



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“ROL DE LAS METALOCAPERONAS
CANDIDATAS EN EL MECANISMO DE
ACCIÓN Y RESISTENCIA A
PIRAZINAMIDA EN *MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS*”

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

FRESIE DENISSE MACIEL CARPIO

LIMA – PERÚ

2024

ASESOR

Ph.D. Mirko Juan Zimic Peralta

CO ASESOR

Ph.D. Patricia Sheen Cortavarria

JURADO DE TESIS

DR. JORGE LUIS AREVALO ZELADA

PRESIDENTE

DR. JOSE RONALD ESPINOZA BABILON

VOCAL

DRA. MONICA JEHNNY PAJUELO TRAVEZAÑO

SECRETARIO (A)

DEDICATORIA.

Dedico este trabajo a Dios y a mi familia: mis padres Juan y Maribel, mi esposo Franklin y mi hijo Adriano. Sin el apoyo de ellos, hubiera sido difícil culminar mi tesis. Gracias Dios por darme fuerza para superar muchos desafíos y adversidades y permitirme siempre salir adelante.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a Dios, fuente de fortaleza y sabiduría, por haberme guiado a lo largo de este arduo pero gratificante camino académico.

Agradezco a mis padres Juan y Maribel, quienes se sacrificaron para que yo pueda seguir una carrera profesional y tener una mejor calidad de vida.

Agradezco a mi esposo Franklin por sus sabios consejos y su constante impulso para afrontar nuevos desafíos y alcanzar el éxito.

Agradezco a mi hijo Adriano, eres el motor de mi vida. Todo esfuerzo y sacrificio que hago, lo hago pensando en ti.

Agradezco a los Doctores Mirko Zimic y Patricia Sheen por su apoyo incondicional y permitirme iniciar una carrera en investigación en el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

Agradezco al grupo de bioinformática del laboratorio, compuesto por Gabriel Jiménez, Gustavo Olivos, Jhon Mesco y otros colaboradores, por su inestimable contribución al trabajo bioinformático que condujo a la identificación de nuevos genes de proteínas candidatas a metalochaperonas de PZAsa en *Mtb*. Estos genes fueron objeto de estudio en la presente tesis.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio Mishell Landa, Adiana Ochoa, Angela Ríos, Stefany Quiñones, Kevin Obanto, Alonso Flores, quienes me apoyaron en diferentes momentos y me motivaron siempre a salir adelante.

Agradezco a los Sres. Marcos Milla y Maria Goñi, fundadores de la Becas de Maestría Milla-Goñi en UPCH. Gracias a ellos, pude realizar esta maestría y descubrir mi pasión por la investigación.

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

Muchas gracias a todos.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Este proyecto de tesis fue financiado por los Sres., Marco Milla y Maria Goñi, fundadores de la Beca Milla-Goñi 2021 y por International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) Grant 2020.

ROL DE LAS METALOCAPERONAS CANDIDATAS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN Y RESISTENCIA A PIRAZINAMIDA EN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%	13%	2%	1%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	5%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
3	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	1%
4	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%
5	posgrado.cayetano.edu.pe Fuente de Internet	<1%
6	repositorio.uni.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	tesis.unjbg.edu.pe Fuente de Internet	<1%
8	idoc.pub Fuente de Internet	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	JUSTIFICACIÓN	7
III.	OBJETIVOS	9
III.1	Objetivo general.....	9
III.2	Objetivos específicos	9
IV.	MARCO TEÓRICO.....	10
IV.1	Tuberculosis.....	10
IV.2	Epidemiología.....	11
IV.3	Etapas de la infección	12
IV.4	Diagnóstico de la tuberculosis	14
IV.5	Tratamiento de la tuberculosis.....	17
IV.6	Pirazinamida	18
IV.7	Nicotinamidasas/Pirazinamidasas (PZAAs)	19
IV.8	Mecanismo de acción de la pirazinamida.....	21
IV.9	Mecanismo de resistencia a pirazinamida	23
IV.10	Metalchaperonas	26
IV.11	Identificación de metalchaperonas candidatas a PZAAs	27
IV.12	TEMA.....	32

IV.13	ORBIT	33
V.	METODOLOGÍA	37
V.1	Tipo de estudio	37
V.2	Diseño de estudio	37
V.3	Lugar de estudio	39
V.4	Material Biológico.....	39
V.5	Procedimiento experimental.....	40
V.5.1.	Remoción de los genes candidatos a metalochaperonas de PZAsa mediante la técnica de ORBIT en <i>M. tuberculosis</i>	40
V.5.2.	Ensayo fenotípico de crecimiento.	61
V.5.3.	Tasa de eflujo de POA	61
V.5.4.	Ensayo de susceptibilidad a PZA en <i>M. tuberculosis</i> mediante el ensayo de TEMA.....	64
V.5.5.	Análisis estadísticos	67
VI.	RESULTADOS.....	68
VI.1	Remoción de los genes candidatos a metalochaperonas de PZAsa mediante la técnica de ORBIT en <i>M. tuberculosis</i>	68
VI.1.1.	Diseño del oligonucleótido guía	68
VI.1.2.	Electroporación del vector pKM461.....	70
VI.1.3.	Electroporación del vector pKM464 y oligonucleótido guía.....	71

