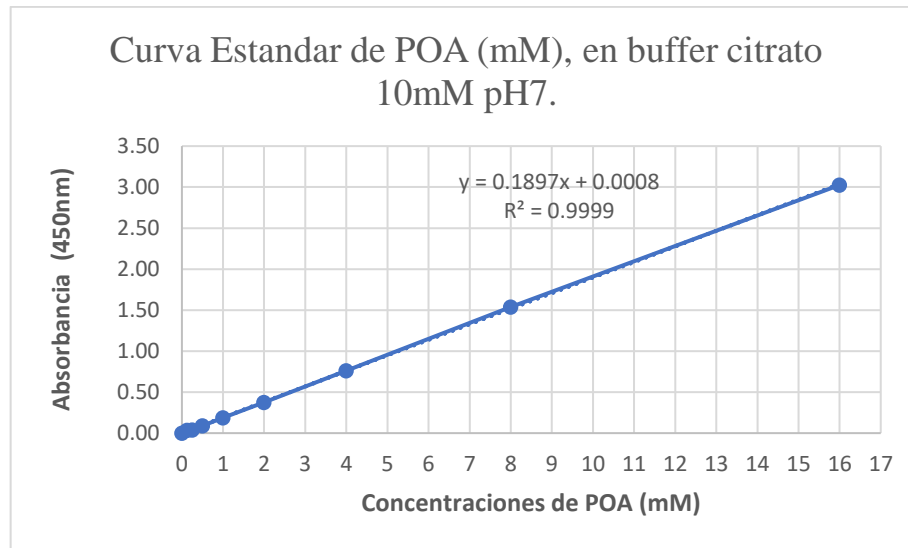
y= Absorbancia leída a 450nm

m= Pendiente de la recta ajustada al modelo .

X= Concentración de la muestra o blanco

b= intercepto, punto de origen en la ordenada.

Figura 2: Curva estándar de POA de 0.125 mM a 16 mM.



Los OD leídos a 450 nm fueron corregidos por el blanco de reacción y ajustados al modelo de regresión lineal obtenido con la curva estándar de POA (Figura 2.). Los resultados correspondientes a las concentraciones de POA (mM) generadas en los diferentes tiempos de muestreo fueron los siguientes:

Tabla 3: Concentración de POA extracelular (mM), generadas en los tiempos: 0, 24, 48 y 72 horas, en cada una de las cepas en estudio.

| Cepas | 0 h | DS | 24 h | DS | 48 h | DS | 72 h | DS |
|------------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| MTB H37Rv-WT | 0.172 | 0.019 | 0.251 | 0.020 | 0.32 | 0.03 | 0.51 | 0.07 |
| MTB H37Rv-pncAKO | 0.117 | 0.0004 | 0.122 | 0.019 | 0.115 | 0.004 | 0.128 | 0.012 |
| MTB-SLM059-C1 | 0.145 | 0.013 | 0.144 | 0.010 | 0.149 | 0.009 | 0.149 | 0.016 |
| MTB-TBCON464-C9 | 0.096 | 0.018 | 0.110 | 0.031 | 0.137 | 0.05 | 0.162 | 0.017 |

DS: Desviación Estándar.

Solo las cepas H37Rv-WT (Figura 3) y TBCON464-C9 (Figura 6) mostraron un incremento en las concentraciones de POA evaluados cada 24 horas, registrándose a las 72 horas un valor máximo de 0.510 mM y 0.162 mM correspondiente a 3 y

1.6 veces la concentración basal en el tiempo 0 respectivamente. Las cepas H37Rv-pncA_KO (Figura 4) y SLM059-C1 (Figura 5) por su parte mostraron cada 24 horas valores constantes de alrededor de 0.120 mM y 0.149 mM respectivamente, sin incremento de concentración de POA a lo largo de la evaluación.

Los resultados de incremento de concentraciones de POA se ajustaron mejor a un modelo de tendencia exponencial, con un coeficiente de determinación (R²) igual a 0.9928 para H37RV-WT y 0.9918 para TBCON464-C9. Por otro lado la cepa H37RV-WT registró un incremento constante de alrededor de 0.08 mM cada 24 horas, hallándose un incremento de 0 a 72 horas de 0.20 mM de POA; mientras la cepa TBCON464-C9 registró un incremento constante a partir de las 24 a las 72 horas de 0.025mM, hallándose hacia las 72 horas un incremento de 0.066 mM, la tercera parte de lo generado por H37RV-WT.

Figura 3: Concentración de POA en buffer citrato 10mM, pH 7 generada por H37Rv-WT.

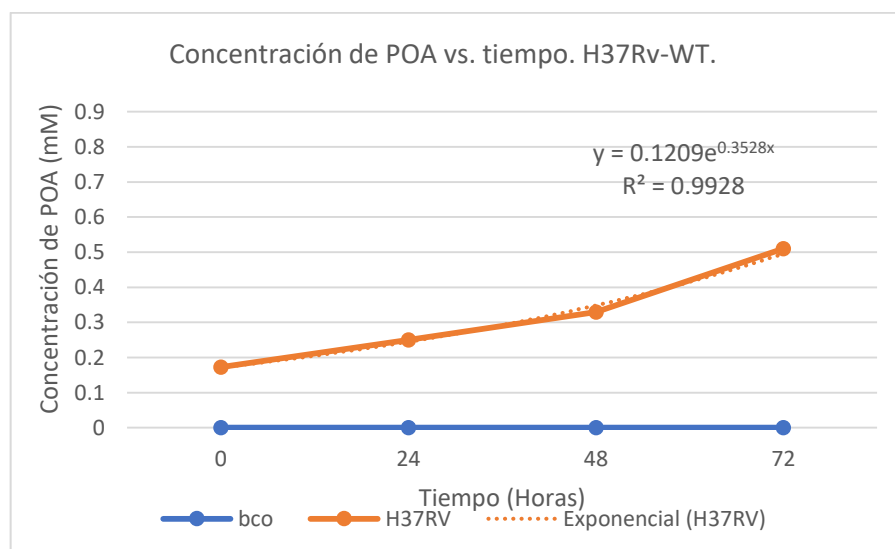


Figura 4: Concentración de POA en buffer citrato 10mM, pH7 generada por H37Rv WT-*pncAKO*.

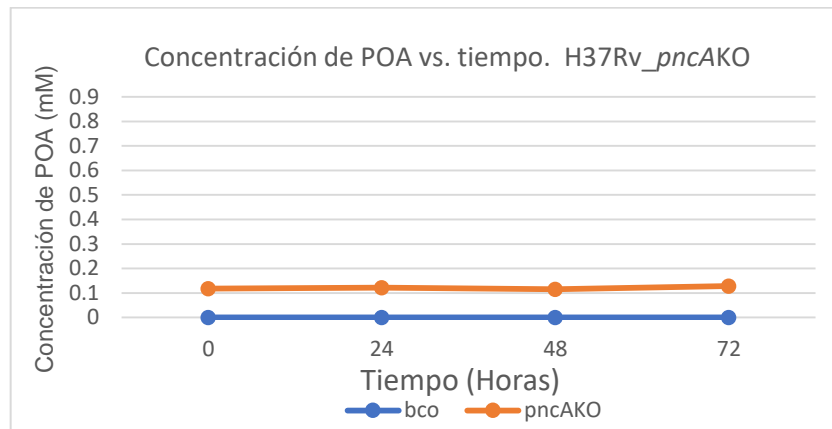


Figura 5: Concentración de POA en buffer citrato 10mM, pH 7 generada por SLM059_C1

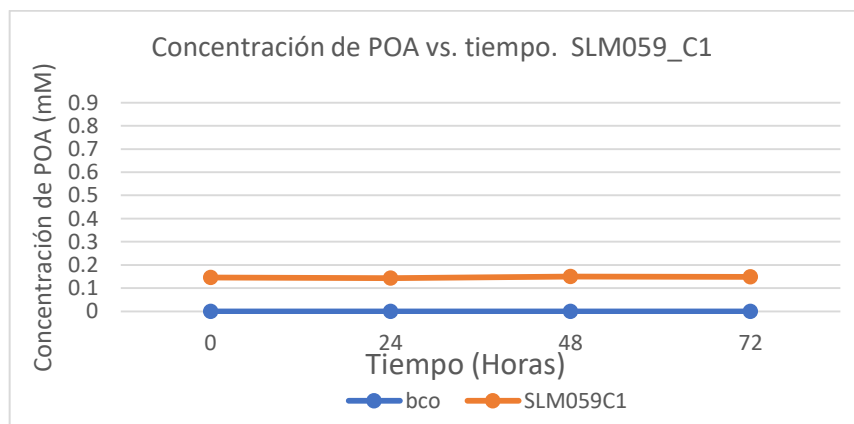
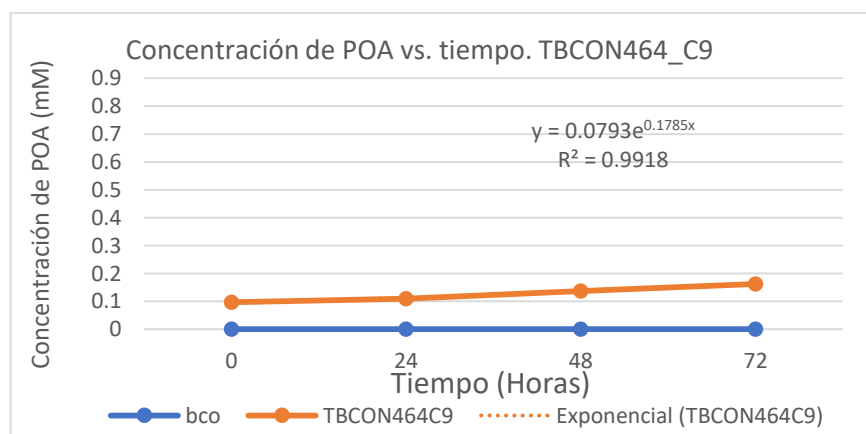


Figura 6: Concentración de POA en buffer citrato 10mM, pH 7 generada por TBCON464-C9



8.1.3 Determinación de susceptibilidad mediante MGIT 960.

Se determinó mediante MGIT la susceptibilidad de las cepas a PZA 100 µg/ml (MIC). Los cultivos fueron incubados a 36.9 °C, según el reporte obtenido; considerándose DM97 como control positivo de resistencia a PZA 100 µg/ml y H37Rv-WT como control positivo de sensibilidad a PZA 100 µg/ml, se obtuvieron los siguientes resultados; las 3 cepas en evaluación registraron resultados de resistencia a 100 µg/ml de PZA, mientras los controles H37RV-WT y DM97 mostraron resultados de susceptibilidad y resistencia a 100 µg/ml PZA respectivamente.

Tabla 4 : Resultados de susceptibilidad y condiciones del Test-MGIT 960.

| Cepa | Tiempo de incubación | UC, Tubo Control | UC, Tubo reacción | Resultado de susceptibilidad |
|------------------|----------------------|------------------|-------------------|------------------------------|
| MTB DM97 * | 7días, 19h | 400 | 400 | R |
| MTB H37Rv-WT** | 6días, 18h | 400 | 1 | S |
| MTB H37Rv-pncAKO | 8días, 19h | 400 | 400 | R |
| MTB SLM059-C1 | 17días, 18h | 400 | 400 | R |
| MTB TBCON464-C9 | 7días, 3h | 400 | 400 | R |

UC: Unidad de crecimiento

(*): MTB DM97, control positivo de resistencia a PZA 100 µg/ml.

(**): MTB H37Rv-WT, control positivo de sensibilidad a PZA 100 µg/ml.

R: resistente a 100 µg/ml de PZA

S: sensible a 100 µg/ml de PZA

Tubo control: Tubo con 0 µg/ml de PZA

Tubo reacción: Tubo con 100 µg/ml de PZA.

8.1.4 Amplificación y verificación de mutación en el gen *pncA* y promotor.

Tras la obtención de ADN_g de alto peso molecular (Figura 7), éste fue empleado para la amplificación PCR del gen *pncA* y sus respectivos segmentos flanqueantes

up-stream y down-stream (amplicon de 700 pb) con los primers P1-P6 (Figura 8). Los resultados del secuenciamiento Sanger verificaron la presencia de la mutación A102V en el gen *pncA*, de la cepa SLM059-C1 y la mutación V125F en el gen *pncA* de la cepa TBCON464-C9 (Tabla 5). Así mismo se logró la amplificación de los segmentos flanqueantes del gen *pncA*, segmentos up-stream 54 pb y 93 pb y segmento down-stream 46 pb y 42 pb del gen *pncA* de las cepas SLM059-C1 y TBCON464-C9 respectivamente, lo que permitió analizar mutaciones en la zona promotor. Los resultados hallados en los alineamientos por CLUSTAL OMEGA mostraron ausencia de mutaciones en la zona up-stream y down-stream de las cepas clínicas en evaluación (Anexo 1).

Figura 7. Corrida electroforética en gel de agarosa 0.8 % de los ADNg de alto peso molecular de las cepas de MTB. Carril 1-2: H37Rv-WT. Carril 3-4: H37RV-*pncAKO*. Carril 5-6: SLM059-C1. Carril 7-8: TBCON464-C9. Carril 9-10: Controles. Carril 11-12: Marcador lambda 10 ng - 50 ng.

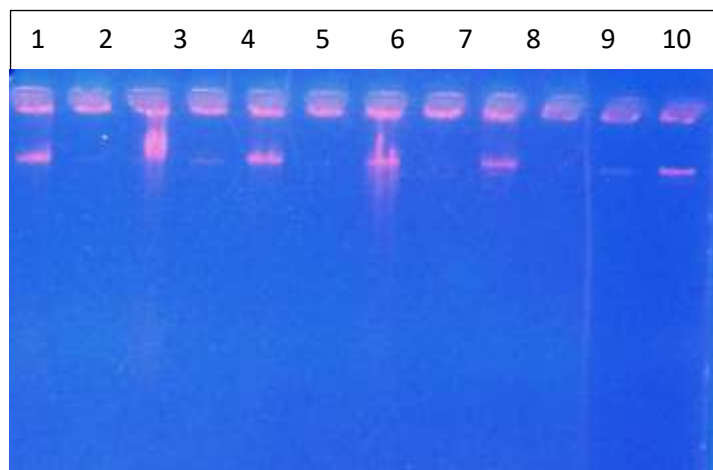


Figura 8. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1 % de los productos PCR, amplicon del gen *pncA* y los segmentos up stream y down-stream correspondiente a 700 pb. Carril 1: Marcador 1Kb-PLUS, Invitogren. Carril 2: H37Rv-WT(control positivo). Carril 3: Blanco de reacción. Carril 4: SLM059 (cepa clínica). Carril 5: SLM059-C1, Carril 6: TBCON464 (cepa clínica), Carril 7: TBCON464-C9

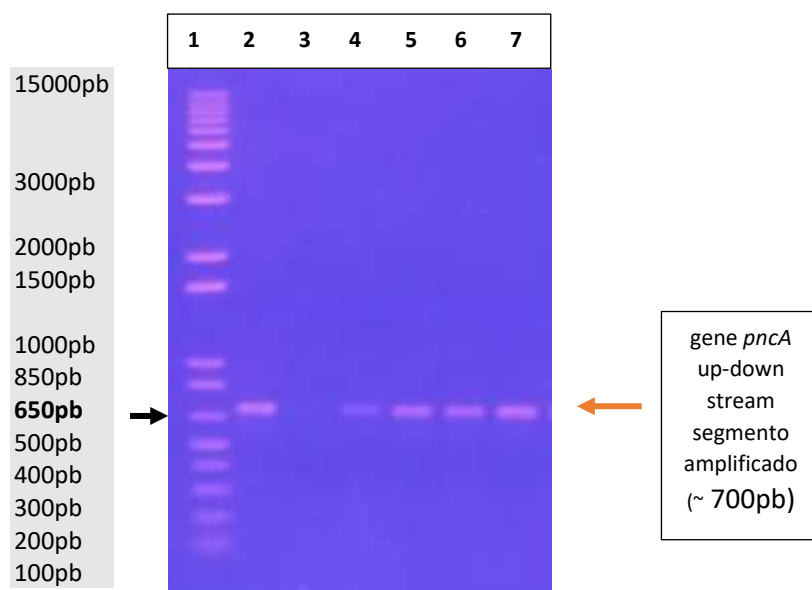


Tabla 5. Resultados de secuenciamiento Sanger para la verificación de mutaciones en el gen *pncA* de la cepa SLM059-C1 y la cepa TBCON464-C9.

| Cepa | Nucleotido_ mutación: Región Up-stream | Nucleotido_ mutación: Región Down-stream | Nucleotido <i>pncA</i> mutación | Aminoácido <i>pncA</i> mutación |
|--------------|--|--|---------------------------------|---------------------------------|
| SLM059-C1. | Sin mutación 54pb, Up-stream | Sin mutación 46pb, Down-stream | C306T | A102V |
| TBCON464-C9. | Sin mutación 93pb, Up-stream | Sin mutación 42pb, Down-stream | G373T | V125F |

8.2 Condiciones de cultivo para expresión de genes (RNA-seq)

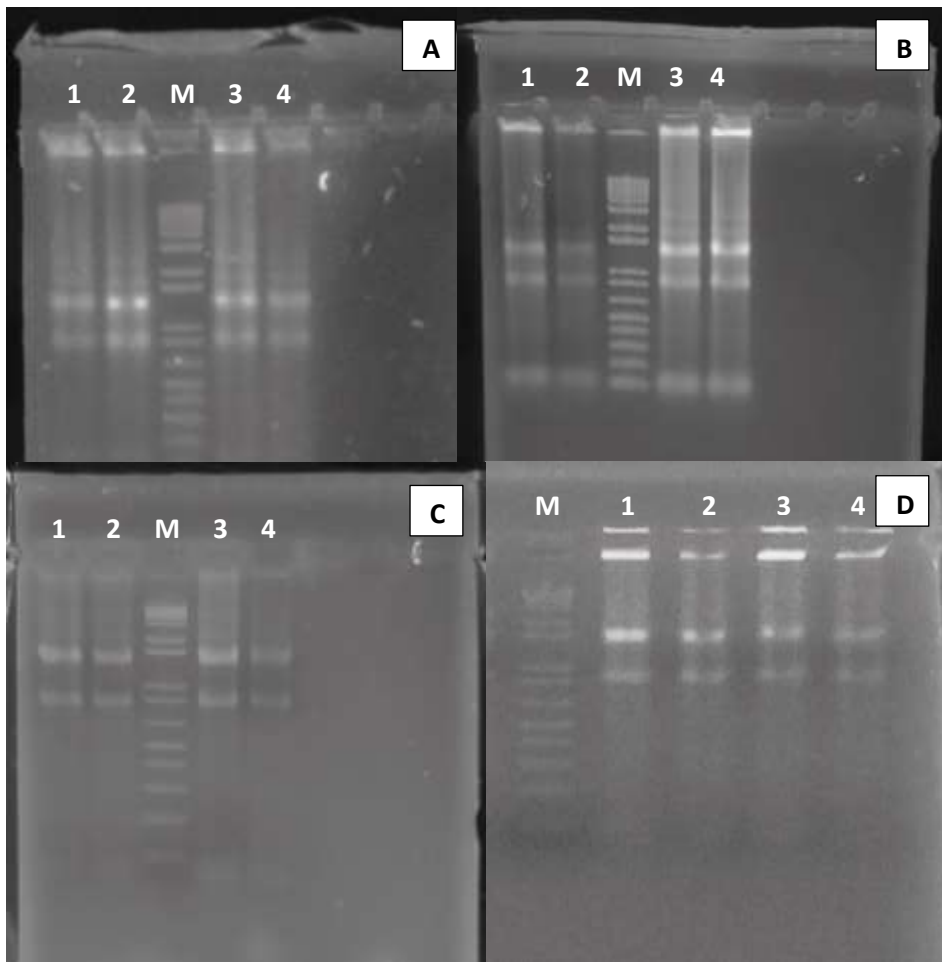
8.2.1 Extracción de ARN total.

Los resultados mostraron un ARN total integro verificado por la presencia de las bandas de ARN ribosomal 16S y 26S visualizados todos los casos cepas, condiciones y repeticiones (Figura 9) . Así mismo los índices de purezas en todos los casos evidenciaron muestras de ARN total de alta pureza con índices A260/A280 y A260/A230 alrededor de 2 en ambos casos (Tabla 6).