VI.1.4. Confirmación por PCR de los procesos de recombinación y eliminación de los genes objetivos.....	74
VI.1.5. Confirmación por secuenciamiento de los procesos de recombinación y eliminación de los genes objetivos.....	76
VI.2 Ensayo Fenotípico de Crecimiento.....	84
VI.3 Tasa de eflujo de POA.....	86
VI.3.1. Curva estándar de POA.....	86
VI.3.2. Cuantificación de la tasa de eflujo de POA en <i>M. tuberculosis</i>	90
VI.4 Prueba de susceptibilidad a PZA.....	92
VII. DISCUSIÓN	95
VIII. CONCLUSIONES.....	108
IX. DIRECCIONES A FUTURO	109
X. BIBLIOGRAFÍA	110

ANEXOS

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa ocasionada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). En el esquema terapéutico, la pirazinamida (PZA) es considerada como uno de los fármacos claves en el tratamiento de la tuberculosis, tanto en la fase latente como activa de la enfermedad. Actualmente el mecanismo de acción de la droga no es comprendido en su totalidad, sin embargo, se sabe que el componente activo de la droga es el ácido pirazinoico (POA), el cual es producido mediante la acción de la enzima pirazinamidasa/nicotinamidasa (PZAsa) de *Mtb*.

El principal mecanismo de resistencia a la PZA en *Mtb* se debe a mutaciones presentes en el gen *pncA* que codifica la enzima PZAsa. Sin embargo, no todas las cepas clínicas resistentes a PZA presentan mutaciones en este gen, por lo tanto, se propone que existe más de un mecanismo asociado a la resistencia. La enzima PZAsa es una metaloenzima cuyo cofactor metálico aún no se conoce específicamente; la presencia de este metal es crítico para la actividad enzimática de formación de POA que tiene la actividad anti-microbiana, la ausencia del metal inactiva a la PZAsa y genera resistencia a PZA en la bacteria. Estudios *in vitro* sugieren que la enzima PZAsa podría requerir de la acción de proteínas metalochaperonas para su activación. Por tanto, la pérdida de actividad de estas metalochaperonas, podría estar relacionado a la resistencia a PZA en *Mtb*.

El presente estudio evaluó el efecto de la remoción individual de los genes Rv0944 y Rv2102, mediante la técnica ORBIT, sobre la tasa de eflujo de POA y

susceptibilidad a PZA en *M. tuberculosis*. Los genes fueron seleccionados como posibles candidatos a metalochaperonas de la enzima PZAsa-*Mtb* por análisis bioinformático. La remoción individual de los genes Rv0944 y Rv2102 en *Mtb* resultó en una disminución parcial pero significativa ($p=0.033$ y $p=0.000$, respectivamente) de la tasa de flujo de POA y un ligero incremento en la resistencia a PZA en la bacteria.

Palabras claves: *Mycobacterium tuberculosis*, mecanismo de acción y resistencia, pirazinamida (PZA) y metalochaperonas.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*).

In this infection, pyrazinamide (PZA) is considered one of the key drugs in the treatment of tuberculosis, both in the latent and active phases of the disease.

Although, the mechanism of action of the drug is not fully understood, it is known that the pyrazinoic acid (POA) is the active component of the drug, which is produced by the action of the enzyme pyrazinamidase/nicotinamidase (PZAse) of *Mtb*.

The primary mechanism of resistance to PZA is caused by mutations in the *pncA* gene that encodes the PZAse enzyme in *Mtb*. However, not all clinically resistant strains have mutations in this gene, suggesting more than one mechanism associated with PZA resistance. PZAse is a metalloenzyme, and the specific nature of the metal cofactor is not yet known. However, it has been demonstrated that this metal is a key factor for enzymatic activity. Therefore, the inactivation of PZAse due to the lack of the metal cofactor lead to resistance to PZA in *Mtb*. Evidence obtained from previous *in vitro* studies suggests that the PZAse enzyme may require metallochaperone proteins for activation. Thus, it is proposed that the loss of activity of these metallochaperones may be related to alternative mechanisms of resistance to PZA in *Mtb*.

The present study assessed the individual removal of genes Rv0944 and Rv2102, using the ORBIT technique on the efflux rate of POA and the susceptibility to PZA

in *M. tuberculosis in vitro*. The evaluated genes were selected in a bioinformatic study as metallochaperones candidates for the enzyme PZAse-*Mtb*. The individual removal of genes Rv0944 and Rv2102 resulted in a significant but partial decrease in POA efflux rate ($p=0.033$ and $p=0.000$, respectively) and a slight increase in resistance to PZA in *Mtb*.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Mechanism of action and resistance. Pyrazinamide (PZA) and Metallochaperones.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa ocasionada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Esta enfermedad es considerada como un problema dentro de la salud pública, ya que es la decimotercera causa de muerte y enfermedad infecciosa con la tasa de mortalidad más alta en el mundo (1). En el 2022, se diagnosticó a más de 10 millones de personas con la enfermedad, de los cuales más de 1.6 millones murieron a causa de esta (1). En el Perú, anualmente se notifican alrededor de 27 mil casos nuevos de enfermedad activa y 17 mil casos nuevos de tuberculosis pulmonar frotis positivo. Perú es considerado como uno de los países con mayor carga de TB en la región (1, 2, 3).

El tratamiento de la TB es un proceso complejo y generalmente requiere el uso de múltiples medicamentos durante un período prolongado (4, 5). La pirazinamida (PZA) es uno de los fármacos que actualmente se administra dentro de la primera y segunda línea de tratamiento, y es considerada como un fármaco clave dentro de la terapia antituberculosa, debido a su gran capacidad para matar a los bacilos de *Mtb* de crecimiento lento, previniendo la activación y progreso de la enfermedad (4,6). Esta capacidad ha permitido acortar los tiempos de tratamientos de 9 -12 meses a 6 meses, y a reducir las tasas de recaída (6). Sin embargo, el surgimiento de cepas resistentes a PZA está planteando un nuevo desafío para el control de la TB en el mundo, ya que la PZA es una droga de gran relevancia médica para controlar la infección por esta bacteria.

Actualmente, no se comprende el mecanismo de acción y resistencia a PZA en su totalidad. Se conoce que esta droga actúa como un pro-fármaco, cuyo componente activo es el ácido pirazinoico (POA). La PZA ingresa por difusión pasiva al citoplasma de *Mtb*, donde es convertido a POA gracias a una enzima denominada pirazinamidasa/nicotinamidasa (PZAsa). El POA, componente activo de la droga, es expulsado al medio extracelular de las micobacterias que se encuentran atrapadas dentro de los macrófagos activados (7,8). Se piensa que este proceso es llevado a cabo por una bomba de eflujo, cuyas características e identificación todavía se encuentra en estudio (9). En el medio extracelular, el POA se protona y luego vuelve a ingresar a la bacteria por un diferencial de gradiente en las células. Una vez dentro, este se desprotona, y vuelve a ser expulsado al medio extracelular. Este proceso se repite constantemente, resultando en una acidificación progresiva del medio intracelular y reducción del potencial de membrana. Se piensa que estos cambios conducen finalmente a la muerte de la bacteria (7,8).

La enzima PZAsa, es una metaloenzima codificada por el gen *pncA*. En bacterias, incluyendo *Mtb*, este gen participa en la vía metabólica de reciclaje de la nicotinamida en la biosíntesis de NAD^+ , catalizando la conversión de nicotinamida (NAM) en mononucleótido de ácido nicotínico (NMN) (10,11). A pesar de la importancia del NAD^+ y NADP^+ como cofactores indispensables en las reacciones redox y en diversas vías metabólicas, se ha observado que la ausencia del gen *pncA* no conduce necesariamente a la muerte celular en *Mtb* (12, 13, 14). Esto se debe a la existencia de múltiples rutas metabólicas alternativas que permiten la

recuperación y la síntesis de novo de NAD^+ , lo que confiere cierta flexibilidad metabólica a la bacteria frente a la ausencia de este gen específico (10, 11, 15).

Sin embargo, la pérdida de la función de la enzima PZAsa es uno de los factores fundamentales en la resistencia a PZA en *Mtb*. Además, el 75-90% de los casos de resistencia a PZA están relacionados con mutaciones en el gen *pncA*. (16, 17,18). Estas mutaciones son particularmente significativas cuando afectan tanto al sitio de coordinación de metales como al sitio activo de la enzima (17).

La dilucidación de la estructura de PZAsa-*Mtb* por cristalografía de rayos X ha proporcionado información sobre la enzima, revelando detalles importantes como la conformación del sitio activo y el sitio de coordinación de metales, donde intervienen los aminoácidos Cys138, Lys96, Asp8, y Asp49, His51, His57 y His71, respectivamente. Además, se ha identificado la presencia de Fe^{+2} en el centro metálico de la enzima en una proporción de 1:1 (19). Sin embargo, aún persiste la incertidumbre sobre la identidad del cofactor metálico de la enzima PZAsa-*Mtb*, ya que diversos estudios han sugerido que otros metales como Zn^{+2} , Mn^{+2} y Ni^{+2} podrían estar en su estructura (20, 21, 22).

En el 2001, Du X. *et al.* propusieron que el cofactor metálico de la enzima PZAsa tendría un rol dentro de la catálisis enzimática, ya que se postulaba que podría estar involucrado en la generación de agua activada para la formación del segundo intermediario (23). En consecuencia, la falta del cofactor metálico podría llevar a

la inactivación de la enzima PZAsa, lo que afectaría su capacidad para metabolizar la droga PZA.