Tabla 6. Índices de pureza de cada muestra de ARN total analizada.

| N° muestra | Cepa de <i>M. tuberculosis</i> (MTB) | Repetición | pH | PZA µg/ml | ARN total ng/µl (Nanodrop) | Ratio 260/280 (Nanodrop) | Ratio 260/230 (Nanodrop) |
|------------|--------------------------------------|------------|----|-----------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | H37Rv | 1 | 7 | 0 | 1050 | 2.08 | 2.13 |
| 2 | H37Rv | 1 | 7 | 100 | 1027 | 2.07 | 2.19 |
| 3 | H37Rv | 1 | 6 | 0 | 1098 | 2.06 | 2.1 |
| 4 | H37Rv | 1 | 6 | 50 | 544 | 2.03 | 2.05 |
| 5 | H37Rv | 2 | 7 | 0 | 1165 | 2.04 | 2.11 |
| 6 | H37Rv | 2 | 7 | 100 | 1669 | 2.08 | 2.19 |
| 7 | H37Rv | 2 | 6 | 0 | 1738 | 2.08 | 2.18 |
| 8 | H37Rv | 2 | 6 | 50 | 641 | 2.04 | 2.18 |
| 9 | H37Rv | 3 | 7 | 0 | 374.9 | 2.07 | 2.22 |
| 10 | H37Rv | 3 | 7 | 100 | 241.1 | 2.12 | 2.3 |
| 11 | H37Rv | 3 | 6 | 0 | 394.5 | 2.08 | 2.23 |
| 12 | H37Rv | 3 | 6 | 50 | 185 | 2.1 | 2.32 |
| 13 | H37Rv_pncAKO | 1 | 7 | 0 | 453 | 2.05 | 2.1 |
| 14 | H37Rv_pncAKO | 1 | 7 | 100 | 295 | 2.02 | 1.98 |
| 15 | H37Rv_pncAKO | 1 | 6 | 0 | 965 | 2.09 | 2.15 |
| 16 | H37Rv_pncAKO | 1 | 6 | 100 | 1123.7 | 2.08 | 2.15 |
| 17 | H37Rv_pncAKO | 2 | 7 | 0 | 678 | 1.98 | 1.99 |
| 18 | H37Rv_pncAKO | 2 | 7 | 100 | 635 | 1.99 | 2.06 |
| 19 | H37Rv_pncAKO | 2 | 6 | 0 | 388 | 2.01 | 1.98 |
| 20 | H37Rv_pncAKO | 2 | 6 | 100 | 322 | 1.99 | 2.01 |
| 21 | H37Rv_pncAKO | 3 | 7 | 0 | 202.9 | 2.03 | 1.75 |
| 22 | H37Rv_pncAKO | 3 | 7 | 100 | 345 | 2.07 | 2.05 |
| 23 | H37Rv_pncAKO | 3 | 6 | 0 | 282.8 | 2.07 | 2.05 |
| 24 | H37Rv_pncAKO | 3 | 6 | 100 | 280.3 | 2.02 | 1.83 |
| 25 | SLM059_C1 | 1 | 7 | 0 | 681 | 2 | 2.11 |
| 26 | SLM059_C1 | 1 | 7 | 100 | 632 | 2.03 | 2.29 |
| 27 | SLM059_C1 | 1 | 6 | 0 | 625 | 2.01 | 2.28 |
| 28 | SLM059_C1 | 1 | 6 | 100 | 294 | 2 | 2.37 |
| 29 | SLM059_C1 | 2 | 7 | 0 | 505 | 2.01 | 2.02 |
| 30 | SLM059_C1 | 2 | 7 | 100 | 259 | 2 | 1.86 |
| 31 | SLM059_C1 | 2 | 6 | 0 | 281 | 2 | 1.9 |
| 32 | SLM059_C1 | 2 | 6 | 100 | 327 | 2.02 | 1.94 |
| 33 | SLM059_C1 | 2 | 7 | 0 | 418.2 | 2.04 | 2.07 |
| 34 | SLM059_C1 | 2 | 7 | 100 | 323.1 | 2.03 | 1.97 |
| 35 | SLM059_C1 | 2 | 6 | 0 | 365.1 | 2.02 | 2.03 |
| 36 | SLM059_C1 | 2 | 6 | 100 | 259.7 | 2.09 | 2.3 |
| 37 | TBCON464-C9 | 1 | 7 | 0 | 211.7 | 2.03 | 1.88 |
| 38 | TBCON464-C9 | 1 | 7 | 100 | 158.2 | 1.96 | 1.82 |
| 39 | TBCON464-C9 | 1 | 6 | 0 | 134.9 | 1.97 | 1.88 |
| 40 | TBCON464-C9 | 1 | 6 | 100 | 631 | 2.02 | 2.32 |
| 41 | TBCON464-C9 | 2 | 7 | 0 | 627 | 2.06 | 2.11 |
| 42 | TBCON464-C9 | 2 | 7 | 100 | 751 | 2.07 | 2.18 |
| 43 | TBCON464-C9 | 2 | 6 | 0 | 454 | 2.03 | 1.94 |
| 44 | TBCON464-C9 | 2 | 6 | 100 | 519 | 2.01 | 2.06 |
| 45 | TBCON464-C9 | 3 | 7 | 0 | 201.2 | 2.04 | 2.16 |
| 46 | TBCON464-C9 | 3 | 7 | 100 | 194.9 | 2.04 | 2.02 |
| 47 | TBCON464-C9 | 3 | 6 | 0 | 824 | 2.05 | 2.18 |
| 48 | TBCON464-C9 | 3 | 6 | 100 | 423.7 | 2.01 | 1.95 |

Figura 9: Corrida de electroforesis de agarosa 1.5 % TBE1X de algunas muestras de ARN total con presencia de ARN ribosomales 16S y 26S. A: 1. H37RV_WT (pH 7, PZA0), 2. H37RV_WT(pH 7, PZA50), 3. H37RV_WT (pH 6, PZA0), 4. H37RV_WT (pH 6, PZA100). B: 1. H37Rv_pncAKO (pH 7, PZA0), 2. H37Rv-pncAKO (pH 7, PZA100), 3. H37Rv-pncAKO (pH 6, PZA0), 4. H37Rv_pncAKO (pH 6, PZA100). C: 1. SLM059-C1 (pH 7, PZA0), 2. SLM059-C1 (pH 7,PZA100), 3. SLM059-C1 (pH6,PZA0), 4. SLM059-C1 (pH 6,PZA100). D: 1. TBCON464-C9 (pH 7,PZA0), 2. TBCON464-C9 (pH7, PZA100), 3. TBCON464-C9 (pH6, PZA0), 4. TBCON464-C9 (pH 6,PZA100).



8.2.2 Caracterización de ARN total

Tabla 7: Cuantificación mediante QUIBIT4 de las muestras de ARN total usados en RNaseq. Concentración de ARN total, ADN genómico e Integridad (Index Quality)

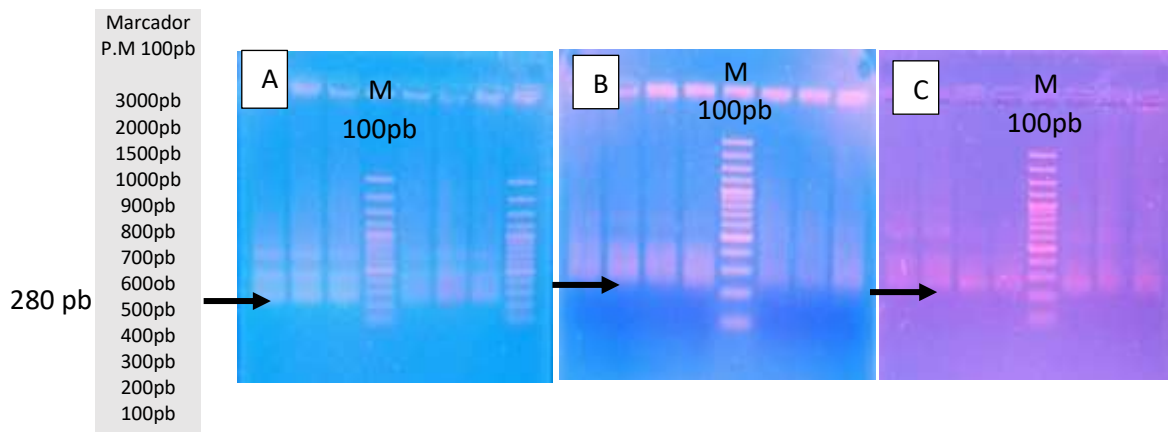
| Nº muestra | Código-librería | Cepa de <i>M. tuberculosis</i> (<i>MTB</i>) | Repetición biológica | pH | PZA µg/ml | ARN total ng/µl | ADNg total ng/µl | Integridad ranking IQ |
|------------|-----------------|---|----------------------|----|-----------|-----------------|------------------|-----------------------|
| 1 | HI.1 | H37Rv | 1 | 7 | 0 | 1180 | 89 | 10 |
| 2 | HI.2 | H37Rv | 1 | 7 | 100 | 1347 | 88 | 10 |
| 3 | HI.3 | H37Rv | 1 | 6 | 0 | 1216 | 88 | 10 |
| 4 | HI.4 | H37Rv | 1 | 6 | 50 | 657.6 | 64 | 10 |
| 5 | HII.1 | H37Rv | 2 | 7 | 0 | 1664 | 95.4 | 10 |
| 6 | HII.2 | H37Rv | 2 | 7 | 100 | 2048 | 106 | 10 |
| 7 | HII.3 | H37Rv | 2 | 6 | 0 | 2400 | 108 | 10 |
| 8 | HII.4 | H37Rv | 2 | 6 | 50 | 832 | 80 | 10 |
| 9 | HIIL.1 | H37Rv | 3 | 7 | 0 | 800 | 26 | 9.9 |
| 10 | HIIL.2 | H37Rv | 3 | 7 | 100 | 320 | 17.2 | 10 |
| 11 | HIIL.3 | H37Rv | 3 | 6 | 0 | 792 | 32 | 9 |
| 12 | HIIL.4 | H37Rv | 3 | 6 | 50 | 220 | 16 | 9.5 |
| 13 | KO.1 | H37Rv_pncAKO | 1 | 7 | 0 | 472 | 43 | 10 |
| 14 | KO.2 | H37Rv_pncAKO | 1 | 7 | 100 | 536 | 53 | 9.6 |
| 15 | KO.3 | H37Rv_pncAKO | 1 | 6 | 0 | 1267.2 | 136 | 10 |
| 16 | KO.4 | H37Rv_pncAKO | 1 | 6 | 100 | 1600 | 92 | 10 |
| 17 | KOII.1 | H37Rv_pncAKO | 2 | 7 | 0 | 640 | 52 | 9 |
| 18 | KOII.2 | H37Rv_pncAKO | 2 | 7 | 100 | 640 | 40.3 | 9.3 |
| 19 | KOII.3 | H37Rv_pncAKO | 2 | 6 | 0 | 387 | 16.4 | 9.7 |
| 20 | KOII.4 | H37Rv_pncAKO | 2 | 6 | 100 | 329 | 14.6 | 9.2 |
| 21 | KOIII.1 | H37Rv_pncAKO | 3 | 7 | 0 | 220 | 4.54 | 10 |
| 22 | KOIII.2 | H37Rv_pncAKO | 3 | 7 | 100 | 380 | 13.1 | 9.8 |
| 23 | KOIII.3 | H37Rv_pncAKO | 3 | 6 | 0 | 360 | 6.44 | 10 |
| 24 | KOIII.4 | H37Rv_pncAKO | 3 | 6 | 100 | 320 | 6.42 | 10 |
| 25 | SI.1 | SLM059_C1 | 1 | 7 | 0 | 570 | 35.2 | 9.1 |
| 26 | SI.2 | SLM059_C1 | 1 | 7 | 100 | 580 | 33.6 | 9.5 |
| 27 | SI.3 | SLM059_C1 | 1 | 6 | 0 | 700 | 41.9 | 9 |
| 28 | SI.4 | SLM059_C1 | 1 | 6 | 100 | 311 | 12.6 | 9.3 |
| 29 | SII.1 | SLM059_C1 | 2 | 7 | 0 | 600 | 28.3 | 9.5 |
| 30 | SII.2 | SLM059_C1 | 2 | 7 | 100 | 282 | 9.15 | 9.3 |
| 31 | SII.3 | SLM059_C1 | 2 | 6 | 0 | 293 | 10.4 | 9.3 |
| 32 | SII.4 | SLM059_C1 | 2 | 6 | 100 | 317 | 13.4 | 9.5 |
| 33 | SIII.1 | SLM059_C1 | 2 | 7 | 0 | 780 | 32 | 9.9 |
| 34 | SIII.2 | SLM059_C1 | 2 | 7 | 100 | 580 | 24 | 10 |
| 35 | SIII.3 | SLM059_C1 | 2 | 6 | 0 | 720 | 33 | 9.4 |
| 36 | SIII.4 | SLM059_C1 | 2 | 6 | 100 | 250 | 29 | 9.9 |
| 37 | T.1 | TBCON464-C9 | 1 | 7 | 0 | 261.6 | 25 | 10 |
| 38 | T.2 | TBCON464-C9 | 1 | 7 | 100 | 168.4 | 7.25 | 10 |
| 39 | T.3 | TBCON464-C9 | 1 | 6 | 0 | 165.2 | 24.75 | 9.8 |
| 40 | T.4 | TBCON464-C9 | 1 | 6 | 100 | 672 | 73.6 | 10 |
| 41 | TII.1 | TBCON464-C9 | 2 | 7 | 0 | 758 | 34.2 | 9.3 |
| 42 | TII.2 | TBCON464-C9 | 2 | 7 | 100 | 846 | 32.6 | 10 |
| 43 | TII.3 | TBCON464-C9 | 2 | 6 | 0 | 498 | 17.9 | 9.9 |
| 44 | TII.4 | TBCON464-C9 | 2 | 6 | 100 | 580 | 27.2 | 10 |
| 45 | TIII.1 | TBCON464-C9 | 3 | 7 | 0 | 200 | - | 10 |
| 46 | TIII.2 | TBCON464-C9 | 3 | 7 | 100 | 210 | - | 10 |
| 47 | TIV.3.opc | TBCON464-C9 | 3 | 6 | 0 | 680 | 81 | 9.7 |
| 48 | TIV.4.opc | TBCON464-C9 | 3 | 6 | 100 | 400 | 36.6 | 10 |

8.3 Secuenciamiento de siguiente generación (NGS), RNA-seq.

8.3.1 Preparación y obtención de librerías

En la figura 10 se observa las bandas correspondientes a algunas librerías escogidas al azar en cada repetición, puestas al Mid Out reagent cartridge en el Nextseq550.

Figura 10: Gel de electroforesis de agarosa 1.5% TAE 1X. 90V. Sección A) Muestras de librerías escogidas a azar de la primera repetición B) Muestras de librerías escogidas a azar de la segunda repetición. C) Muestras de librerías escogidas a azar de la tercera repetición.



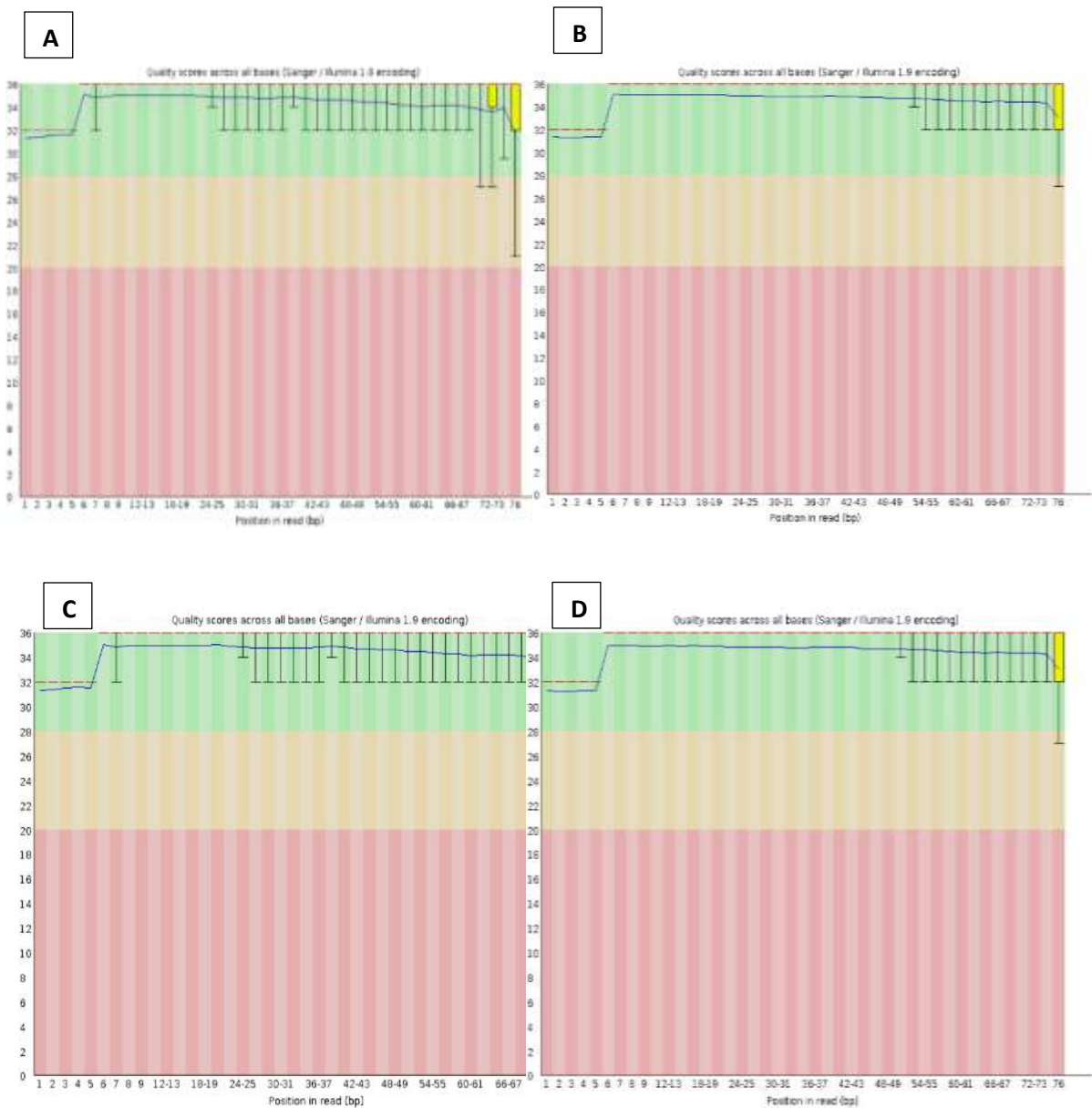
8.4 Análisis bioinformático

8.4.1 Control de calidad de secuenciamiento

En todos los casos los Phred Score o valores de calidad de cada base en cada lectura secuenciada fue en promedio $QC > 28$ (Figura 11), con lo que se aseguró una probabilidad de error por base de 1 cada 1000 pb, es decir una probabilidad de un correcto secuenciamiento por base de 99.9%, los datos obtenidos concuerdan con

los datos del reporte del equipo NextSeq 550 plataforma de Illumina tras el secuenciamiento, el cual indicó un valor de QC entre 30 y 40.

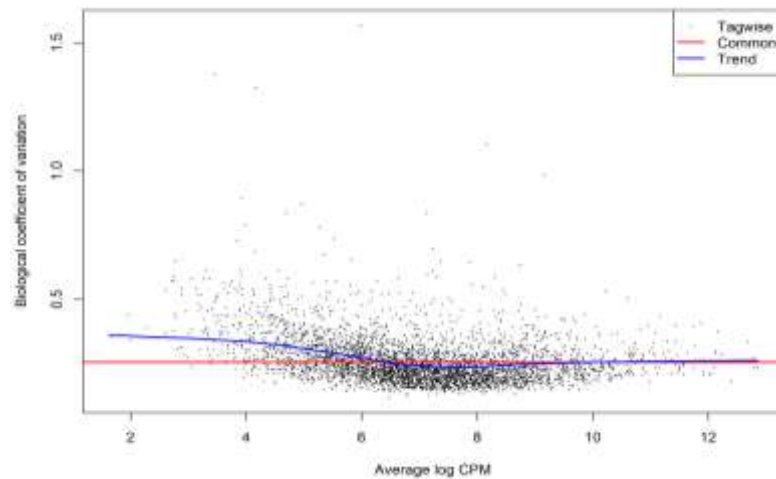
Figura 11: Plots de calidad FastQC, valores de QC vs. posición de nucleótido en el read leído. Algunos plots son mostrados a continuación A: muestra SLM059-C1 condición pH 7 PZA0 (Read 1); B: muestra SLM059-C1 condición pH 7 PZA0 (Read 2), C: muestra SLM059-C1 condición pH 6 PZA100 (Read 1), D: muestra SLM059-C1 condición pH6 PZA100 (Read 2).



8.4.2 Análisis de dispersión de datos

Para evaluar la dispersión global de la data se analizó el coeficiente de variación biológica (BCV) entre las réplicas de las muestras, los resultados mostraron una dispersión común de 0.0646 de los datos y un valor de BCV de 0.25. Mostrando una disminución en la dispersión a medida que log CPM (counts per million) es mayor (Figura 12).

Figura 12: BCV vs. log CPM promedio de la data. (Línea azul).



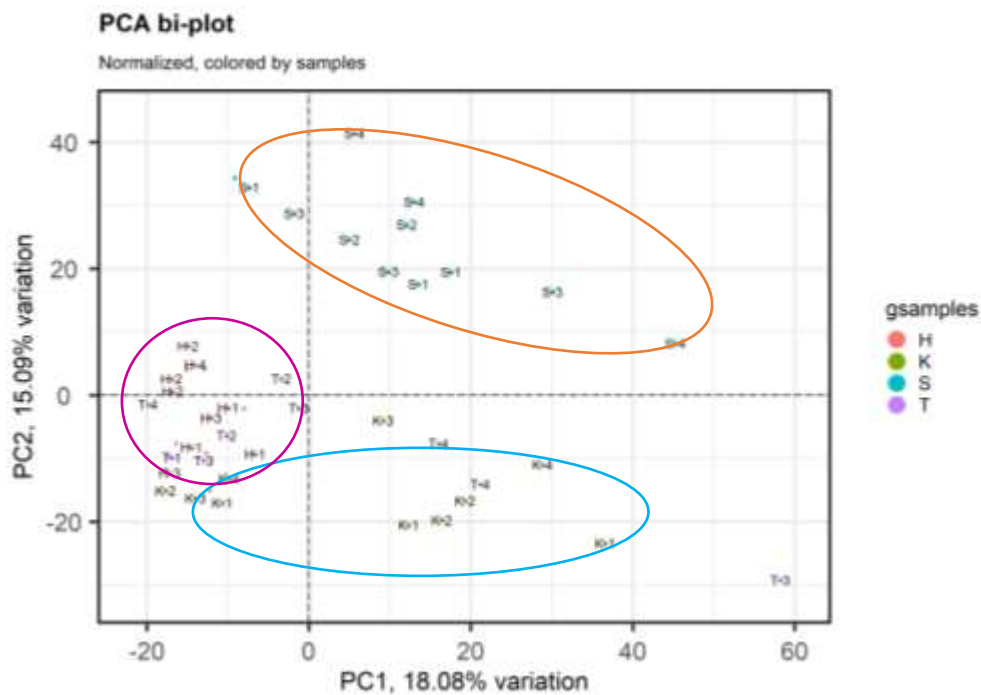
8.5 Cuantificación de expresión diferencial

8.5.1 Evaluación de datos (PCA)

Para conocer la existencia de factores que explique la variación en los perfiles transcriptómicos; los datos de expresión genética fueron evaluados mediante análisis de principales componentes (PCA), 2 principales componentes explican la data con una variación de 18.8% para el primer componente principal (PC1) y 15.09% para el segundo componente principal (PC2). La gráfica de PCA mostró

agrupamiento vinculados a la variante génica (cepas) (Figura 13). La gráfica de PCA no mostró agrupamiento por el factor corrida, descartando un efecto por “batch” de las muestras (Figura 14), la condición de pH no evidenció ningún efecto de agrupamiento como causa principal de variación de los perfiles transcriptómicos.

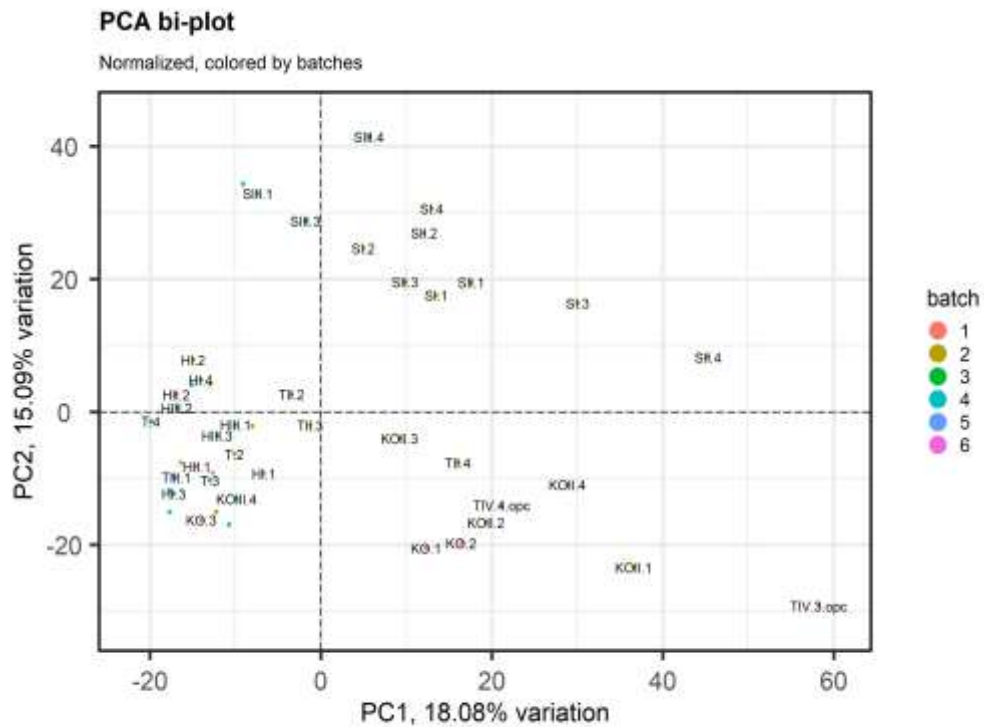
Figura 13: PCA bi-plot de los datos de expresión génica, coloreado por cepas.



Leyenda (Coloreado por cepas):

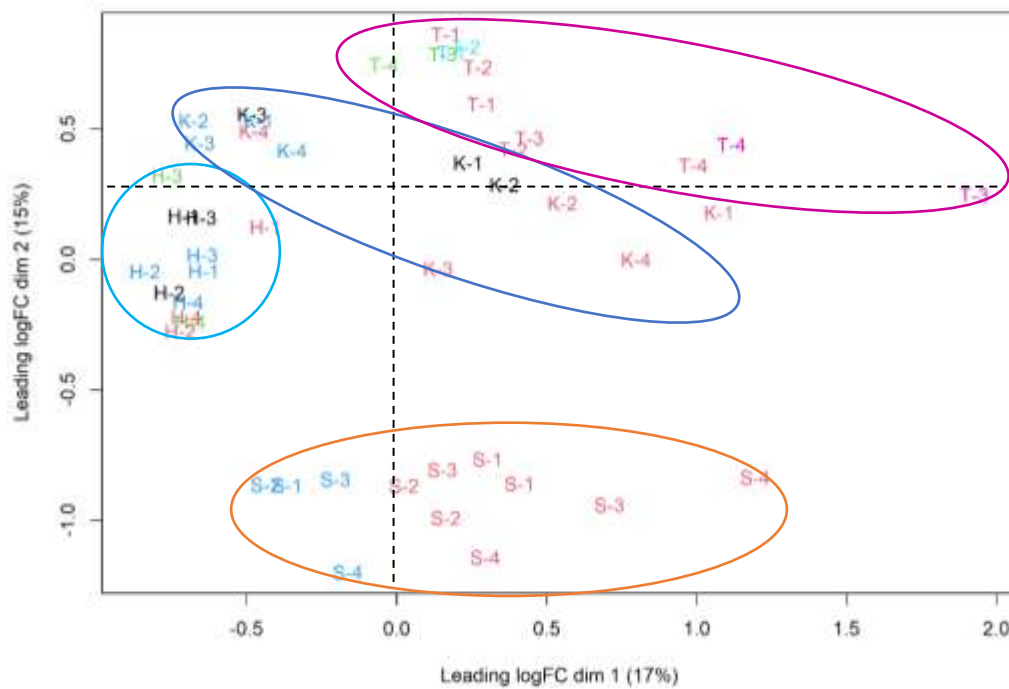
- H= muestras H37RVWT.
- K= muestras H37RV-pncA-KO.
- S= muestras SLM059C1.
- T= muestras TBCON469C9.

Figura 14: PCA bi-plot de los datos de expresión génica, coloreado por “batch”.



Los datos en función de la expresión diferencial muestran una variación de 17% determinado por la dimensión 1, mientras de 15% explicada por la dimensión 2; con valores similares a los datos de PCA. El MDS muestra una marcada separación de la cepa resistente SLM059C1(S), con respecto a las otras cepas (dimensión 2). Por otra parte se distingue una ligera separación de la cepa sensible H37Rv-WT (H) y las cepas resistentes. (Figura 15).

Figura 15: MDS-plot o escala multidimensional de los perfiles transcriptómicos.



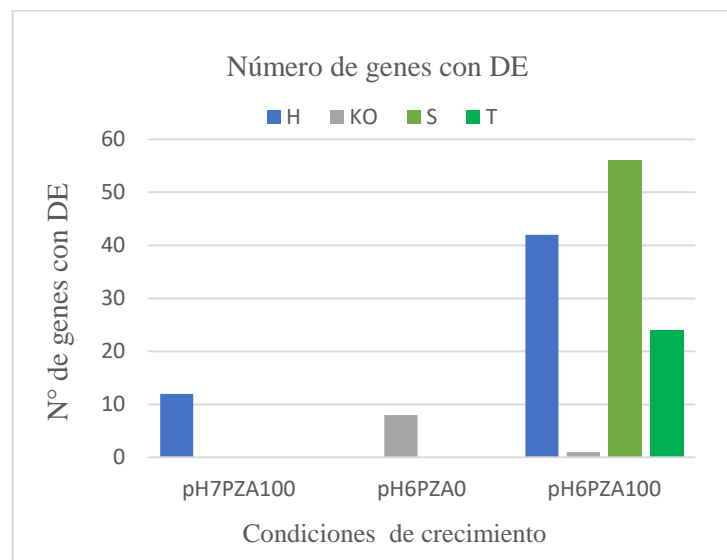
8.5.2 Evaluación de expresión diferencial de genes .

8.5.2.1 Expresión diferencial de genes.

Los resultados evidenciaron existencia de DEGs estadísticamente significativos en las 4 cepas en estudio, $FDR < 0.05$, $-2 < \log_2 FC > 2$. Los genes con DE fueron en su mayoría genes up-regulated; la condición donde se encontraron más genes con DE frente a pH7PZA0 fue pH6PZA100 (Figura 16). Los resultados de H37Rv-pncAKO

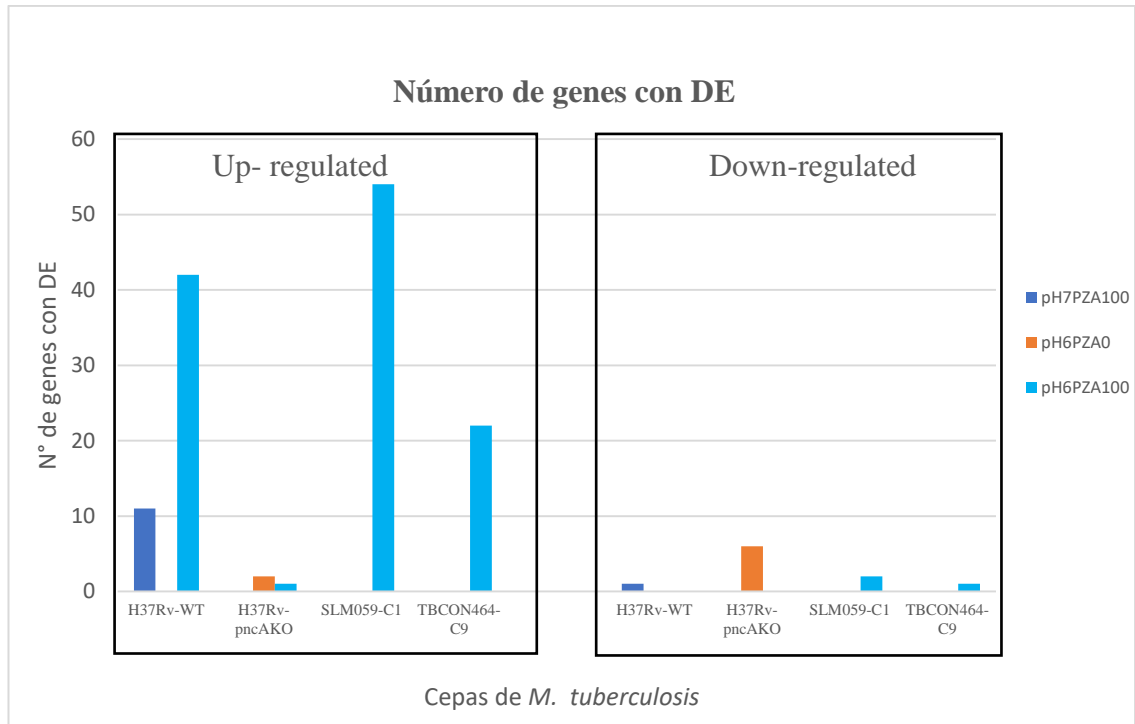
(control negativo) mostró DEGs mínimos, hallándose solo 1 DEGs en la condición pH6PZA100 y 8 genes vinculados a la condición pH6PZA0, 6 down-regulated y 2 up-regulated, solo H37Rv-pncAKO mostró DEGs en esta condición. Por otro lado la cepa H37Rv-WT fue la única cepa que mostró DEGs ante PZA en ambos pHs (pH6 y pH7); así en la condición pH7PZA100 se registró 1 gen down-regulated y 11 up-regulated, mientras en pH6PZA100 todos los genes fueron up-regulated. En el caso de ambas cepas clínicas solo se hallaron DEGs en la condición pH6PZA100, la mayoría up-regulated y unos pocos down-regulated (Figura 17). Todos DEGs fueron evaluados en función a pH7 PZA0.

Figura 16: Distribución del número de DEGs de las 4 cepas en estudio expuestas a las condiciones de pH6 pH7 y 0 y 100ug/ml de PZA.



(*) En H37Rv-WT se trabajó con pH6PZA50 (PZA50mg/ml) en lugar de pH6PZA100(PZA100mg/ml).

Figura 17: Distribución del número de DEGs up-regulated y down-regulated de las 4 cepas en estudio expuestas a las condiciones de pH y concentración de PZA.



8.5.2.2 Genes con expresión diferencial (DEGs).

DEGs en la cepa sensible (H37Rv-WT).

Los resultados mostraron que la cepa H37Rv-WT evidenció DEGs ante la presencia de PZA expuesta tanto a pH7 como a pH6, de esta manera no se registró ningún gen con DE ante la ausencia de PZA. Cabe resaltar que todos DEGs en pH7PZA100 fueron también hallados en pH6PZA100, excepto los genes Rv0678 y Rv0886 exclusivos de pH7PZA100 (*).

Figura 18: Volcano plot los DEGs ante la exposición de PZA. A) Volcano plot de los DEGs de MTB-H37RV_WT en exposición a pH7PZA100. B) Volcano plot de los DEGs de MTB-H37RV_WT en exposición a pH6PZA50.

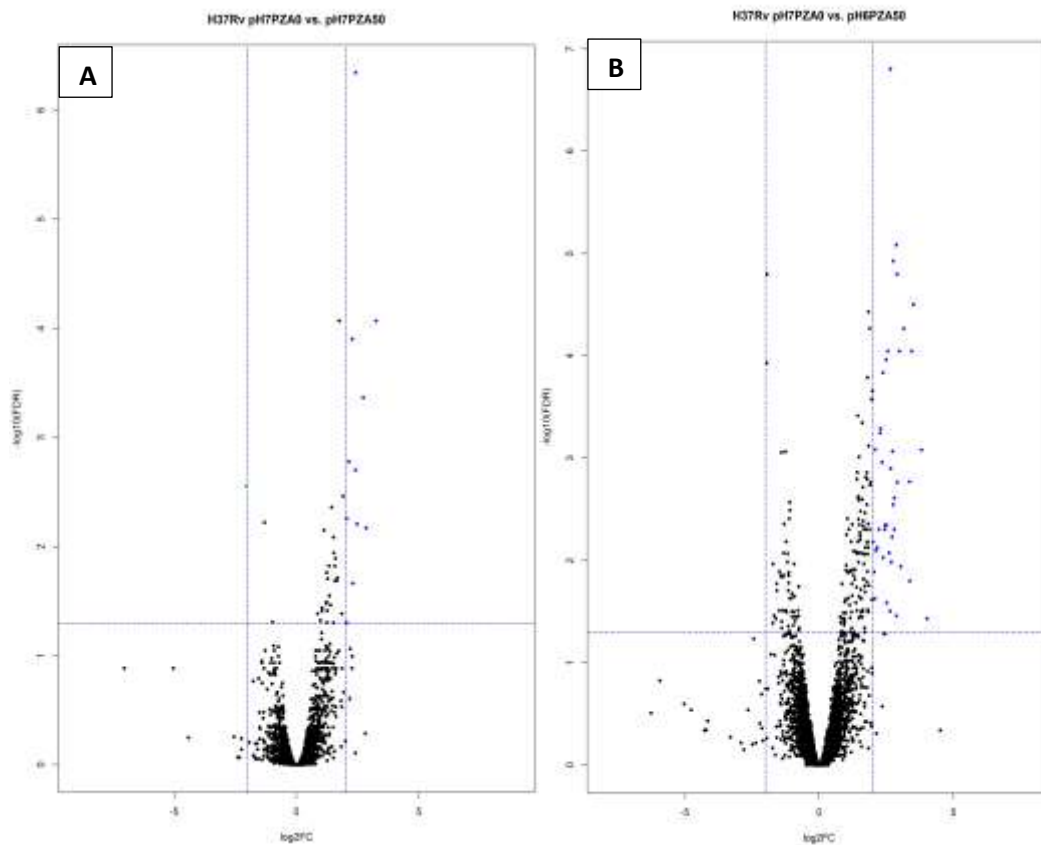


Tabla 8: Lista de DEGs $-2 > \log_2FC > 2$, $FDR < 0.05$ de H37RV-WT en exposición a pH7PZA100 frente a pH7PZA0.

| Genes | logFC | FoldChange | PValue | FDR | Función |
|----------|---------|------------|---------|---------|---|
| Rv2780 | 2.40892 | 5.31075 | 1.1E-10 | 4.5E-07 | L-alanina Deshidrogenasa(ald) |
| Rv3290c | 3.24044 | 9.4508 | 6.4E-08 | 8.5E-05 | L-lisina-epsilon aminotransferasa (lat) |
| Rv1461 | 2.26648 | 4.81146 | 1.3E-07 | 0.00013 | Proteína hipotética |
| Rv3289c | 2.72082 | 6.59247 | 5.4E-07 | 0.00043 | Proteína transmembrana |
| Rv0188 | 2.12946 | 4.37554 | 2.5E-06 | 0.00167 | Proteína transmembrana |
| Rv3288c | 2.41308 | 5.32612 | 3.5E-06 | 0.00199 | Proteína hipotética (usfY) |
| Rv0886 * | -2.0718 | 0.23787 | 5.6E-06 | 0.00277 | Ferredoxin/Ferredoxin--NADP Reductase(fprB) |
| Rv0678 * | 2.03512 | 4.09856 | 1.5E-05 | 0.00556 | Proteína hipotética |
| Rv2035 | 2.46961 | 5.53894 | 2E-05 | 0.00621 | Proteína hipotética |

| | | | | | |
|--------|---------|---------|---------|---------|--|
| Rv0754 | 2.84031 | 7.16174 | 2.4E-05 | 0.00676 | Protein de la familia PE-PGRS PE_PGRS11 (PE_PGRS11) |
| Rv1460 | 2.29582 | 4.91032 | 0.00015 | 0.02166 | Regulador transcripcional |
| Rv1936 | 2.03855 | 4.10831 | 0.00049 | 0.04983 | Monooxigenasa |

Tabla 9 : Lista de DEGs log₂FC>2, FDR <0.05 de MTB-H37RV-WT en exposición a pH6PZA100 frente a pH7PZA0 (Top 12).

| Genes | logFC | FoldChange | PValue | FDR | Función |
|---------|---------|------------|-------------|-------------|--|
| Rv2780 | 2.65535 | 6.3 | 3.95359E-11 | 1.57274E-07 | L-alanina deshidrogenasa (ald) |
| Rv2323c | 2.87191 | 7.32033 | 4.14409E-09 | 8.24259E-06 | Proteína hipotética (Rv2323c) |
| Rv1461 | 2.74834 | 6.71943 | 8.94702E-09 | 1.18638E-05 | Proteína hipotética (Rv1461) |
| Rv0188 | 2.90253 | 7.47736 | 1.93295E-08 | 1.58963E-05 | Proteína transmembrana (Rv0188) |
| Rv3290c | 3.50607 | 11.3614 | 4.74523E-08 | 3.14609E-05 | L-lisina-épsilon aminotransferasa (lat) |
| Rv3289c | 3.15059 | 8.88021 | 1.20791E-07 | 5.39364E-05 | Proteína transmembrana (Rv3289c) |
| Rv1463 | 2.55814 | 5.8895 | 2.25475E-07 | 8.94476E-05 | Transportador ABC de proteína transportadora de ATP (Rv1463) |
| Rv3288c | 2.98437 | 7.91381 | 2.57806E-07 | 8.94476E-05 | Proteína hipotética (usfY) |
| Rv2035 | 3.43735 | 10.8329 | 2.69827E-07 | 8.94476E-05 | Proteína hipotética (Rv2035) |
| Rv3269 | 2.49129 | 5.6228 | 3.56739E-07 | 0.000109162 | Proteína hipotética (Rv3269) |
| Rv2322c | 2.37004 | 5.16955 | 5.5021E-07 | 0.000145916 | RocD1 (ornitina - oxoácido aminotransferasa) |
| Rv1772 | 2.28736 | 4.88162 | 2.71664E-06 | 0.000514609 | Proteína hipotética (Rv1772) |

DEGs en la cepa resistente (H37Rv-pncAKO).