En 2012, Sheen *et al.* determinaron la capacidad de reactivación de la PZAsa quelada de *Mtb* (Apo-PZAsa-*Mtb*) utilizando diferentes iones metálicos divalentes *in vitro*. Descubrieron que la PZAsa-*Mtb* recombinante, pudo reactivarse con Co^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} , pero no con Fe^{2+} , Fe^{3+} o Mg^{2+} . Notaron que se necesitaba trescientas veces más concentración de metal que de enzima para recuperar la actividad enzimática. Además, los análisis de absorción atómica y fluorescencia de rayos X confirmaron la presencia de Zn^{2+} en la estructura de la PZAsa-*Mtb* recombinante (21). En base a estos hallazgos, los autores sugieren que la PZAsa en la micobacteria podría obtener Zn^{2+} a través de un proceso asistido por una metalochaperona, ya que la concentración de iones metálicos libres en el medio intracelular es extremadamente baja (24).

Las metalochaperonas son proteínas que protegen y guían los iones metálicos en el citoplasma, transfiriendo cofactores metálicos específicos a las apoproteínas correspondientes, mediante la interacción proteína-proteína (25). Cumplen funciones importantes dentro de la célula, ya que se unen a los iones metálicos a través de un enlace de coordinación inusual, lo suficientemente fuerte para evitar su secuestro por parte de las metalotioneínas (26). Sin embargo, no se conoce aún con claridad cómo las metalochaperonas se unen a los iones metálicos, reconocen proteínas específicas y facilitan la transferencia de metales. Hasta el momento, no se ha estudiado las funciones de las metalochaperonas y proteínas transportadoras

de metales en *Mtb*, ni su relación con el mecanismo de acción y resistencia a PZA. La mayoría de investigaciones se enfocan en las mutaciones en el gen *pncA* en la resistencia a pirazinamida.

Anotaciones recientes del genoma de *Mtb* señalaron al gen Rv2059 como un potencial transportador tipo ABC de Zn²⁺. (27, 28). Sheen *et al.* llevaron a cabo un estudio para evaluar la capacidad de Rv2059 para reactivar la enzima Apo-PZAsa-*Mtb*, y determinar si esta metalochaperona estaría involucrada en los mecanismos de resistencia a la PZA. Los resultados revelaron que la proteína recombinante Rv2059 pudo reactivar la actividad de Apo-PZAsa-*Mtb* en un 69%. No obstante, al analizar la tasa de eflujo de POA y la susceptibilidad a la PZA en una cepa H37Rv KO-Rv2059, no se observaron diferencias significativas en comparación con la cepa salvaje de referencia (29). Esto sugiere que en *Mtb*, Rv2059 podría no ser la única metalochaperona involucrada en el proceso de activación post-traducciona l de la enzima PZAsa.

En el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular- LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, se realizó una búsqueda bioinformática para identificar genes candidatos de metaloproteínas que podrían tener una función de tipo metalochaperonas y/o transportadores de metales en *Mtb*. Se identificaron dos nuevas metaloproteínas, codificadas por los genes Rv0944 y Rv2102, cuyos centros metálicos mostraban una interacción energéticamente cercana al sitio activo de la enzima PZAsa-*Mtb* en un ensayo de acoplamiento molecular a ciegas, similar a lo obtenido con la proteína Rv2059. (los resultados aún no han sido publicados).

Para estudiar el efecto de la remoción de cada gen candidato a metalochaperona de PZAsa-*Mtb* sobre el mecanismo de acción y resistencia a PZA en *Mtb*, el presente estudio empleó la técnica de ingeniería genética denominada "ORBIT" para remover los genes Rv0944 y Rv2102 de forma independiente en la cepa de referencia H37Rv de *Mtb*.

El ORBIT (Oligonucleotide-mediated recombineering followed by Bxb1 integrase targeting) es una técnica desarrollada por Kenan C. Murphy en 2018 para remover genes cromosómicos en micobacterias (30). Esta técnica combina la recombinación homóloga, dirigida por un oligonucleótido guía, seguida de una recombinación de sitio específico mediada por la integrasa Bxb1. Estos dos procesos se ejecutan en un solo paso dentro de la célula, lo que simplifica enormemente la delección de genes en la bacteria.

El presente estudio evaluó el cambio de la tasa de flujo de POA y susceptibilidad a PZA en *Mtb* luego que los genes candidatos a metalochaperonas a PZAsa fueron removidos de manera independiente por ORBIT. Los resultados demostraron que la delección de los genes Rv0944 y Rv2102 no tuvo un impacto significativo en el crecimiento de la bacteria; sin embargo, ambas delecciones, de manera independiente, provocaron una disminución parcial pero significativa en la tasa de flujo de POA en la bacteria. En ambos casos, esta reducción en el flujo de POA se asoció con un ligero aumento en la resistencia a la PZA en *Mtb*.

II. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una enfermedad que continúa siendo una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo, con una alta incidencia y prevalencia en la población (1). Además, la aparición de cepas resistentes a los medicamentos utilizados en su tratamiento ha incrementado considerablemente la complejidad del manejo de la enfermedad. Esto no solo prolonga la duración de la terapia farmacológica, sino que también compromete la efectividad de los tratamientos disponibles (31,32).