Los resultados mostraron que la cepa H37RVpncAKO no generó DEGs ante la presencia de PZA, tanto en pH7 como en pH6, excepto el gen Rv1804c expresado tanto en pH6PZA0 como en pH6PZA100 en todas las cepas. Por otro lado solo H37Rv-pncAKO mostró DEGs en pH6PZA0, 6 genes down-regulated y 2 genes up-regulated siendo estos junto a Rv1804c los únicos con DEGs en esta cepa.

Figura 19: Volcano plot los DEGs ante la ausencia y presencia de PZA. A) Volcano plot de los DEGs de MTB-H37RVpncAKO en pH6PZA0 (PZA ausente). B) Volcano plot de los DEGs de MTB-H37RVpncAKO en exposición a pH6PZA100.

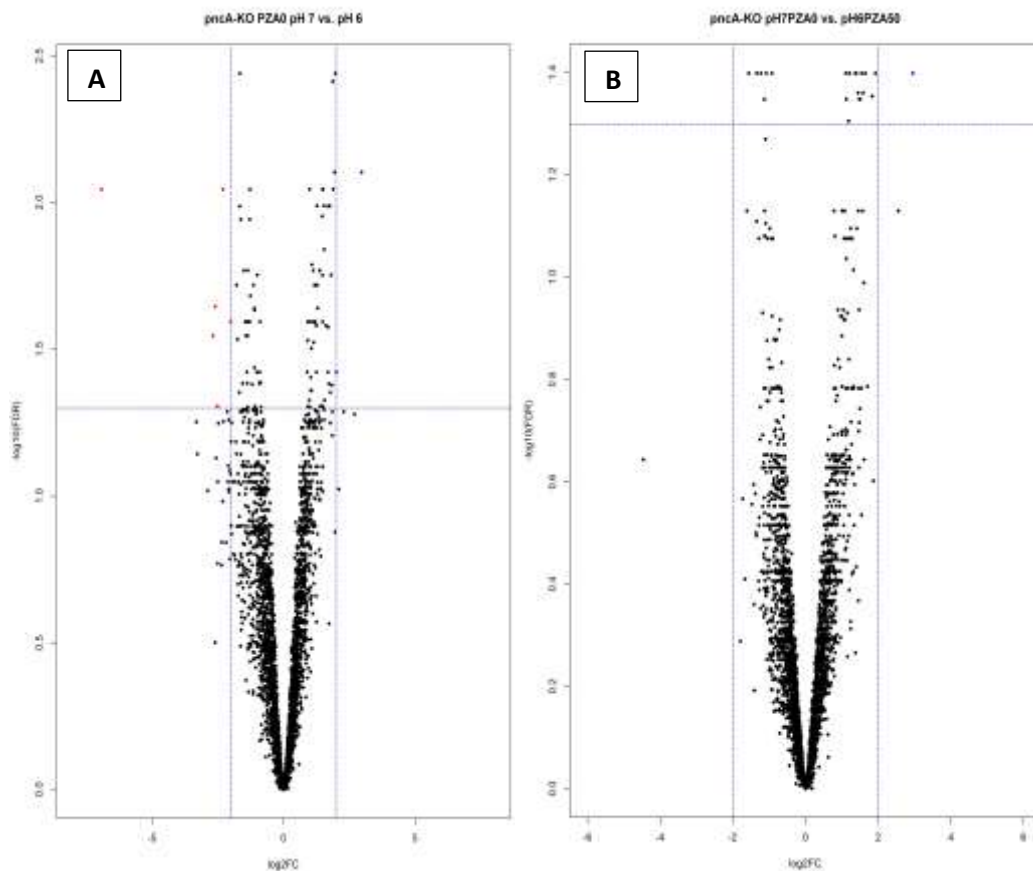


Tabla 10 : Lista de DEGs log₂FC>2, FDR <0.05 de MTB-H37RVpncAKO en pH6PZA0 frente a pH7PZA0.

| Genes | logFC | FoldChange | PValue | FDR | Función |
|---------|---------|------------|------------|-------------|---|
| Rv1804c | 2.96992 | 7.8349296 | 9.9071E-06 | 0.007882074 | Proteína hipotética |
| Rv2384 | -2.3055 | 0.2022926 | 1.8559E-05 | 0.009001256 | 2,3-dihidroxibenzoato-AMP ligasa (mbtA) |
| Rv2666 | -6.9217 | 0.0082485 | 2.7153E-05 | 0.009001256 | Mutator family transposase |
| Rv0368c | -2.5924 | 0.1658077 | 0.00020996 | 0.02257394 | Proteína hipotética |
| Rv2377c | -2.0108 | 0.2481413 | 0.00032625 | 0.025451189 | Proteína hipotética |
| Rv2813 | -2.6874 | 0.1552385 | 0.00041042 | 0.028422483 | Proteína hipotética |
| Rv2466c | 2.01292 | 4.0359697 | 0.00063153 | 0.037840791 | Proteína hipotética |
| Rv3912 | -2.517 | 0.1747049 | 0.00112878 | 0.049468901 | Factor anti-sigma-M RsmA (Rv3912) |

Tabla 11 : Lista de DEGs log₂FC>2, FDR <0.05 de MTB-H37RVpncAKO en pH6PZA100 frente a pH7PZA0

| Genes | logFC | FoldChange | PValue | FDR | Función |
|---------|---------|------------|-------------|------------|---------------------|
| Rv1804c | 2.95253 | 7.74107 | 1.30933E-05 | 0.03991383 | Proteína hipotética |

DEGs en las cepas clínicas resistentes.

Los resultados mostraron que tanto la cepa SLM059C1 como la cepa TBCON464C9 evidenciaron DEGs ante la presencia de PZA solo en la condición pH6PZA100, de esta manera no se registró ningún DEGs en pH7PZA100 ni ante pH6PZA0 en referencia a la condición basal. Se registraron también en cada cepa clínica DEGs exclusivos a pH6PZA100 y comunes en ambas cepas clínicas, así mismo otros genes con DE comunes a H37RV-WT.

Figura 20: Volcano plot los DEGs ante la exposición de PZA. A) Volcano plot de los DEGs de MTB-SLM059C1 en exposición a pH6PZA100. B) Volcano plot de los DEGs de MTB-TBCON464C9 en exposición a pH6PZA100.

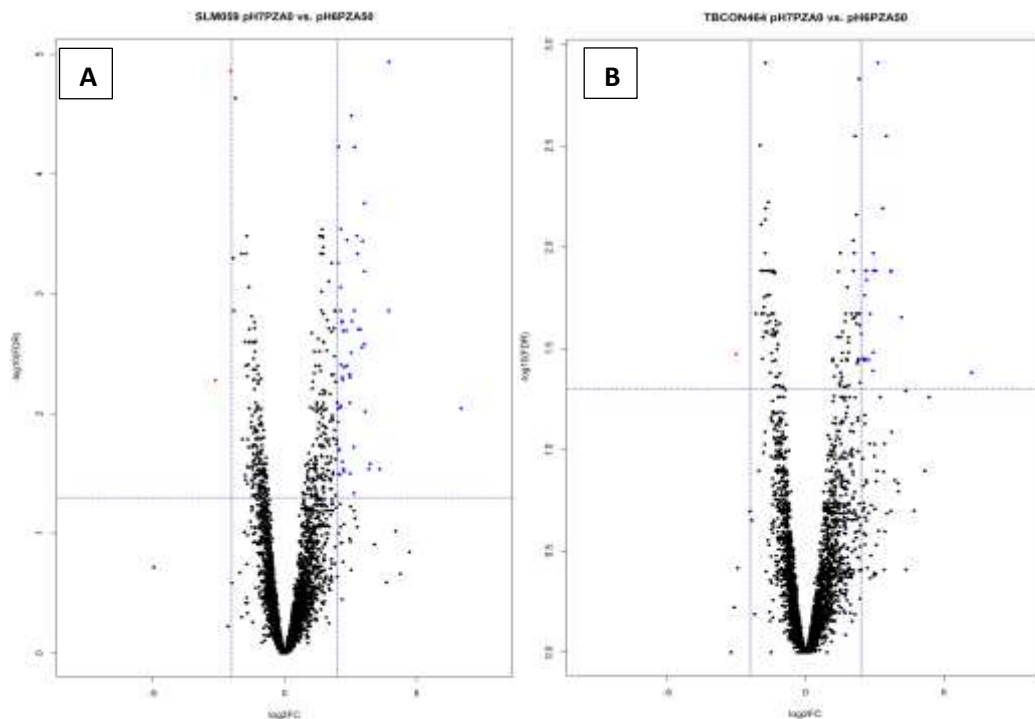


Tabla 12 : Lista de DEGs $\log_2FC > 2$, $FDR < 0.05$ de SLM059C1 en pH6PZA100 frente a pH7PZA0. (Top12).

| genes | logFC | FoldChange | PValue | FDR | Función |
|---------|---------|------------|-------------|-------------|--|
| Rv2035 | 3.9559 | 15.5183 | 2.91092E-09 | 1.15796E-05 | Proteína hipotética (Rv2035) |
| Rv2978c | -2.0409 | 0.243 | 6.95053E-09 | 1.38246E-05 | Transposasa (Rv2978c) |
| Rv2763c | 2.52785 | 5.76713 | 3.27242E-08 | 3.25442E-05 | Dihidrofolato reductasa (dfrA) |
| Rv0837c | 2.65742 | 6.30905 | 8.96222E-08 | 5.9422E-05 | Proteína hipotética (Rv0837c) |
| Rv0806c | 2.04649 | 4.131 | 8.96259E-08 | 5.9422E-05 | Exopolisacárido fosfotransferasa CpsY (cpsY) |
| Rv1994c | 3.01677 | 8.09351 | 3.07694E-07 | 0.000174858 | Regulador transcripcional de tipo HTH CmtR (cmtR) |
| Rv3571 | 2.12673 | 4.36727 | 6.51795E-07 | 0.000288093 | Subunidad de 3-cetoesteroide-9-alfa-hidroxilasa reductasa (kshB) |

| | | | | | |
|---------|---------|---------|-------------|-------------|---|
| Rv3527 | 2.7434 | 6.69648 | 1.00624E-06 | 0.000328232 | Proteína hipotética (Rv3527) |
| Rv3574 | 2.36158 | 5.13932 | 1.33852E-06 | 0.000354977 | Regulador transcripcional de tipo HTH KstR (kstR) |
| Rv0766c | 2.95518 | 7.75531 | 1.46391E-06 | 0.000363964 | Citocromo P450 Cyp123 (cyp123) |
| Rv1048c | 2.75327 | 6.74242 | 2.30205E-06 | 0.000461413 | Proteína hipotética (Rv1048c) |
| Rv1990c | 2.02029 | 4.05666 | 3.3394E-06 | 0.000552835 | Regulador transcripcional (Rv1990c) |

Tabla 13 : Lista de DEGs log₂FC>2, FDR <0.05 de TBCON464C9 en pH6PZA100 frente a pH7PZA0 (Top 12).

| Genes | logFC | FoldChange | PValue | FDR | Función |
|---------|---------|------------|-------------|-------------|---|
| Rv3570c | 2.6191 | 6.14367 | 4.69572E-07 | 0.001229305 | Subunidad de oxigenasa monooxigenasa dependiente de flavina HsaA (hsaA) |
| Rv2395A | 2.91473 | 7.54085 | 3.18377E-06 | 0.002831364 | Proteína AprA regulada por ácidos y fagosomas (aprA) |
| Rv2108 | 2.7853 | 6.89379 | 1.45628E-05 | 0.006436753 | Proteína de la familia PPE PPE36 (PPE36) |
| Rv2107 | 2.4528 | 5.47477 | 4.8407E-05 | 0.010697949 | Proteína de la familia PE PE22 (PE22) |
| Rv3526 | 2.17301 | 4.50963 | 6.49185E-05 | 0.013061036 | 3-cetoesteroide -9-alfa-hidrolasa |
| Rv0467 | 2.44961 | 5.46269 | 7.35635E-05 | 0.013061036 | Isocitrato liasa (icl1) |
| Rv3530c | 2.53397 | 5.79163 | 8.60962E-05 | 0.013061036 | Oxidoreductasa (Rv3530c) |
| Rv3825c | 2.20113 | 4.5984 | 8.73508E-05 | 0.013061036 | Ácido ftioceránico / hidroxoftioceránico sintasa (pks2) |
| Rv3529c | 3.08921 | 8.51027 | 9.52162E-05 | 0.013061036 | Proteína hipotética (Rv3529c) |
| Rv3824c | 3.08199 | 8.46784 | 0.000102595 | 0.013207644 | Aciltransferasa (papA1) |
| Rv3018c | 2.2066 | 4.61586 | 0.00012787 | 0.014533335 | Proteína de la familia PPE PPE46 (PPE46) |
| Rv3823c | 2.13679 | 4.39784 | 0.000168925 | 0.017230384 | Proteína de transporte de membrana integral MmpL8 (mmpL8) |

8.5.2.3 Comparación de DEGs entre cepas.

Entre los DEGs se registraron tanto genes exclusivos de cada condición como genes compartidos entre cepas y condiciones de exposición. La mayoría de DEGs corresponden a la condición pH 6PZA100, siendo mayor el número de genes exclusivos por cepas que el número de genes compartido entre ellas (Figura 21).

Figura 21. Diagrama de Edward de DEGs ante PZA y pHs en las cepas.

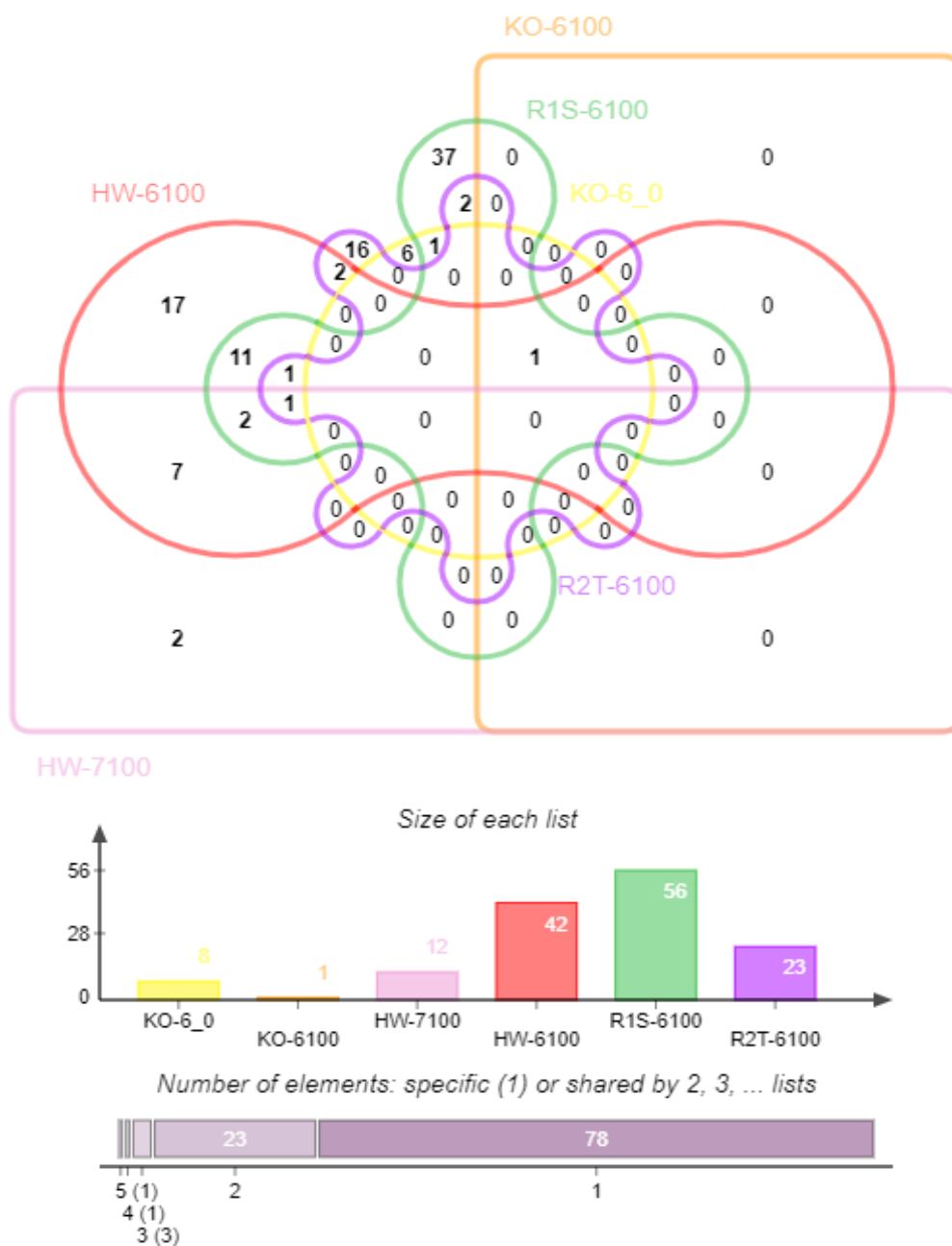


Tabla 14: DEGs en exposición a pH6 100µg/ml PZA en común entre las cepas.

| H37Rv-WT ∩ SLM059C1 | H37Rv-WT ∩ TBCON464C9 | SLM059C1 ∩ TBCON464C9 | H37Rv-WT ∩ SLM059C1 ∩ TBCON464C9 |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|
| Rv3288c* | Rv2107 | Rv3527 | Rv2035 |
| Rv2660c | Rv2108 | Rv0341 | Rv1806 |
| Rv2633c | | | Rv1804c ** |
| Rv2661c | | | |
| Rv2086 | | | |
| Rv1936* | | | |
| Rv1735c | | | |
| Rv1994c | | | |
| Rv1909c | | | |
| Rv2036 | | | |
| Rv2034 | | | |
| Rv3406 | | | |
| Rv1801 | | | |

*Expresado también en H37Rv-WT en exposición a pH7 PZA100µg/ml.