La PZA es una droga esencial para el tratamiento de la tuberculosis, ya que tiene una alta eficacia en la eliminación de los bacilos en las etapas iniciales de la enfermedad. Su incorporación en los esquemas terapéuticos ha sido fundamental para acortar la duración de los tratamientos y disminuir las tasas de recaída (4, 5, 6). No obstante, la aparición de cepas resistentes a la PZA plantea un desafío significativo en la lucha contra la tuberculosis, ya que limita la efectividad de la droga y su potencial alcance contra los bacilos remanentes en estado latente (31,32).

A pesar de la relevancia médica de la PZA para el tratamiento de la tuberculosis, todavía no se comprende completamente los mecanismos moleculares que subyacen a su acción y resistencia. Aunque se ha establecido que las mutaciones en el gen *pncA* son responsables de la mayoría de los casos de resistencia a esta droga, hay un porcentaje significativo de cepas resistentes (0-25%) que carecen de estas

mutaciones, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos de resistencia aún desconocidos (16, 17, 18, 33).

Además, se conoce que la enzima PZAsa es una metaloenzima y que su activación requiere la presencia de cofactores metálicos, los cuales podrían ser entregados a la enzima mediante un proceso asistido. Hasta ahora, se han identificado varios candidatos a cofactores metálicos, pero aún no se comprende por completo su papel en la resistencia a la PZA (19, 21, 22). Asimismo, no se tiene información sobre las proteínas involucradas en este proceso asistido. Se piensa que la pérdida de la función de alguna de estas proteínas podría estar relacionada con un mecanismo de resistencia a la PZA.

Este proyecto de investigación pretende corroborar de manera experimental la posible implicación de los genes Rv0944 y Rv2102 en el mecanismo de acción y resistencia a PZA en *Mtb*. Esto no solo mejoraría nuestra comprensión sobre el funcionamiento de la enzima PZAsa, sino que también podría conducir al desarrollo de mejores herramientas de diagnóstico de resistencia a PZA. Estos avances prometen tener un impacto significativo en la administración adecuada de la terapia farmacológica, mejorando así los resultados del tratamiento y garantizando un uso más efectivo de los antibióticos en el manejo de la tuberculosis.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la remoción por ORBIT de los genes candidatos a metalochaperonas de PZAsa (Rv0944 y Rv2102) sobre la tasa de eflujo de ácido pirazinoico (POA) y susceptibilidad a PZA en *Mycobacterium tuberculosis*.

III.2 Objetivos específicos

- Remover de manera individual los genes Rv0944 y Rv2102, candidatos a metalochaperonas de PZAsa en *M. tuberculosis*, mediante la técnica ORBIT.
- Evaluar el efecto de la remoción individual de los genes candidatos a metalochaperonas de PZAsa sobre el crecimiento de *M. tuberculosis*.
- Medir la tasa de eflujo de POA en *M. tuberculosis* cuando los genes candidatos a metalochaperonas de PZAsa han sido removidos de manera individual.
- Evaluar la susceptibilidad a la droga PZA en *M. tuberculosis* mediante el ensayo de TEMA, cuando los genes candidatos a metalochaperonas de PZAsa han sido removidos de manera individual.

IV. MARCO TEÓRICO

IV.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica causada por la bacteria *M. tuberculosis*. Es conocida por afectar principalmente los pulmones, aunque también puede afectar otras partes del cuerpo. La TB se propaga de persona a persona a través del aire cuando un paciente con TB pulmonar tose o estornuda. Los síntomas incluyen tos persistente, fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso. A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento, sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo, especialmente en países en vías de desarrollo (1,4).

Históricamente, la TB ha estado presente en la humanidad desde tiempos antiguos. Se han encontrado evidencias de TB en la columna vertebral de momias egipcias de más de 5000 años de antigüedad. Conocida como la "peste blanca" en la época moderna, la TB fue una de las enfermedades más mortales en Europa durante los siglos XVII y XIX. La identificación de la bacteria causante en 1882 por Robert Koch fue un momento decisivo en la historia de la medicina, abriendo el camino para el desarrollo de tratamientos específicos (34).

A pesar del descubrimiento de la bacteria y el desarrollo de la vacuna BCG en 1921, el control y la erradicación de la TB continúan siendo un desafío en

todo el mundo. La aparición de cepas resistentes a los medicamentos ha complicado aún más el panorama. Sin embargo, con un diagnóstico temprano y un tratamiento adecuado, la mayoría de los casos de TB pueden curarse (35). La lucha global contra la TB requiere una colaboración continua entre gobiernos, organizaciones de salud y comunidades (1, 35).