**Expresado también en H37RV-pncAKO en exposición a pH6 PZA100µg/ml.

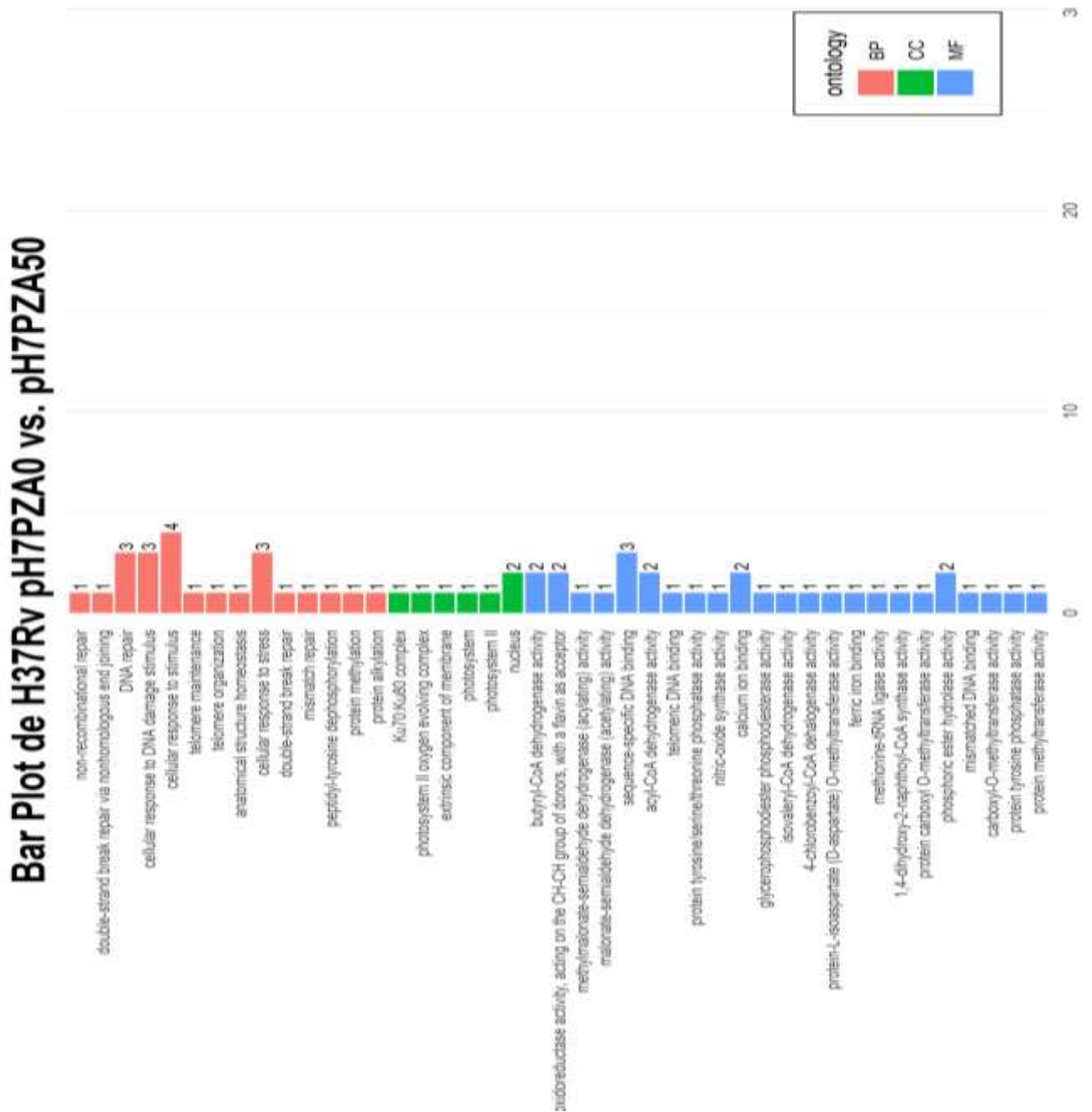
8.5.3 Análisis de enriquecimiento de vías

Cepa sensible H37RV-WT

Los resultados mostraron que la cepa H37Rv-WT vinculado a pH7PZA100 presentó en la categoría “procesos biológicos (BP)” genes en su mayoría asociados a reparación de ADN, respuesta a daño de ADN, respuesta a estrés; en la categoría “compartimento celular (CC)” genes asociados al compartimento nuclear y finalmente en la categoría “función molecular (MF)” se registraron genes asociados a las actividades deshidrogenasa butiril-CoA, oxido-reductasa con un flavin como

aceptor, unión de ADN de secuencia específica, deshidrogenasa acil-CoA, unión de iones de Calcio e hidrolasa de éster fosfórico.

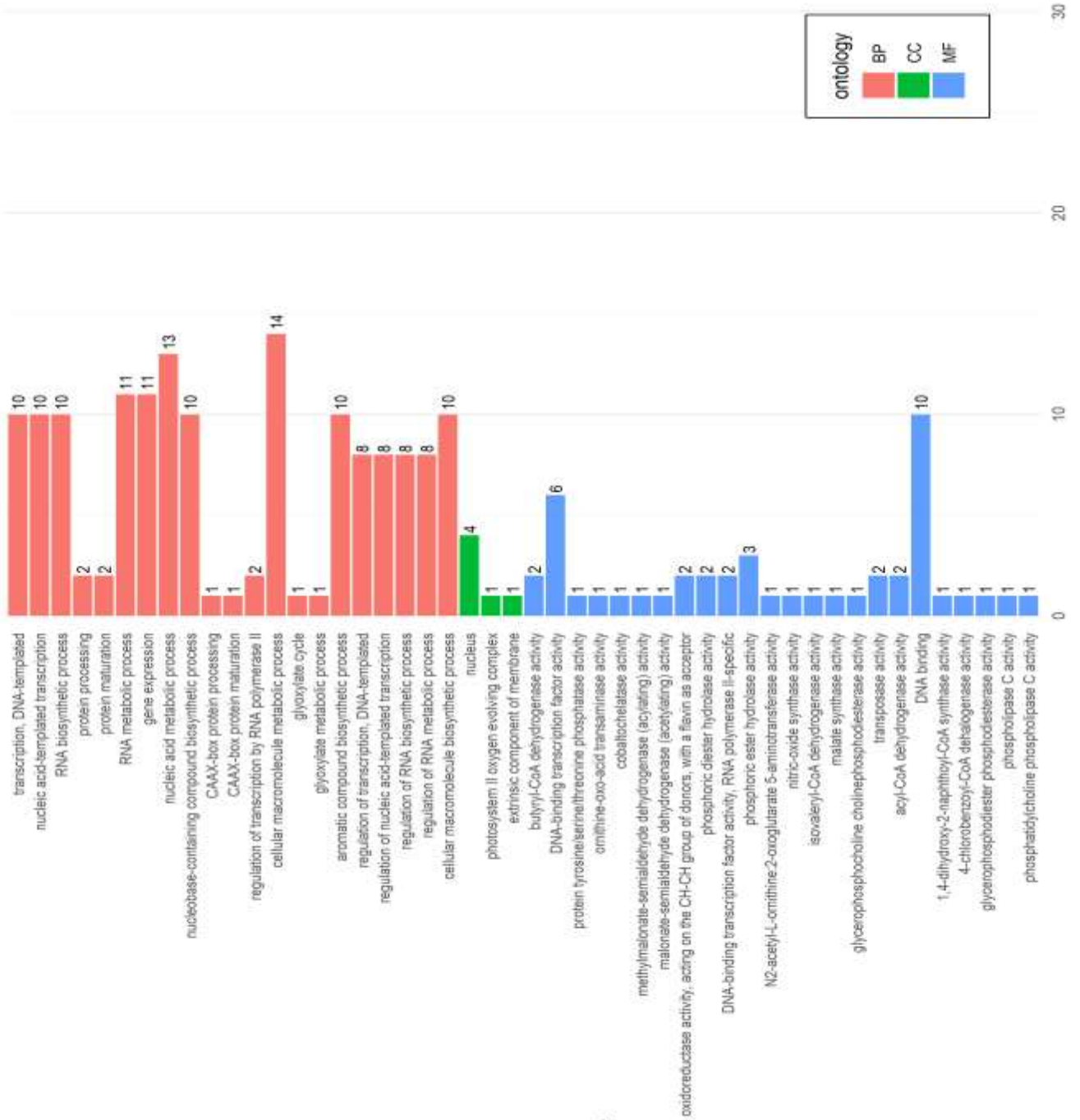
Figura 22: DEGs en H37RV WT vinculados a pH7PZA100 en las categorías MF, BP, CC.



Los resultados mostraron que H37Rv-WT vinculado a pH6PZA100 presentó un mayor número de DEGs a diferencia de pH7PZA100. Para la categoría BP en promedio fueron 7 genes por función estos fueron: transcripción-DNA molde, biosíntesis y metabolismo de ARN, metabolismo de ácidos nucleicos, biosíntesis de compuestos que contienen nucleobase, metabolismo y biosíntesis de macromolécula, biosíntesis de compuestos aromáticos, regulación de transcripción-ADN molde, regulación de ácidos nucleico-ADN molde, regulación de la transcripción del ácido nucleico molde, biosíntesis y metabolismo de regulación de ARN. En el caso de la categoría MF en promedio se registraron 2 genes por función asociados a actividad deshidrogenasa butiril CoA, óxido reductasa con un flavin como aceptor, fosfórico diester hidrolasa, factor de transcripción de unión de ADN (RNA polimerasa II), actividad transposasa, deshidrogenasa acyl CoA, fosfórico ester hidrolasa y finalmente en la categoría CC genes asociados al compartimento nuclear.

Figura 23: DEGs en H37RV WT vinculados a pH6PZA100 en las categorías MF, BP, CC.

Bar Plot de H37Rv pH7PZA0 vs. pH6PZA50

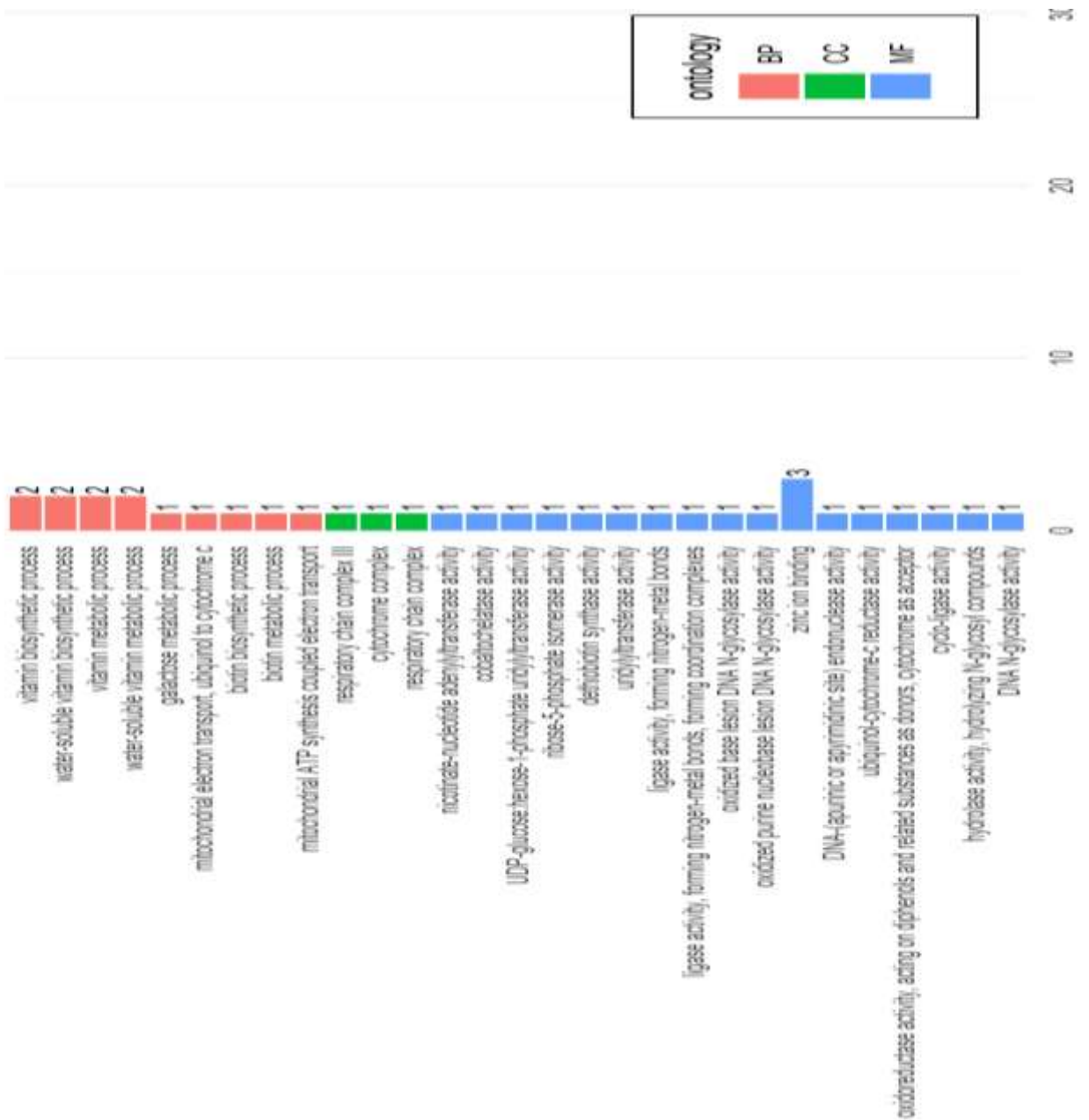


Cepa resistente MTB-H37RV *pncAKO*

Los resultados mostraron en H37Rv-*pncAKO* vinculado a pH6PZA0, en la categoría BP genes asociados a biosíntesis y metabolismo de vitaminas; en la categoría MF genes asociados a unión de ion Zinc, y finalmente en CC 1 gen vinculado a complejo de cadena respiratoria III , complejo citocromo.

Figura 24: DEGs en H37RV-*pncAKO* vinculado a pH6PZA0, en las categorías MF,BP, CC.

Bar Plot de *pncA-KO* PZA0 pH7 vs. pH6

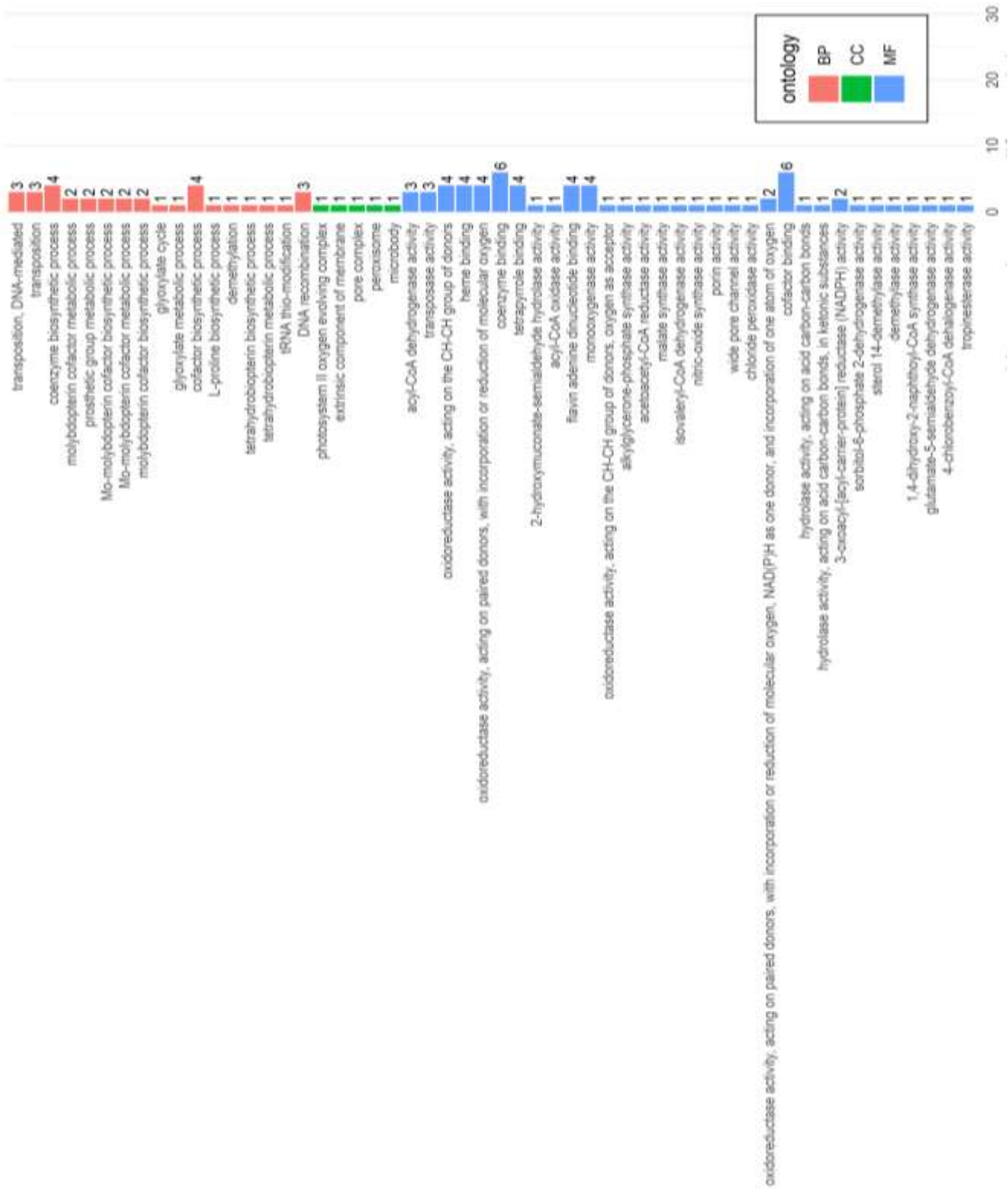


Cepas clínicas resistentes

Los resultados mostraron que la cepa SLM059C1 vinculado a pH6PZA100 mostró en promedio de 2 genes por función en cada categoría. De esta manera en la categoría BF más de 1 gen vinculado a actividad transposición mediado por ADN, biosíntesis de coenzima, proceso metabólico de cofactor molibdopterin, proceso metabólico de grupo prostético, proceso biosintético y metabólico de cofactor Molibdopterin, proceso biosintético de cofactor, recombinación de ADN; en la categoría MF se observó 2 o más genes vinculados a las actividades acil-CoA deshidrogenasa, transposasa, actividad oxidorreductasa, unión heme, unión de coenzima, unión de tetrapirrole, unión de flavin adenine dinucleótido (FAD), actividad monooxidase, actividad oxidorreductasa NADP(H) como donador de oxígeno, union de cofactor, 3 oxoacyl-acyl carrier protein reductasa NADPH; finalmente en CC se muestra solo 1 gen en complejo de fotosistema II de evolución de oxígeno, componente extrínseco de membrana, complejo poroso, peroxisoma y microcuerpos.

Figura 25: DEGs en SLM059C1 vinculado a pH6PZA100 en las categorías MF, BP, CC.

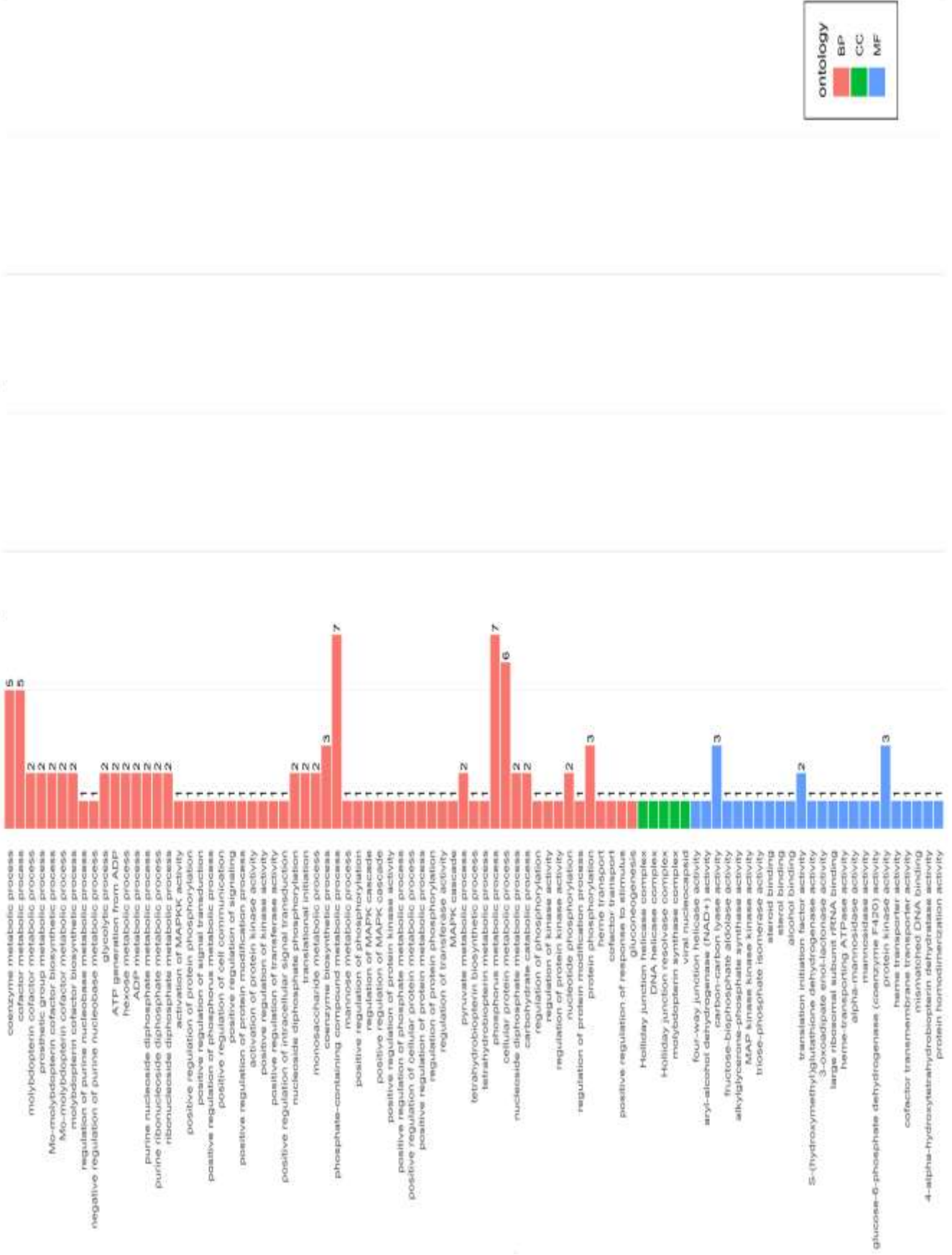
Bar Plot de SLM059 pH7PZA0 vs. pH6PZA50



Los resultados mostraron que la cepa TBCON464C9 vinculado a pH6PZA100 presentó en la categoría BP genes vinculados biosíntesis y metabolismo de coenzima, proceso metabólico y biosíntesis cofactor molibdopterina, metabolismo de grupo prostético, proceso biosintético y metabólico de cofactor MO-molibdopterin, proceso glicolítico, generación de ATP a partir de ADP, metabolismo de hexosa, metabolismo de ADP, metabolismo de purina nucleósido di-fosfato, metabolismo de purina ribonucleósido di-fosfato, nucleósido difosfato fosforilación, iniciación traduccional, proceso metabólico monosacárido, proceso biosintético de coenzima, metabolismo de compuestos conteniendo fosfatos, metabolismo de piruvato, proceso metabólico nucleósido difosfato, proceso catabólico de carbohidrato, fosforilación de proteína, en la categoría MF actividad liasa, actividad quinasa y 1 gen vinculado CC complejo DNA helicasa, complejo molibdopterin sintetasa.