IV.2 Epidemiología

La tuberculosis es la decimotercera causa de muerte y la enfermedad infecciosa más mortífera en todo el mundo, según los datos y cifras de la OMS. En el 2022, más de 10 millones de personas enfermaron de tuberculosis, siendo un total de 1.3 millones de personas las que murieron a causa de esta (1). Además, se estima que en el mismo año, alrededor del 3.6% de los nuevos casos de tuberculosis y el 18% de los casos previamente tratados fueron de tipo MDR-TB o RR-TB, lo que representa un total aproximado de 450,000 casos de MDR/RR-TB en todo el mundo. A pesar de los esfuerzos por controlarla, la incidencia de la enfermedad varía considerablemente a nivel global, con una mayor prevalencia en África, Asia y América Latina.

En la región de las Américas, durante el mismo año, se estimaron alrededor de 309,000 casos de TB, de los cuales se notificaron 215,116 casos (aprox. el 70%). En cuanto a la mortalidad, se calcula que hubo 32,000 muertes

relacionadas con TB en la región, de las cuales el 11% (9,000) se debieron a la coinfección de TB/VIH (1).

Por otro lado, la situación en Perú es preocupante, ya que el país presenta una de las mayores incidencias de TB en América Latina. A pesar de los avances realizados en su control, esta enfermedad sigue representando una amenaza significativa para la salud pública. Las cifras oficiales reportadas en 2019 mostraron una incidencia de 121 casos por cada 100,000 habitantes (36). La detección oportuna, el tratamiento y el control de la infección enfrentan desafíos en el país, agravados por factores socioeconómicos que contribuyen a esta alta incidencia (37).

IV.3 Etapas de la infección

La infección por TB se inicia con la inhalación de *Mtb*, presentes en gotas aerolizadas que proceden de una persona con TB pulmonar activa. Tras la inhalación, las bacterias llegan a los alvéolos pulmonares y son ingeridas por los macrófagos, donde pueden persistir, desencadenando la infección. El sistema inmunológico juega un papel crucial en esta etapa, confinando la infección y evitando su diseminación, aunque sin eliminar completamente la bacteria (38). Esta enfermedad comprende principalmente dos etapas: fase latente y fase activa.

La fase latente es un período durante el cual las bacterias están presentes pero inactivas. Característicamente, no hay síntomas, y la persona no es contagiosa. En esta etapa, el sistema inmunológico del huésped contiene la infección, formando una estructura llamada granuloma alrededor de las bacterias, manteniéndolas en estado inactivo. Sin embargo, en situaciones donde el sistema inmunológico está comprometido, como en la infección por VIH, la diabetes o el envejecimiento, las bacterias pueden reactivarse y progresar a la fase activa (Figura 1) (39, 40).

La TB activa es una etapa donde las bacterias superan las defensas inmunológicas y comienzan a multiplicarse y diseminarse activamente, principalmente en los pulmones, llevando a síntomas como tos, fiebre, y pérdida de peso. En esta etapa, la enfermedad es contagiosa y se propaga principalmente a través del aire (39, 40).

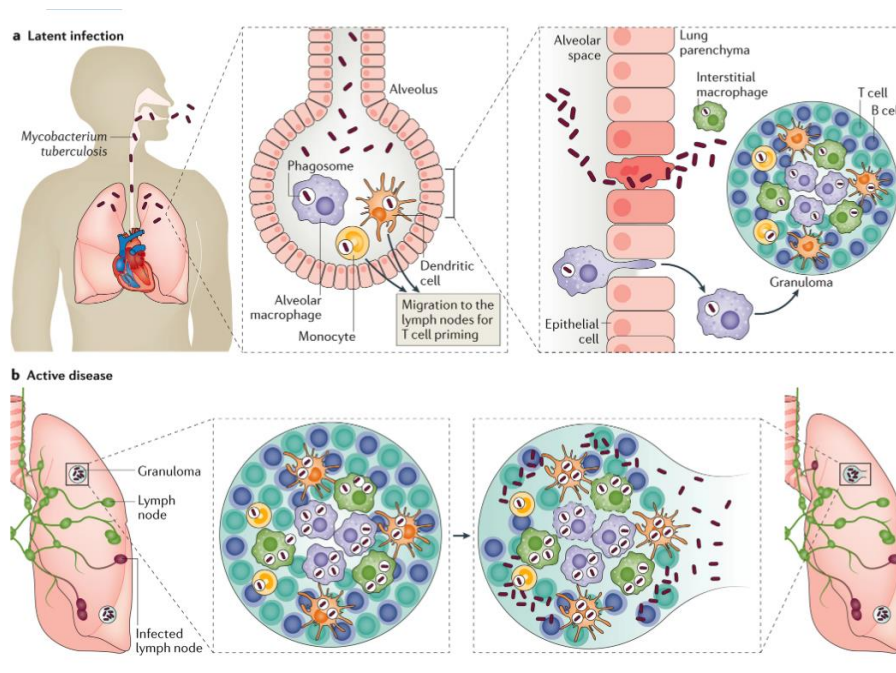


Figura 1: Representación esquemática de la infección por *M.Tuberculosis*. Fuente: Madhukar Pai et al. (2016) (41)

IV.4 Diagnóstico de la tuberculosis

Los métodos usados para detectar y diagnosticar la tuberculosis son diversos, entre los principales se encuentran los siguientes: radiográficos, microscópicos, de cultivos bacterianos, inmunológicos y basados en pruebas moleculares.

- Pruebas basadas en imágenes: Las radiografías de tórax son una herramienta esencial en el diagnóstico y monitoreo de TB pulmonar. Permiten detectar anomalías en los pulmones, como infiltrados o cavitaciones. La tomografía computarizada (TC) y la resonancia

magnética (RM) pueden ofrecer una mayor resolución y son útiles en casos complicados o en TB extrapulmonar. Sin embargo, estas técnicas no son específicas y deben ser interpretadas junto con otros hallazgos clínicos y de laboratorio (42).

- Pruebas basadas en microscopía: La microscopía de frotis es una de las técnicas más antiguas y utilizadas para detectar la TB. Utiliza una tinción ácido-resistente, como la tinción de Ziehl-Neelsen, para identificar las bacterias de *Mycobacterium tuberculosis* en una muestra de esputo. Aunque es rápida y económica, su sensibilidad es relativamente baja, y puede dar resultados falsos negativos, especialmente en infecciones paucibacilares. Por otro lado, la microscopía de fluorescencia es generalmente más sensible pero requiere equipos especializados (43).
- Pruebas basadas en cultivo: Los cultivos en medios sólidos o líquidos son la referencia estándar para el diagnóstico de TB, ofreciendo mayor sensibilidad que la microscopía e incluso proporcionar información de resistencia a antibióticos. Sin embargo, pueden tardar varias semanas en proporcionar resultados, lo cual puede retrasar el tratamiento. Además, requieren laboratorios bien equipados y personales capacitados. Siendo los medios más usados, el medio de cultivo sólido Lowenstein-Jensen, medios de cultivo líquido Middlebrook 7H9/

7H10/ 7H11, y sistemas automatizados BACTEC (Ejm: BACTEC MGIT 960) (44, 45, 46).

- Pruebas inmunológicas: Las pruebas de liberación de interferón gamma (IGRA) miden la respuesta inmune del huésped a antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Aunque no diferencian entre infección latente y enfermedad activa, ofrecen una alternativa a la prueba cutánea de la tuberculina (TST), que puede dar resultados falsos positivos en individuos vacunados con BCG (47).
- Pruebas moleculares: Las técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la prueba Xpert *Mtb*/RIF, detectan la presencia de ADN o ARN específico de *M. tuberculosis*. La prueba Xpert *Mtb*/RIF, en particular, puede proporcionar resultados en menos de dos horas y también detectar la resistencia a la rifampicina. Por otro lado, la prueba basada en secuenciación de nueva generación (NGS) puede identificar múltiples mutaciones asociadas con la resistencia a varios fármacos, incluyendo MDR. Estas técnicas son altamente sensibles y específicas pero requieren equipos costosos y especializados (48, 49).

IV.5 Tratamiento de la tuberculosis

En la historia temprana de la TB, antes de la década de 1940, no había tratamientos eficaces disponibles, y las medidas terapéuticas consistían principalmente en el reposo y la nutrición. La primera revolución en el tratamiento de la TB llegó con la introducción de la estreptomicina en 1944, el primer antibiótico eficaz contra la TB (39). Durante las décadas siguientes, se desarrollaron y añadieron varios medicamentos antituberculosos como la isoniazida (INH) y la rifampicina (RIF), estableciendo la base de la terapia de primera línea actual.

El régimen estándar de tratamiento de primera línea para la TB sensible a los medicamentos se compone de una fase intensiva con cuatro fármacos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol) durante dos meses, seguida de una fase de continuación con INH y RIF durante cuatro meses (50). La terapia de primera línea ha mostrado ser altamente eficaz, con tasas de curación superiores al 90% cuando se administra correctamente.

La TB resistente a medicamentos (MDR-TB) representa un desafío significativo y requiere un tratamiento más largo y complejo con medicamentos de segunda línea. Estos medicamentos incluyen fluoroquinolonas y agentes inyectables, como la kanamicina y la amikacina (50). En años recientes, la aprobación de nuevos medicamentos como bedaquilina y delamanida ha ofrecido nuevas esperanzas para el tratamiento

de la MDR-TB y la TB resistente a medicamentos de segunda línea (XDR-TB) (51).

IV.6 Pirazinamida

La pirazinamida es un compuesto análogo de la nicotinamida, que fue sintetizado químicamente por primera vez en 1936 (52). En su introducción inicial durante la década de 1950, la PZA demostró una prometedora actividad antimicobacteriana en estudios in vitro (53). McDermott y Tompsett, pioneros en la investigación de la PZA, revelaron que esta sustancia carecía de actividad en las condiciones típicas de cultivo in vitro, y en cambio, requería una incubación a un pH ácido similar al que se asocia con la inflamación activa, específicamente en los fagolisosomas de los macrófagos activados (54). Con el paso de los años, la PZA obtuvo la aprobación para su uso en combinación con otros fármacos, debido a la actividad sinérgica esterilizante que se descubrió entre la pirazinamida e isoniazida (55).