Figura 26: DEGs en TBCON 464 C9 vinculado a pH6PZA100 en las categorías MF,BP, CC.

Bar Plot de TBCON464 pH7PZA0 vs. pH6PZA50



IX. DISCUSIÓN

La resistencia a PZA hasta ahora se ha explicado por mutaciones en el gen *pncA* y su región promotora, evento que ocasiona una nula o ineficiente actividad enzimática de PZAsa, proteína encargada de transformar PZA en POA (Ramirez-Busby & Valafar, 2015) la cual actúa como principio activo bactericida (Ying Zhang & Mitchison, 2003). Actualmente existe entre un 10% a 25% de casos de resistencia a PZA que el modelo actual no explica (Li et al., 2021) (Rodwell et al., 2017), reportándose en la actualidad cepas resistentes a PZA con gen *pncA* sin y con mutaciones con actividad enzimática similar a la reportada en la cepa H37RV-WT (Ramirez-Busby & Valafar, 2015), sugiriéndose mecanismos alternos involucrados a la resistencia a PZA (Rodwell et al., 2017). Debido al porcentaje bajo de estos casos, el número de cepas clínicas empleadas para este estudio fue de 2 cepas las cuales cumplieron con las características requeridas.

Esta investigación con la finalidad de explorar la expresión genética en respuesta a PZA y conocer probables mecanismos alternos de resistencia que no involucren pérdida de actividad enzimática de PZAsa (Ramirez-Busby & Valafar, 2015), evaluó a través de NGS el transcriptoma de 4 cepas: H37RV-WT cepa de referencia sensible a PZA (*pncA*-WT y actividad enzimática positiva) como control positivo, cepa H37RV-pncAKO resistente a PZA (carente de *pncA*, sin actividad enzimática) como control negativo y 2 cepas clínicas: SLM059C1 (*pncA* A102V) y TBCON464C9 (*pncA* V125F) ambas resistentes a PZA (con actividad enzimática similar a la cepa H37RV-WT). Cabe destacar que las cepas clínicas difieren fenotípicamente en las concentraciones de POA extracelular emitidos; mientras la cepa SLM059C1 no registró incremento de POA extracelular a las 72 h de

evaluación, TBCON464C9 emitió 0.066 mM, la tercera parte de la concentración de POA emitida por H37RV-WT (20 mM). Por otra parte la conocida relación existente entre un bajo eflujo de POA y resistencia a PZA (Zimic et al., 2012) fueron características también consideradas en las cepas de este estudio, esta investigación pretende además explorar posibles diferencias en la expresión genética vinculadas a este rasgo fenotípico, relacionado a ciertos genes inducidos y/o reprimidos como parte de un mecanismo alterno.

El estudio exploró los cambios transcripcionales mediados por la presencia de PZA a fin de entender y asociar su expresión génica a probables vías alternas que expliquen su fenotipo de resistencia no convencional a PZA, a pesar de las diferencias en los perfiles transcriptómicos propios del acervo genético de cada cepa (Rodwell et al., 2017). Todas las cepas resistentes fueron evaluadas a 100 µg/ml de PZA, solo H37RV-WT a pH 6 fue expuesta a 50 µg/ml debido a su susceptibilidad a PZA (MIC 100 µg/ml) a pH 6. Así mismo es importante señalar que todos los resultados pre-secuenciamiento y post-secuenciamiento cumplieron con los estándares de calidad sugeridos. Cabe indicar también que aunque las muestras fueron secuenciadas en diferentes grupos de secuenciamiento no se evidenció “batch effect” o efecto por grupo. Los resultados del PCA (PC1 18.08%, PC2 15.09%) mostraron un ligero agrupamiento determinado por cepas, y ninguno por grupo de secuenciamiento. Así mismo es importante señalar que el análisis de variabilidad mostró un valor de BCV ascendente a 0.25, valor muy cercano a la variabilidad aceptada en trabajos con individuos genéticamente idénticos. Por otra parte se trabajó con un promedio de 5.5 millones de reads por muestra asegurando la profundidad y cobertura requerida (Y. Wang et al., 2011).

Coincidiendo con los resultados de PCA los resultados de MDS mostraron también un ligero agrupamiento por cepa y valores similares que explican la variabilidad de la data. En ambos análisis en el componente o dimensión 2, la cepa SLM059C1 (actividad enzimática positiva, POA extracelular negativa), se distancia de las otras cepas, indicando una respuesta transcripcional diferente. El análisis MDS por su parte muestra en la dimensión 1 una ligera separación entre la cepa H37RV-WT (cepa sensible) y las cepas H37RV-*pncAKO*, TBCON464C9, SLM059C1 (cepas resistentes), probablemente relacionada a la susceptibilidad a PZA.

Cabe destacar también que el PCA-plot evidenció un ligero agrupamiento entre las cepas H37RV-WT y TBCON464-C9 ambas cepas con actividad enzimática positiva y POA extracelular positiva; por otro lado existió un distanciamiento polarizado entre la cepa SLM059C1 y H37RV-*pncAKO*, ambas con POA extracelular negativo, pero con actividad enzimática positiva y negativa respectivamente, sugiriéndose un probable efecto sobre la expresión génica de las cepas evaluadas mediado por la presencia de POA, su capacidad de emisión o no al medio extracelular y su acervo genético.

Coincidiendo con los resultados de DEGs, estos correspondieron en su mayoría a cepas con *pncA* funcional expuestas a PZA. Los resultados obtenidos del análisis de expresión diferencial RNA-seq mostraron distintas abundancias de DEGs dependiendo la cepa y la condición de evaluación. H37Rv-*pncAKO*, control negativo, fue la única cepa que mostró un bajo número de DEGs todas inducidas en la condición pH6PZA0 con excepción de Rv1804c gen inducido en pH6PZA100 en todas las cepas. Del total de DEGs hallados en H37RV-*pncAKO*, 2 fueron up-regulated Rv1804c, proteína hipotética reportada como antígeno (Ben Amor et al.,

2005) y Rv2466c, proteína hipotética regulada transcripcionalmente ante estrés oxidativo (Rosado et al., 2017); y 6 fueron down-regulated, entre las que se encontraron 3 proteínas hipotéticas relacionadas a respiración aerobia, biosíntesis de sideróforos y virulencia (Buchko, Kim, Terwilliger, & Myler, 2010), Rv2384 una AMP ligasa (*mbtA*) involucrada en la síntesis de sideróforos (Qiao et al., 2007), Rv2666 una transposasa y Rv3912 un factor anti-sigma-M (RsmA) represor del factor SigM involucrada en la defensa contra estrés oxidativo (Sklar, Makinoshima, Schneider, & Glickman, 2010), todas reprimidas. Sugiriéndose que la nulidad del gen *pncA* y/o ausencia de POA estarían ligados a la supresión de algunos factores de virulencia en H37Rv-pncAKO.

Los resultados obtenidos del análisis de enriquecimiento de vías para la cepa H37RV-pncAKO muestra síntesis de vitaminas, ATP acoplado a transportador de electrones (citocromo c – complejo III), así como funciones moleculares involucrados a reparación de ADN, metabolismo energético entre otros. Probablemente genes asociados a un mecanismo de respuesta a daño contra estrés, o adaptación a un medio adverso, en este caso generado por un entorno ácido (pH6) y/o presencia de PZA en H37Rv-pncAKO.

En H37Rv-WT los genes vinculados a la condición pH7 PZA100, también fueron vinculados a pH6PZA100 lo que apoya la existencia de una respuesta mediada por PZA independientemente del pH 7 o pH 6 al que fue sometida H37RV-WT, cabe resaltar, sin embargo que genes exclusivos a estas condiciones fueron también registradas. Así en H37Rv-WT tanto a pH 6 como pH 7 a 100ug/ml de PZA el regulon *LprA/lat* (Cortes et al., 2013) conformado Rv3288c, Rv3289c, Rv3290c (Duan et al., 2016) junto a otros como Rv0188 y Rv2034 este último expresado solo

en pH6 PZA100 fueron algunos de los DEGs hallados en esta investigación y reportados también en otro trabajo además de los genes Rv0467, Rv2323c con DE reportadas en esta investigación en las cepas clínicas; todas up-regulated en un modelo de crecimiento de limitado nutrientes, estableciéndose su DE a un cambio de fase de replicativa a no replicativa y asociándose este evento a un fenotipo de susceptibilidad o tolerancia a drogas, lo que explicaría los regímenes terapéuticos largos actualmente requeridos para la eliminación de MTB (Cortes et al., 2013).

Rv1460, Rv1461, Rv1462 y Rv1463 son parte del clúster sistema [Fe-S] conformado por 7 genes, asociados a la supervivencia de MTB en entornos con escasas de hierro y estrés oxidativo (Daffe & Saves, 2005). En apoyo a los resultados hallados en esta investigación un trabajo transcripcional en H37RV y una cepa clínica reportó también la up-regulated del cluster [Fe-S], citocromos, entre otros genes ante la exposición a la droga delamanida. Vinculándose esta respuesta a la presencia de especies de oxígeno reactivas (probablemente producidos en su activación como monóxido de nitrógeno), ello apoyado a una similitud de respuestas transcripcionales reportadas en otro trabajo frente a la droga pretomanida y KCN. Los resultados hallados en esta investigación frente a PZA son similares a algunos genes expresados en la investigación entorno a delamanida, hallándose también en común a esta investigación como los genes up-regualted Rv3288c, Rv3289c, Rv3890c, entre otros (Bossche et al., 2020). Sugiriéndose que un efecto similar al de las drogas delamanida, pretomanida podría estar ocurriendo ante la exposición a PZA en MTB, de esta manera los genes hallados en común en estos trabajos de investigación podrían explicar un posible similar mecanismo de acción de PZA relacionado a especies reactivas con acción bactericida en entornos

de acidez (Manjunatha, Boshoff, & Barry, 2009). Así también se indujo el gen Rv2780 una alanina deshidrogenasa involucrada en la metabolización de alanina como fuente de nitrógeno en condiciones hipóxicas y de limitado nutrientes por homeostasis de NADH/NAD⁺, así inhibidores de Rv2780 junto a inhibidores de respiración de MTB como bedaquilona están siendo sugeridas contra MTB (Jeong & Oh, 2019). RV0678 codifica al represor de la bomba de eflujo MmpS5-MmpL5 que sobreexpresada origina la salida excesiva de la droga bedaquilona generando resistencia por salida del fármaco; mutaciones en su gen codificante están relacionadas a resistencia a bedaquilona. (Milano et al., 2009) (Yang et al., 2020). En esta investigación Rv0678 ha sido inducida exclusivamente en H37Rv-WT en exposición a PZA, sugiriéndose un bloqueo transcripcional de la bomba de eflujo MmpS5-MmpL5 en la cepa referencial, es importante señalar que en ausencia de POA como sucede en H37RV-KOpncA, no se evidencia sobreexpresión de este represor con lo que se presume que la presencia de POA induciría al represor en H37RV-WT, siendo esta una probable explicación a su susceptibilidad a PZA en pH 6 en la cepa sensible H37Rv-WT; no se descarta un probable evento inverso en las cepas resistentes a PZA, donde la salida de PZA podría estar efectuándose mediante MmpS5-MmpL5 ante la ausencia de sobreexpresión de RV0678. En apoyo al presente trabajo, una investigación de tipo transcripcional demostró que la sobreexpresión de la proteína MmpS5-MmpL5 asociada a mutaciones en el gen Rv0678 es la causa de resistencia a bedaquilona (Milano et al., 2009). Así mismo en otro trabajo transcripcional Rv1772 proteína de función desconocida fue inducida frente a isoniacida (INH), mutaciones en este gen están asociados a resistencia a INH, sugiriéndose que podría estar relacionada a respuesta de

toxicidad celular por INH, (Ramaswamy et al., 2003). En el presente trabajo la inducción de Rv1772 sugiere una respuesta en relación a radicales libres o toxicidad, en este caso mediado por PZA/POA, similar al visto en el mecanismo de INH y otras drogas (Wengenack et al., 2000).

Una de las diferencias en los distintos pHs en la que H37Rv-WT fue expuesto a PZA, fue el mayor número de DEGs registrado en pH 6 en comparación a pH 7 mostrando una mayor respuesta transcripcional de PZA en condiciones ácidas. Entre los genes inducidos solo a pH 6 PZA100 se encuentran Rv2322c, y Rv2323c ambos implicados en el metabolismo de arginina como fuente de nitrógeno y carbono para la formación de aminoácidos. Un trabajo recientemente realizado revela enriquecimiento de las vías de biosíntesis de arginina en cepas MDR en comparación con la H37Rv-WT (Tang et al., 2020). Según lo reportado en este presente trabajo estos genes estarían también involucradas a respuesta mediada por PZA/POA en medio ácido (Hampel, Huber, Geffers, & Spona-friedl, 2015).

Por otra parte cabe resaltar que algunos DEGs hallados en H37Rv-WT en exposición a PZA también fueron DE en SLM059C1 sugiriéndose una respuesta similar posiblemente involucrada a susceptibilidad a PZA. Entre los DEGs expresados en común entre H37Rv-WT y SLM059C1 se encuentran Rv3288c antes explicada, Rv1936 implicada en estrés oxidativo, Rv1994c un represor del sensor de metal de cadmio que modula los niveles de cadmio en la célula (Chauhan, Kumar, Singhal, Tyagi, & Prasad, 2005). Así mismo se registraron DEGs comunes entre H37Rv-WT y TBCON464C9 entre los genes con DE comunes se registraron los genes Rv2107 proteína PE y Rv2108 proteína PPE implicadas en la importación de hierro a partir del medio externo a MTB (Avishek Mitra, Alexander Speer, Kan

Lin, Sabine Ehrt, 2017). Curiosamente entre los genes con DE comunes entre H37Rv-WT y SLM059C1 y entre H37Rv-WT y TBCON46C9 se encuentran genes involucrados en la regulación de metales. Este trabajo propone una posible acción de las vías involucradas en la homeostasis de metales en respuesta a PZA que podrían estar relacionadas con su susceptibilidad al estar presente en las 2 cepas clínicas tanto como en H37Rv-WT.

Los resultados de vías de enriquecimiento de H37Rv-WT involucra DEGs en su mayoría ligada a funciones moleculares enzimáticas relacionadas a metabolismo de fuentes energéticas, activación de ADN, entre otros. Así mismos las vías de enriquecimiento evidencian genes ligados a procesos biológicos como reparación de ADN y respuesta celular a estrés. Los espacios o compartimentos ligados fueron fotosistema II, componente intrínseco de membrana y núcleo. Estos resultados reafirman las funciones o roles metabólicos de los DEGs hallados en esta condición para H37Rv-WT. Los resultados sugieren en H37Rv-WT DEGs asociados a procesos de defensa contra estrés, probablemente asociado a su sensibilidad ante la presencia de POA en el que componentes de membrana podrían estar involucrado.

Entre los genes con DE vinculado a pH6pza100, observado solo en la cepa SLM059C1 se encuentra Rv2763c implicada en la biosíntesis de folatos. Un reciente estudio *in silico* reportó mayor afinidad entre la proteína mutante RV2763 (E84G) y trimetoprima, un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (DHFR) codificada por el gen Rv2763 (*dfrA*) (Raju, Kulkarni, Ray, Rajan, & Degani, 2015). Así mismo otro trabajo de investigación demostró que la sobreexpresión de Rv2763c está asociada a resistencia a trimetoprima (F. Wang et al., 2010). Actualmente DHFR es considerada un posible target por su afinidad a varias drogas

con función inhibitoria como el ácido para-aminosalicílico (PAS), trimetoprima WR99210 (antimalárico), entre otras (Minato et al., 2015); así mismo la inhibición de DfrA o RibD pueden ser contrarrestadas con la sobreexpresión de estos genes (Minato et al., 2015). Un estudio estructural reveló que ciertos inhibidores de DHFR compiten con el sitio de unión de sustrato y que sustituciones en esta zona pueden cambiar la afinidad de estas drogas a DHFR (Sittikornpaiboon, Toochinda, & Lawtrakul, 2017). Otro estudio reveló en *E. coli* que la mutación DHFR-L28R conlleva a resistencia indirecta a trimetoprima por un mayor tiempo de unión del complejo sustrato-enzima (Abdizadeh et al., 2017). En el presente trabajo Rv2763c fue inducido ante pH 6 PZA100 solo en la cepa SLM059C1, sugiriéndose un probable efecto similar al de los inhibidores de DHFR por parte de PZA/POA sobre Rv2763c, siendo Rv2763c probable blanco de PZA/POA, cuya sobreexpresión podría ser una probable respuesta propia de esta cepa asociada a resistencia a PZA. Cabe resaltar también que una molécula derivada de INH mostró estructuralmente un rol inhibitorio sobre DHFR (Argyrou, Vetting, Aladegbami, & Blanchard, 2006). Así mismos fue up-regulated Rv1990c, sistema toxin-antitoxin sobreexpresado en entornos de estrés como ambiente hipóxico y de inanición (Keren et al., 2011) y Rv3574 (kstR) un represor regulador transcripcional relacionado al control del regulon kstR involucrados al metabolismo de lípidos relacionadas al colesterol, ácidos micólicos entre otros, y perteneciente a la familia TetR a la que también pertenece EthR, regulador del gen ethA, monooxigenasa que cataliza la activación de la droga etionamida. Así mismo el regulon kstR controla el gen propio de MTB conocido como *nat* (arilamina N-acetiltransferasa), mutantes carentes de este gen muestra problemas en la síntesis de ácidos micólicos; así

mismo la proteína NAT se une a la droga isoniazida de esta manera puede ser responsable de resistencia a antibióticos (Kendall et al., 2007), no descartándose en este estudio la posibilidad de la up-regulación de RV3574 principalmente en esta cepa la causa indirecta de resistencia a PZA.

Por otra parte entre los DEGs halladas solo en TBCON464C9 vinculados a pH6 PZA100 se encuentran RV3570c involucrado en la degradación de colesterol, Rv2395A codificada por el gen *aprA* (Acid and phagosome regulated protein A) vinculada a detección y supervivencia a medios ácidos constituyendo una ventaja adaptativa de esta cepa (Abramovitch, Rohde, Hsu, & Russell, 2011) (Baker, Dechow, & Abramovitch, 2019) y el clúster RV3823c, RV3824c, RV3825c enzimas importante en la síntesis de sulfolípidos, esta exclusividad en la cepa TBCON464C9 podría estar vinculado a una respuesta ante PZA en pH6 relacionado a resistencia a PZA. Los sulfolípidos son uno de los lípidos más relevantes de la pared celular; siendo el más abundante el sulfolípidos L1 (SL-1) cuya síntesis esta mediada por Rv3825c encargado de la síntesis de los ácidos hidroxoftioceránicos, uno de los ácidos grasos que junto a palmitato, sintetizada por FAS-I, conforman los ácidos grasos de SL-1; Rv3824c proteína de la subfamilia de las aciltransferasas responsable de la acilación de SL-1 y RV3823c, una proteína transmembrana encargada de su transporte (Bhatt, Gurcha, Bhatt, Besra, & Jacobs, 2007). En 2019 un estudio reportó inducción de algunos genes putativos de bombas de eflujo bajo influencia de rifampicina, aunque Rv3823c fue evaluada, no se halló para esta putativa bomba de eflujo correlación de resistencia con rifampicina, recomendándose mayor investigación (Narang et al., 2019). En este presente trabajo RV3823c mostró resultados de inducción ante la presencia de PZA en pH 6 en la

cepa TBCON464C9, por lo que su acción podría estar vinculada a PZA y no a RIF; así mismo junto a su cluster de genes involucrado en la síntesis de ácidos grasos de la pared celular que podría contribuir en el fenotipo de resistencia a PZA en esta cepa (Bhatt et al., 2007).

Es importante mencionar que algunos genes fueron DE en pH6PZA100 en ambas cepas clínicas resistentes, entre ellos principalmente están RV3527 cuyas mutaciones en su gen codificante están asociado a muerte del bacilo dentro de macrófago, además está involucrado en la supervivencia en medio ácido lo que supone una mejor adaptación de estas cepas a entornos ácidos (Pethe et al., 2004) y Rv0341 (*iniB*) en este caso con DE down-regulated. Rv0341 es inducido por un amplio número de drogas inhibitorias de síntesis de pared celular (INH, EMB), su represión se ha reportado por eventos biológicos de estrés que involucra presencia de peróxido de oxígeno, shock por calor, acidosis y drogas como kanamicina, ciprofloxicina y rifampicina, drogas no implicadas directamente con síntesis de pared celular. (Alland, Steyn, Weisbrod, & Aldrich, 2000). Por su parte otro trabajo de investigación reportó la represión de Rv0341 atribuida a Lsr2 (Rv3597c) histona que se une al DNA impidiendo la interacción transcripcional de algunas enzima-ADN (Hazbo et al., 2007). En este estudio RV3597c no es up-regulated ante PZA a pH 6 por lo que la causa de represión de Rv0341 podría estar vinculada a eventos de estrés posiblemente por exposición y acción de PZA/POA en pH 6; de esta manera la alta represión de RV0341 podría estar involucrado a la capacidad de sobrellevar la toxicidad en pH 6 de estas cepas resistentes a PZA. Los resultados en esta investigación muestran inducción por PZA de estos genes en medio ácido, lo que podría estar relacionado en ambas cepas clínicas resistentes a PZA, a una mayor

adaptabilidad dotada por estos genes a estas condiciones. Los resultados hallados en el presente trabajo sugieren que vías relacionados al metabolismo de lípidos y tolerancia a pH 6 podrían estar relacionadas a la resistencia a drogas como PZA. En apoyo a estos resultados un reciente trabajo en el 2020 determinó enriquecimiento de la vía de biosíntesis de ácidos grasos en cepas MDR en comparación con la H37RV (Tang et al., 2020).

Entre las vías de enriquecimiento para SLM059C1 figuran los DEGs implicados en procesos de biosíntesis de cofactor, coenzima, grupo prostético, biosíntesis y metabolismo de molibdopterina, y metabolismo de lípidos y las vías enriquecidas corresponden a acil-CoA deshidrogenasa, oxidorreductasa, monooxigenasa, unión heme, unión tetrapirrole, asociado a los compartimentos fotosistema II, componente extrínseco de membrana, complejo poroso y peroxisoma. Mientras en TBCON464C9 las vías enriquecidas fueron procesos de fosforilación, metabolismo de compuestos conteniendo fosfato y al igual que la cepa SLM059C1 biosíntesis de cofactor, coenzima, grupo prostético, biosíntesis y metabolismo de molibdopterina y actividades correspondientes a liasa, quinasa, transportador-heme ATPasa, cofactor de transportador transmembrana entre otros; asociado a complejo helicasa, complejo molibdopterina sintasa y complejo resolvasa. Estos resultados suponen vías de regulación mediada por fosforilación probablemente por acción de quinasas empleadas en procesos de regulación de adaptabilidad al medio (Prisic & Husson, 2014). Cabe mencionar el enriquecimiento de la vía de los procesos de síntesis de molibdopterina común en ambas cepas resistentes a PZA, cofactor ampliamente presente en enzimas de micobacterias implicadas en procesos como regulación de

latencia, metabolismo energético y de nitrógeno e implicados en procesos redox (T. Shi & Xie, 2011).

Todos los resultados hallados en este presente trabajo sugieren que existen genes involucrados en resistencia a PZA mecanismo alterno que no involucra ausencia de funcionalidad del gene *pncA*. Este estudio permitió evaluar en un ámbito amplio de genoma completo las respuestas de genes en exposición a PZA mediada por POA. La variación entre los genes hallados entre una cepa u otra evidencian las diversas respuestas vinculadas a resistencia a drogas, en este caso a PZA. Así mismo este trabajo permitió evaluar y postular la presencia de genes involucrados en vías metabólicas como regulación de metales y síntesis de lípidos que podrían explicar y contribuir en la resistencia a drogas como PZA, así como genes posiblemente de repercusión directa a resistencia a PZA como bombas de eflujo entre otros.

X. CONCLUSIONES

1. Se registraron DEGs ante exposición a PZA en todas las cepas con *pncA* funcional, independientemente de los pHs. En H37Rv-*pncAKO* carente del gen *pncA* no se registró DEGs en presencia de PZA, excepto Rv1804c; reforzando el accionar transcripcional de PZA sobre MTB.
2. Los DEGs ante PZA fueron promovidos mayoritariamente a pH6, en todas las cepas con *pncA* funcional, sugiriéndose una acción transcripcional mediada por POA principalmente en medio ácido.
3. Los DEGs promovidos por PZA en H37Rv-WT difirieron, pero no en su totalidad, de los genes con DEGs hallados en ambas cepas clínicas resistentes a PZA y éstas entre sí, posiblemente originado por el aporte genético intrínseco de cada cepa y el aporte extrínseco de cada cepa en respuesta transcripcional a PZA.
4. Los DEGs promovidos ante PZA en pH6 (condición bactericida) comunes entre las cepas clínicas resistentes, refuerzan el rol biológico de éstos, posiblemente relacionados a su resistencia a PZA, tales como genes de resistencia a acidez y metabolismo de lípidos; destacándose también en ambas cepas clínicas resistentes la vía de enriquecimiento de molibdopterina, todas ausentes en H37Rv, lo que hace presumir una mayor adaptabilidad en estas cepas a resistencia a PZA posiblemente mediado por estas vías.

5. Por otro lado DEGs comunes entre la cepa H37Rv-WT y las cepas clínicas sugieren sistemas de regulación de vías en respuesta a tolerancia a PZA, así se hallaron genes vinculados a regulación de metales comunes en H37Rv y ambas cepas resistentes a PZA.

6. Se hallaron genes potencialmente implicados en la resistencia a PZA en cada una de las cepas, sugiriéndose la existencia de una vía alterna de resistencia a PZA, entre los que destacan reguladores transcripcionales como Rv0678, regulon LprA/lat, Rv1460, Rv1461, Rv1462, Rv1463 del cluster sistema [Fe-S], Rv2763 dihidrofolato reductasa asociada a resistencia a drogas, Rv3823c una putativa bomba de eflujo, entre otros.

XI. RECOMENDACIONES

- Verificar mediante RT-qPCR los cambios de expresión de los genes hallados en este estudio, principalmente los hallados como potenciales candidatos.
- Realizar investigación complementaria del rol biológico de los genes hallados como potencialmente candidatos a resistencia a PZA.

LIMITACIONES

- Los casos de cepas con resistencia a PZA no explicados por el modelo actual son alrededor de 10% a 25%. De esta manera los resultados de la búsqueda en la base de datos del banco de cepas del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular (LBBM), LID-UPCH permitió previa verificación la selección de 2 cepas con las características fenotípicas requeridas. El número de cepas puede incrementar conforme la búsqueda se realice a partir de un banco de cepas con un mayor número de aislados clínicos.
- El presente estudio se realizó con 3 réplicas biológicas, siendo 3 el número mínimo requerido para trabajos de tipo NGS, así mismo el trabajo se restringió a solo las 2 cepas clínicas seleccionadas a partir del LBBM, LID-UPCH debido a los costos elevados del procedimiento experimental NGS (RNA-seq). Contando para este estudio con fondos económicos limitados. Obteniéndose un total de 48 perfiles transcriptómicos correspondiente a la evaluación de 4 cepas de MTB expuestas a 4 condiciones experimentales con 3 réplicas biológicas cada una.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdizadeh, H., Tamer, Y. T., Acar, O., Toprak, E., Atilgan, A. R., & Atilgan, C. (2017). Increased substrate affinity in the Escherichia coli L28R dihydrofolate reductase mutant causes trimethoprim resistance. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *19*(18), 11416–11428. <https://doi.org/10.1039/c7cp01458a>
- Abramovitch, R. B., Rohde, K. H., Hsu, F. F., & Russell, D. G. (2011). aprABC: A Mycobacterium tuberculosis complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome. *Molecular Microbiology*, *80*(3), 678–694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07601.x>
- Alarcón, V., Alarcón, E., Figueroa, C., & Mendoza-Ticona, A. (2017). Tuberculosis en el Perú: Situación epidemiológica, avances y desafíos para su control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, *34*(2), 299–310. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.342.2384>
- Alland, D., Steyn, A. J., Weisbrod, T., & Aldrich, K. (2000). Characterization of the Mycobacterium tuberculosis iniBAC Promoter , a Promoter That Responds to Cell Wall Biosynthesis Inhibition, *182*(7), 1802–1811.
- Argyrou, A., Vetting, M. W., Aladegbami, B., & Blanchard, J. S. (2006). Mycobacterium tuberculosis dihydrofolate reductase is a target for isoniazid. *Nature Structural and Molecular Biology*, *13*(5), 408–413. <https://doi.org/10.1038/nsmb1089>
- Avishek Mitra, Alexander Speer, Kan Lin, Sabine Ehrt, M. N. (2017). PPE Surface Proteins Are Required for Heme Utilization by Mycobacterium tuberculosis. *American Society Microbiology*, *8*(e01720), 16.
- Baker, J. J., Dechow, S. J., & Abramovitch, R. B. (2019). Acid Fasting: Modulation of Mycobacterium tuberculosis Metabolism at Acidic pH. *Trends in Microbiology*, *27*(11), 942–953. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.06.005>

- Barberis, I., Bragazzi, N. L., Galluzzo, L., & Martini, M. (2017). The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 58(1), E9–E12. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2017.58.1.728>
- Ben Amor, Y., Shashkina, E., Johnson, S., Bifani, P. J., Kurepina, N., Kreiswirth, B., ... Gennaro, M. L. (2005). Erratum: Immunological characterization of novel secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis (Scandinavian Journal of Immunology (2005) 61 (139-146)). *Scandinavian Journal of Immunology*, 61(3), 298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.1579b.x>
- Bhatt, K., Gurcha, S. S., Bhatt, A., Besra, G. S., & Jacobs, W. R. (2007). Two polyketide-synthase-associated acyltransferases are required for sulfolipid biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology*, 153(2), 513–520. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003103-0>
- Boshoff, H. I. M., Xu, X., Tahlan, K., Dowd, C. S., Pethe, K., Camacho, L. R., ... Barry, C. E. (2008). Biosynthesis and recycling of nicotinamide cofactors in Mycobacterium tuberculosis: An essential role for NAD in nonreplicating bacilli. *Journal of Biological Chemistry*, 283(28), 19329–19341. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800694200>
- Boshoff, H. I., Mizrahi, V., & Barry, C. E. (2002). Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *Journal of Bacteriology*, 184(8), 2167–2172. <https://doi.org/10.1128/JB.184.8.2167-2172.2002>
- Bossche, A. Van Den, Varet, H., Sury, A., Sismeiro, O., Bossche, A. Van Den, Varet, H., ... Legendre, R. (2020). Transcriptional profiling of a laboratory and clinical Mycobacterium tuberculosis strain suggests respiratory poisoning upon exposure to delamanid To cite this version : HAL Id : pasteur-02562412. *Tuberculosis*, 117, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2019.05.002>
- Briffotiaux, J., Liu, S., & Gicquel, B. (2019). Genome-wide transcriptional responses of Mycobacterium to antibiotics. *Frontiers in Microbiology*,

10(FEB), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00249>

- Buchko, G. W., Kim, C. Y., Terwilliger, T. C., & Myler, P. J. (2010). Solution structure of Rv2377c-founding member of the MbtH-like protein family. *Tuberculosis*, 90(4), 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.04.002>
- Cabanes, J., & Takami, H. (2017). Biochemical characterization of a new nicotinamidase from an unclassified bacterium thriving in a geothermal water stream microbial mat community, 1–22.
- Chauhan, S., Kumar, A., Singhal, A., Tyagi, J. S., & Prasad, H. K. (2005). Characterization of Rv1994c of *Mycobacterium tuberculosis* - a Nickel and Zinc Sensing SmtB / ArsR Regulator CmtR , a cadmium-sensing ArsR – SmtB repressor , cooperatively interacts with multiple operator sites to autorepress its transcription in *Mycobacte*, (October). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07066.x>
- Cheng, S. J., Thibert, L., Sanchez, T., Heifets, L., & Zhang, Y. (2000). pncA mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 528–532. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.528-532.2000>
- Cortes, T., Schubert, O. T., Rose, G., Arnvig, K. B., Comas, I., Aebersold, R., & Young, D. B. (2013). Genome-wide Mapping of Transcriptional Start Sites Defines an Extensive Leaderless Transcriptome in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Reports*, 5(4), 1121–1131. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.031>
- Daffe, M., & Saves, I. (2005). Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* SUF Machinery as the Exclusive Mycobacterial System of [Fe-S] Cluster Assembly : Evidence for Its Implication in the Pathogen ' s Survival, 187(17), 6137–6146. <https://doi.org/10.1128/JB.187.17.6137>
- De Almeida, I. N., Da Silva Carvalho, W., Rossetti, M. L., Costa, E. R. D., & De Miranda, S. S. (2013). Evaluation of six different DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by means of PCR-IS6110:

Preliminary study. *BMC Research Notes*, 6(1), 2–7.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-561>

De Welzen, L., Eldholm, V., Maharaj, K., Manson, A. L., Earl, A. M., & Pym, A. S. (2017). Whole-transcriptome and -genome analysis of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates identifies downregulation of *ethA* as a mechanism of ethionamide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(12), 1–12.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01461-17>

Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 5(1). <https://doi.org/10.4084/mjhid.2013.070>

den Hertog, A. L., Menting, S., Pfeldt, R., Warns, M., Siddiqi, S. H., & Anthony, R. M. (2016). PZA is active against *Mycobacterium tuberculosis* cultures at neutral pH with reduced temperature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(June), AAC.00654-16.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00654-16>

Dillon, N. A., Peterson, N. D., Feaga, H. A., Keiler, K. C., & Baughn, A. D. (2017). Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of trans-Translation and RpsA. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-06415-5>

Dillon, N. A., Peterson, N. D., Rosen, B. C., & Baughn, A. D. (2014). Pantothenate and pantotheine antagonize the antitubercular activity of pyrazinamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), 7258–7263.
<https://doi.org/10.1128/AAC.04028-14>

Duan, X., Li, Y., Du, Q., Huang, Q., Guo, S., Xu, M., ... Xie, J. (2016). *Mycobacterium* Lysine $\hat{\mu}$ -aminotransferase is a novel alarmone metabolism related persister gene via dysregulating the intracellular amino acid level. *Scientific Reports*, 6(February 2015), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/srep19695>

Fu, L. M., & Fu-Liu, C. S. (2002). Is *Mycobacterium tuberculosis* a closer relative

- to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens? *Tuberculosis*, 82(2–3), 85–90. <https://doi.org/10.1054/tube.2002.0328>
- Gene-mutated, N.-, Werngren, J., Alm, E., & Mansjö, M. (2017). crossm tuberculosis : Why Is That ?, 55(6), 1920–1927.
- Getahun, H., Matteelli, A., Chaisson, R. E., & Raviglione, M. (2015). Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *New England Journal of Medicine*, 372(22), 2127–2135. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1405427>
- Gupta, A., Kaul, A., Tsolaki, A. G., Kishore, U., & Bhakta, S. (2012). Mycobacterium tuberculosis: Immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*, 217(3), 363–374. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.008>
- Hampel, A., Huber, C., Geffers, R., & Spona-friedl, M. (2015). Mycobacterium tuberculosis Is a Natural Ornithine Aminotransferase (rocD) Mutant and Depends on Rv2323c for Growth on Arginine, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136914>
- Hazbo, M. H., Lee, C., Safi, H., Colangeli, R., Helb, D., Vilche, C., ... Alland, D. (2007). Transcriptional Regulation of Multi-Drug Tolerance and Antibiotic-Induced Responses by the Histone-Like Protein Lsr2 in M . tuberculosis, 3(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030087>
- Jeong, J. A., & Oh, J. Il. (2019). Alanine dehydrogenases in mycobacteria. *Journal of Microbiology*, 57(2), 81–92. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8543-7>
- Johnson, R., Streicher, E. ., Louw, G. ., Warren, R. ., Van Helden, P. D., & Victor, T. C. (2006). Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Curr. Issues Mol. Biol*, 8, 97–112.
- Kendall, S. L., Withers, M., Soffair, C. N., Moreland, N. J., Gurcha, S., Sidders, B., ... Stoker, N. G. (2007). A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium tuberculosis, 65, 684–699.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05827.x>

- Keren, I., Minami, S., Rubin, E., & Lewis, K. (2011). Characterization and Transcriptome Analysis of Mycobacterium tuberculosis Persisters, 2(3), 3–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00100-11>.Editor
- Keshavjee, S., & Farmer, P. E. (2012). Tuberculosis, Drug Resistance, and the History of Modern Medicine. *New England Journal of Medicine*, 367(10), 931–936. <https://doi.org/10.1056/nejmra1205429>
- Khan, M. T., Malik, S. I., Ali, S., Masood, N., Nadeem, T., Khan, A. S., & Afzal, M. T. (2019). Pyrazinamide resistance and mutations in pncA among isolates of Mycobacterium tuberculosis from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3764-2>
- Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2016). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor Protocol*, 2015(11), 951–969. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970.RNA>
- Lee, S. H. (2016). Tuberculosis infection and latent tuberculosis. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 79(4), 201–206. <https://doi.org/10.4046/trd.2016.79.4.201>
- Li, K., Yang, Z., Gu, J., Luo, M., Deng, J., & Chen, Y. (2021). Characterization of pncA Mutations and Prediction of PZA Resistance in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates From Chongqing, China. *Frontiers in Microbiology*, 11(January), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.594171>
- Lin, W., Florez de Sessions, P., Teoh, G. H. K., Mohamed, A. N. N., Zhu, Y. O., Koh, V. H. Q., ... Alonso, S. (2016). Transcriptional profiling of Mycobacterium tuberculosis exposed to in vitro lysosomal stress. *Infection and Immunity*, 84(June), IAI.00072-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00072-16>
- Lohrasbi, V., Talebi, M., Bialvaei, A. Z., Fattorini, L., Drancourt, M., Heidary, M., & Darban-Sarokhalil, D. (2018). Trends in the discovery of new drugs for Mycobacterium tuberculosis therapy with a glance at resistance. *Tuberculosis*, 109, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.12.002>

- Manjunatha, U., Boshoff, H. I., & Barry, C. E. (2009). The mechanism of action of PA-824: Novel insights from transcriptional profiling. *Communicative & Integrative Biology*, 2(3), 215–218. <https://doi.org/10.4161/cib.2.3.7926>
- Meinzen, C., Proaño, A., Gilman, R. H., Caviedes, L., Coronel, J., Zimic, M., & Sheen, P. (2016). A quantitative adaptation of the Wayne test for pyrazinamide resistance. *Tuberculosis*, 99(November 2012), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.03.011>
- Milano, A., Rosalia, M., Provvedi, R., Paola, A., Manina, G., Luisa, A., ... Riccardi, G. (2009). Azole resistance in Mycobacterium tuberculosis is mediated by the MmpS5 – MmpL5 efflux system. *Tuberculosis*, 89(1), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2008.08.003>
- Minato, Y., Thiede, J. M., Kordus, S. L., McKlveen, E. J., Turman, B. J., & Baughn, A. D. (2015). Mycobacterium tuberculosis folate metabolism and the mechanistic basis for para-aminosalicylic acid susceptibility and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9), 5097–5106. <https://doi.org/10.1128/AAC.00647-15>
- Miyagi, C., Yamane, N., Yogesh, B., Ano, H., & Takashima, T. (2004). Genetic and phenotypic characterization of pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis complex isolates in Japan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48(2), 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2003.09.013>
- Narang, A., Garima, K., Porwal, S., Bhandekar, A., Shrivastava, K., Giri, A., ... Varma-Basil, M. (2019). Potential impact of efflux pump genes in mediating rifampicin resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from India. *PLoS ONE*, 14(9), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223163>
- Njire, M., Wang, N., Wang, B., Tan, Y., Cai, X., Liu, Y., ... Zhang, T. (2017a). Pyrazinoic acid inhibits a bifunctional enzyme in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(7), 1–15. <https://doi.org/10.1128/AAC.00070-17>
- Njire, M., Wang, N., Wang, B., Tan, Y., Cai, X., Liu, Y., ... Zhang, T. (2017b).

- Pyrazinoic acid inhibits a bifunctional enzyme in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(7), 1–15.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00070-17>
- P. Ling, J. Flynn. (2012). Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. *Journal of Immunology*, *185*(1), 15–22.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903856>.Understanding
- Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., ... Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
- Palomino, J., & Martin, A. (2014). Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics*, *3*(3), 317–340.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics3030317>
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, *14*(4), 417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
- Pethe, K., Swenson, D. L., Alonso, S., Anderson, J., Wang, C., & Russell, D. G. (2004). Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation, *101*(37).
- Petrella, S., Gelus-Ziental, N., Maudry, A., Laurans, C., Boudjelloul, R., & Sougakoff, W. (2011). Crystal structure of the pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. *PLoS ONE*, *6*(1), e15785.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015785>
- Prisic, S., & Husson, R. N. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* Serine / Threonine Protein Kinases, 1–26.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0006-2013.f1>
- Qiao, C., Gupte, A., Boshoff, H. I., Wilson, D. J., Bennett, E. M., Somu, R. V., ... Aldrich, C. C. (2007). 5'-O-[(N-acyl)sulfamoyl]adenosines as antitubercular agents that inhibit MbtA: An adenylation enzyme required for siderophore

biosynthesis of the mycobactins. Journal of Medicinal Chemistry (Vol. 50).
<https://doi.org/10.1021/jm070905o>

Quispe Hualpa, Y. M. (2018). *Influencia de las mutaciones del gen pncA de cepas de Mycobacterium tuberculosis multidrogoresistentes sobre los parámetros cinéticos y actividad enzimática de Pirazinamidasas recombinantes*.
Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Raju, A., Kulkarni, S., Ray, M. K., Rajan, M. G. R., & Degani, M. S. (2015). E84G mutation in dihydrofolate reductase from drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* (Mumbai , India) leads to increased interaction with. *International Journal of Mycobacteriology*, 4(2), 97–103.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.02.001>

Ramaswamy, S. V, Reich, R., Dou, S., Jasperse, L., Pan, X., Wanger, A., ... Graviss, E. A. (2003). Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, 47(4), 1241–1250. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1241>

Ramirez-Busby, S. M., & Valafar, F. (2015). Systematic review of mutations in pyrazinamidase associated with pyrazinamide resistance in mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9), 5267–5277. <https://doi.org/10.1128/AAC.00204-15>

Raynaud, C., Laneelle, M., Senaratne, R. H., Draper, P., Laneelle, G., & Daffel, M. (1999). Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria : importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity, (1 999).

Rodwell, T. C., Fink, L., Catanzaro, D., Jackson, R. L., Pettigrove, M., Catanzaro, A., & Valafar, F. (2017). A Multinational Analysis of Mutations and Heterogeneity in PZase , RpsA , and PanD Associated with Pyrazinamide Resistance in M / XDR *Mycobacterium tuberculosis*, (June).
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-03452-y>

Rosado, L. A., Wahni, K., Degiacomi, G., Pedre, B., Young, D., De la Rubia, A. G., ... Messens, J. (2017). The antibacterial prodrug activator Rv2466c is a

mycothiol-dependent reductase in the oxidative stress response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 292(32), 13097–13110. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.797837>

Saunders, G., & Mcfadden, J. (2003). *Molecular Biology of Mycobacterium tuberculosis*, 2, 97–111.

Seto, S., Tsujimura, K., & Koide, Y. (2011). Rab GTPases Regulating Phagosome Maturation Are Differentially Recruited to Mycobacterial Phagosomes. *Traffic*, 12(4), 407–420. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01165.x>

Sheen, P., Ferrer, P., Gilman, R. H., López-Llano, J., Fuentes, P., Valencia, E., & Zimic, M. J. (2009). Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 89(2), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2009.01.004>

Shi, T., & Xie, J. (2011). Molybdenum enzymes and molybdenum cofactor in mycobacteria. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(10), 2721–2728. <https://doi.org/10.1002/jcb.23233>

Shi, W., Chen, J., Feng, J., Cui, P., Zhang, S., Weng, X., ... Zhang, Y. (2014). Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections*, 3(8), e58. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.61>

Shi, W., Chen, J., Zhang, S., Zhang, W., & Zhang, Y. (2018). Identification of novel mutations in LprG (rv1411c), rv0521, rv3630, rv0010c, ppsC, and cyp128 associated with pyrazinoic acid/pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(7), 1–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00430-18>

Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J. S., Barry, C. E., ... Zhang, Y. (2011). Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 333(6049), 1630–1632. <https://doi.org/10.1126/science.1208813>

Shi Wanliang, Zhang Xuelian, Jiang Xin, Ruan Haiming, Barry Clifton, Wang

- Honghai, Z. W. and Z. Y. (2012). Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for shortening the duration of tuberculosis chemotherapy. *Science*, 333(6049), 1630–1632.
<https://doi.org/10.1126/science.1208813>
- Singh, P., Mishra, A. K., Malonia, S. K., Chauhan, D. S., Sharma, V. D., Venkatesan, K., & Katoch, V. M. (2006). The paradox of pyrazinamide: An update on the molecular mechanisms of pyrazinamide resistance in *Mycobacteria*. *Journal of Communicable Diseases*, 38(3), 288–298.
- Sittikornpaiboon, P., Toochinda, P., & Lawtrakul, L. (2017). Structural and dynamics perspectives on the binding of substrate and inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis* DHFR. *Scientia Pharmaceutica*, 85(3).
<https://doi.org/10.3390/scipharm85030031>
- Sklar, J. G., Makinoshima, H., Schneider, J. S., & Glickman, M. S. (2010). *M. tuberculosis* intramembrane protease Rip1 controls transcription through three anti-sigma factor substrates, 77(June), 605–617.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07232.x>
- Tang, J., Liu, Z., Shi, Y., Zhan, L., & Qin, C. (2020). Whole Genome and Transcriptome Sequencing of Two Multi-Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains to Facilitate Illustrating Their Virulence in vivo. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(May), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00219>
- Vásquez-Campos, L., Asencios-Solis, L., Leo-Hurtado, E., Quispe-Torres, N., Salazar-Lindo, E., Bayona, J., & Becerra, M. C. (2004). Drug resistance trends among previously treated tuberculosis patients in a national registry in Peru, 1994-2001. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 8(4), 465–472.
- Walter, N. D., Dolganov, G. M., Garcia, B. J., Worodria, W., Andama, A., Musisi, E., ... Davis, J. L. (2015). Transcriptional Adaptation of Drug-tolerant *Mycobacterium tuberculosis* During Treatment of Human Tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*, 212(6), 990–998.

<https://doi.org/10.1093/infdis/jiv149>

- Wang, F., Jain, P., Gulten, G., Liu, Z., Feng, Y., Ganesula, K., ... Sacchettini, J. C. (2010). Mycobacterium tuberculosis Dihydrofolate Reductase Is Not a Target Relevant to the Antitubercular Activity of Isoniazid □, *54*(9), 3776–3782. <https://doi.org/10.1128/AAC.00453-10>
- Wang, K., Pei, H., Huang, B., Zhu, X., Zhang, J., Zhou, B., ... Zhou, F. F. (2013). The expression of ABC efflux pump, Rv1217c-Rv1218c, and its association with multidrug resistance of mycobacterium tuberculosis in China. *Current Microbiology*, *66*(3), 222–226. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0215-3>
- Wang, Y., Ghaffari, N., Johnson, C. D., Braga-neto, U. M., Wang, H., & Chen, R. (2011). Evaluation of the coverage and depth of transcriptome by RNA-Seq in chickens, *12*(Suppl 10), 0–6.
- Wayne, L. G. (1974). Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Amer.Rev.Resp.Dis.*, *109*(1), 147–151. <https://doi.org/10.1164/arrd.1974.109.1.147>
- Wengenack, N. L., Lopes, H., Kennedy, M. J., Tavares, P., Pereira, A. S., Moura, I., ... Rusnak, F. (2000). Redox Potential Measurements of the Mycobacterium tuberculosis Heme Protein KatG and the Isoniazid-Resistant Enzyme KatG (S315T): Insights into Isoniazid Activation, 11508–11513.
- Werngren, J., Alm, E., & Mansjö, M. (2017). Non-pncA Gene-Mutated but Pyrazinamide-Resistant Mycobacterium tuberculosis: Why Is That?, *55*(6), 1920–1927.
- World Health Organization. (2019). *WHO TB burden report 2019*. Geneva: Workplace Health and Safety.
- World Health Organization. (2021). *Global Tuberculosis Report 2021*. Geneva.
- Yang, J., Pang, Y., Zhang, T., Xian, X., Li, Y., Wang, R., ... Wang, J. (2020). International Journal of Infectious Diseases Molecular characteristics and in vitro susceptibility to bedaquiline of Mycobacterium tuberculosis isolates circulating in Shaanxi ., *International Journal of Infectious Diseases*, *99*,

163–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.044>

- Zhang, S., Chen, J., Shi, W., Cui, P., Zhang, J., Cho, S., ... Zhang, Y. (2017). Mutation in *clpC1* encoding an ATP-dependent ATPase involved in protein degradation is associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes and Infections*, *6*(2), e8-2. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.1>
- Zhang, S., Chen, J., Shi, W., Liu, W., Zhang, W., & Zhang, Y. (2013). Mutations in *panD* encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes and Infections*, *2*(May). <https://doi.org/10.1038/emi.2013.38>
- Zhang, Ying, & Mitchison, D. (2003). The curious characteristics of pyrazinamide: A review. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, *7*(1), 6–21. <https://doi.org/10.5588/ijtld.16.0360>
- Zhang, Ying, Shi, W., Zhang, W., & Mitchison, D. (2013). Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology Spectrum*, *2*(4), 1–12. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013>
- Zhang, Yumeng, Zhang, J., Cui, P., Zhang, Y., & Zhang, W. (2017a). crossm Identification of Novel Efflux Proteins, *61*(8), 1–10.
- Zhang, Yumeng, Zhang, J., Cui, P., Zhang, Y., & Zhang, W. (2017b). Identification of Novel Efflux Proteins Rv0191, Rv3756c, Rv3008, and Rv1667c Involved in Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *61*(8), 1–10.
- Zignol, M., Dean, A. S., Alikhanova, N., Andres, S., Cabibbe, A. M., Cirillo, D. M., ... Raviglione, M. C. (2016). Population-based resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to pyrazinamide and fluoroquinolones: results from a multicountry surveillance project. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(10), 1185–1192. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30190-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30190-6)
- Zimhony, O., Cox, J. S., Welch, J. T., Vilchèze, C., & Jacobs, W. R. (2000).

Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Medicine*, 6(9), 1043–1047.

<https://doi.org/10.1038/79558>

Zimic, M., Fuentes, P., Gilman, R. H., Gutiérrez, A. H., Kirwan, D., & Sheen, P. (2012). Pyrazinoic acid efflux rate in *Mycobacterium tuberculosis* is a better proxy of pyrazinamide resistance. *Tuberculosis*, 92(1), 84–91.

<https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.09.002>

Zumla, A., Raviglione, M., Hafner, R., & Fordham von Reyn, C. (2013). Tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 368(8), 745–755.

<https://doi.org/10.1056/NEJMra1200894>

b). Alineamiento de nucleótidos de la cepa MTB-H37RV-WT vs.MTB-TBCON464-C9

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

                                     33pb up-stream_gen-pncA

191018-MTB-TBCON464-C9_P6pncA_rvcomp      TGTCCGNNNNNNNTCCGGATCCGTCCGGCCGTCATGGACCOCTAATCTGTGGCTGCCCGGT 60
NCBI_MTB-H37Rv_WT                        -----GTCAIGTTCGGGATCCGTCCGGCCGTCATGGACCOCTAATCTGTGGCTGCCCGGT 60
191018-MTB-TBCON464-C9_P1pncA            -----

191018-MTB-TBCON464-C9_P6pncA_rvcomp      CGGTAGGCAAACTGCCCGGGCAGTCCGCCGAACTATGGTGGACGTATGGGGCGTGGAT 120
NCBI_MTB-H37Rv_WT                        CGGTAGGCAAACTGCCCGGGCAGTCCGCCGAACTATGGTGGACGTATGGGGCGTGGAT 120
191018-MTB-TBCON464-C9_P1pncA            -----

191018-MTB-TBCON464-C9_P6pncA_rvcomp      CATCTCCAGCTSCAGAACTCTCTGCGAGGGTGGCTGCTGGCCGTAAACCGGTGGCCG 180
NCBI_MTB-H37Rv_WT                        CATCTCCAGCTSCAGAACTCTCTGCGAGGGTGGCTGCTGGCCGTAAACCGGTGGCCG 180
191018-MTB-TBCON464-C9_P1pncA            -----NNNNNICAGAACTCTCTGCGAGGGTGGCTGCTGGCCGTAAACCGGTGGCCG 52
*****

191018-MTB-TBCON464-C9_P6pncA_rvcomp      CCGCTGGCCCGCCCATCAGCGACTACTGGCCGAAAGCGCGACTACCAATCAGCTGT 240
NCBI_MTB-H37Rv_WT                        CCGCTGGCCCGCCCATCAGCGACTACTGGCCGAAAGCGCGACTACCAATCAGCTGT 240
191018-MTB-TBCON464-C9_P1pncA            CCGCTGGCCCGCCCATCAGCGACTACTGGCCGAAAGCGCGACTACCAATCAGCTGT 112
*****

191018-MTB-TBCON464-C9_P6pncA_rvcomp      GGCACCAAGGACTTCCACATCGACCCCGGTTACCACTTCTCCGGCACCACCGACTATT 300
NCBI_MTB-H37Rv_WT                        GGCACCAAGGACTTCCACATCGACCCCGGTTACCACTTCTCCGGCACCACCGACTATT 300
191018-MTB-TBCON464-C9_P1pncA            GGCACCAAGGACTTCCACATCGACCCCGGTTACCACTTCTCCGGCACCACCGACTATT 172
*****

191018-MTB-TBCON464-C9_P6pncA_rvcomp      CTGCTGTGGCCACCGCATTCGCTCAGCGGTACTCCCGCCCGGACTTCCATCCCATCT 360
NCBI_MTB-H37Rv_WT                        CTGCTGTGGCCACCGCATTCGCTCAGCGGTACTCCCGCCCGGACTTCCATCCCATCT 360
191018-MTB-TBCON464-C9_P1pncA            CTGCTGTGGCCACCGCATTCGCTCAGCGGTACTCCCGCCCGGACTTCCATCCCATCT 232
*****

191018-MTB-TBCON464-C9_P6pncA_rvcomp      GGCACGTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACAGGGTGGCTACACCGGAGGTACAGCGG 420
NCBI_MTB-H37Rv_WT                        GGCACGTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACAGGGTGGCTACACCGGAGGTACAGCGG 420
191018-MTB-TBCON464-C9_P1pncA            GGCACGTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACAGGGTGGCTACACCGGAGGTACAGCGG 292
*****

191018-MTB-TBCON464-C9_P6pncA_rvcomp      CTTCAAGGAGTCCAGAGAACCGCCACGCTGCTGAATTGGCTCCGGCAACCGGGT 480
NCBI_MTB-H37Rv_WT                        CTTCAAGGAGTCCAGAGAACCGCCACGCTGCTGAATTGGCTCCGGCAACCGGGT 480
191018-MTB-TBCON464-C9_P1pncA            CTTCAAGGAGTCCAGAGAACCGCCACGCTGCTGAATTGGCTCCGGCAACCGGGT 352
*****

191018-MTB-TBCON464-C9_P6pncA_rvcomp      CGATGAGGTGATGTGGTGGTATTGCCACCGATCATGTGTGGCCAGACCGCCAGGA 540
NCBI_MTB-H37Rv_WT                        CGATGAGGTGATGTGGTGGTATTGCCACCGATCATGTGTGGCCAGACCGCCAGGA 540
191018-MTB-TBCON464-C9_P1pncA            CGATGAGGTGATGTGGTGGTATTGCCACCGATCATGTGTGGCCAGACCGCCAGGA 412
*****

191018-MTB-TBCON464-C9_P6pncA_rvcomp      CCGGTACGCAATGGCTTGGCCACCGGGTGTGGTGGACCTTACAGCGGGNNWNNNG- 599
NCBI_MTB-H37Rv_WT                        CCGGTACGCAATGGCTTGGCCACCGGGTGTGGTGGACCTTACAGCGGGTGTGGTGG 594
191018-MTB-TBCON464-C9_P1pncA            CCGGTACGCAATGGCTTGGCCACCGGGTGTGGTGGACCTTACAGCGGGTGTGGTGG 472
*****

191018-MTB-TBCON464-C9_P6pncA_rvcomp      ----- 599
NCBI_MTB-H37Rv_WT                        CGATACCACTGCTCCCGCTGGAGGAGATGCGCACCCGACCGGTGGAGTTGGTTTCAG 654
191018-MTB-TBCON464-C9_P1pncA            ----- 532

191018-MTB-TBCON464-C9_P6pncA_rvcomp      ----- 599
NCBI_MTB-H37Rv_WT                        CTCTCTATGGCACCGCCGAAACCGGGATGAACCTGTGGCCGGCTGGAGCCTCGCCG--- 711
191018-MTB-TBCON464-C9_P1pncA            CTCTCTATGGCACCGCCGAAACCGGGATGAACCTGTGGCCGGCTGGAGCCTCGCCG--- 592

```

42pb down-stream_gen-pncA

c). Alineamiento de aminoácidos de la cepa MTB-H37RV-WT vs.MTB-SLM059-C1

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

VIRT-9561Fram1_H37RV_NCBI      MRALIIIVDQNDPCEGGSLAVTGGAAALARAI SDYLAEAADYRHVVATKDFRIDPGDHFSG 60
VIRT-20172Fram2_SLM059_C1     MRALIIIVDQNDPCEGGSLAVTGGAAALARAI SDYLAEAADYRHVVATKDFRIDPGDHFSG 60
*****

VIRT-9561Fram1_H37RV_NCBI      TPDYSSSWPFCVSGT PGADFPFLDTSALAEAVFYKDAYTGAYSGFEGVDENGTPLLNWL 120
VIRT-20172Fram2_SLM059_C1     TPDYSSSWPFCVSGT PGADFPFLDTSALAEAVFYKDAYTGVYSGFEGVDENGTPLLNWL 120
*****

VIRT-9561Fram1_H37RV_NCBI      RQSGVDEVDVVGIIATDHCVRQTAEIADVRRGLATRVLVDLTAGVSDTTVAALEEMRTASV 180
VIRT-20172Fram2_SLM059_C1     RQSGVDEVDVVGIIATDHCVRQTAEIADVRRGLATRVLVDLTAGVSDTTVAALEEMRTASV 180
*****

VIRT-9561Fram1_H37RV_NCBI      ELVCSG      186
VIRT-20172Fram2_SLM059_C1     ELVCSG      186
*****

```

d). Alineamiento de aminoácidos de la cepa MTB-H37RV-WT vs.MTB-TBCON464-C9

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

VIRT-Fram1_H37RV_NCBI      MRALIIIVDQNDPCEGGSLAVTGGAAALARAI SDYLAEAADYRHVVATKDFRIDPGDHFSG 60
VIRT-Fram1_TBCON464_C9     MRALIIIVDQNDPCEGGSLAVTGGAAALARAI SDYLAEAADYRHVVATKDFRIDPGDHFSG 60
*****

VIRT-Fram1_H37RV_NCBI      TPDYSSSWPFCVSGT PGADFPFLDTSALAEAVFYKDAYTGAYSGFEGVDENGTPLLNWL 120
VIRT-Fram1_TBCON464_C9     TPDYSSSWPFCVSGT PGADFPFLDTSALAEAVFYKDAYTGAYSGFEGVDENGTPLLNWL 120
*****

VIRT-Fram1_H37RV_NCBI      RQSGVDEVDVVGIIATDHCVRQTAEIADVRRGLATRVLVDLTAGVSDTTVAALEEMRTASV 180
VIRT-Fram1_TBCON464_C9     RQSGVDEVDVVGIIATDHCVRQTAEIADVRRGLATRVLVDLTAGVSDTTVAALEEMRTASV 180
*****

VIRT-Fram1_H37RV_NCBI      ELVCSG      186
VIRT-Fram1_TBCON464_C9     ELVCSG      186
*****

```