En el presente, la PZA es un componente clave en el régimen de tratamiento de primera línea para la TB, especialmente en la fase intensiva del tratamiento. Su capacidad para actuar sobre las formas latentes de la bacteria ha tenido un impacto significativo al acortar la duración total de la terapia de 9 a 12 meses a tan solo 6 meses. Su habilidad para atacar las poblaciones bacterianas en estado latente ha sido crucial para la eficacia del tratamiento a

corto plazo. La importancia de la PZA en el control global de la TB no puede ser subestimada, y continúa siendo un área activa de investigación y desarrollo en el campo de la terapéutica antituberculosa (4, 5, 6).

IV.7 Nicotinamidasa/Pirazinamidasa (PZAsa)

La enzima nicotinamidasa/pirazinamidasa (PZAsa) es codificada por el gen *pncA* en *Mtb*. Este gen desempeña un papel crucial en el rescate de nicotinamida para la vía metabólica de Preiss y Handler, la cual está estrechamente relacionada con la biosíntesis de NAD^+ en diversos microorganismos y células eucariotas (10, 56, 57). La vía de recuperación de Preiss y Handler comprende tres pasos que implican la conversión de ácido nicotínico en ácido nicotínico mononucleótido (NaMN), seguida por la formación de ácido nicotínico dinucleótido (NaAD), y finalmente su conversión a NAD^+ . Tanto NaMN como NaAD son intermediarios cruciales en la vía biosintética de novo de NAD^+ . En diversas bacterias incluyendo *M. tuberculosis* y el microorganismo modelo *E. coli*, el proceso de recuperación de ácido nicotínico y su conversión subsiguiente a NaMN está facilitado por la enzima nicotinato fosforribosiltransferasa, la cual es codificada por el gen *pncB*. Se ha observado que en el genoma de *Mtb*, este gen se encuentra duplicado, lo que sugiere una posible importancia funcional o regulatoria adicional en la biosíntesis de NAD^+ (12). Por el contrario, el gen *pncA* codifica para una enzima nicotinamidasa que convierte la nicotinamida en ácido nicotínico, siendo este último un componente esencial para la vía

metabólica de Preiss y Handler (10, 56, 57). En *Mtb*, la contribución de la vía de rescate de nicotinamida a través del gen *pncA* parece no ser tan significativa para el metabolismo NAD^+ y la supervivencia bacteriana, en comparación con la vía de rescate de ácido nicotínico o la vía biosintética de novo. Se ha demostrado que *Mtb* podría emplear múltiples vías para recuperar precursores de NAD^+ . Además, esta bacteria exhibe una notable plasticidad metabólica en lo que respecta a la biosíntesis de NAD^+ durante la infección (11, 12, 13).

Por otro lado, la enzima PZAsa es clave para el metabolismo de la droga PZA, análogo a la nicotinamida. Actualmente se conoce que esta enzima es una metaloenzima, cuya naturaleza del cofactor metálico aún no se encuentra esclarecido. En el 2008, Hua Zhang *et al.* encontraron que la PZAsa recombinante de *Mtb* contenía hierro y manganeso en un ratio molar de 1:1 ($[\text{Mn}^{2+}]: [\text{Fe}^{2+}]$), usando espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (20). En cambio, dos años después, Sheen *et al.* encontraron Zn^{+2} en la fracción de elución de la proteína PZAsa recombinante, semejante a lo encontrado en el cristal de la PZAsa de *P. horikoshii* (37% idéntica) (21,23). Este mismo estudio reveló que la incubación con cobalto (Co^{+2}), manganeso (Mn^{+2}) y zinc (Zn^{+2}) fueron necesarios para recuperar la actividad de la enzima PZAsa quelada *in vitro*, mientras que el hierro en sus estados de oxidación Fe^{+2} y Fe^{+3} no logró recuperar la actividad enzimática (21). No obstante, en el 2011, Petrella y colaboradores encontraron hierro (Fe^{+2}) en la estructura cristalizada de la

PZAsa de *Mtb*. Asimismo dieron a conocer que el sitio activo estaba conformado por los residuos Asp-8, Lys-96 y Cys-138, mientras que el sitio de coordinación de metal, estaba conformado por los residuos Asp-49, His-51, His-57 y His-71 (19). A pesar de estos descubrimientos, todavía persisten incertidumbres acerca de la naturaleza exacta del metal en la enzima, y se han propuesto como principales candidatos el Fe^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} (19, 20, 21, 22).

El cofactor metálico de la enzima PZAsa cumple un rol catalítico dentro de la enzima. De acuerdo a lo propuesto por Du XL, *et al*, este metal participa en la formación de agua activada, el cual es necesario para la formación del segundo intermediario de la reacción enzimática (23). Por tanto, la carencia del metal, está directamente relacionada con la pérdida de la actividad de la enzima PZAsa. Esto fue demostrado por Sheen *et al.*, quienes al incubar a la PZAsa recombinante con un agente quelante observaron pérdida de actividad de la enzima, el cual fue nuevamente restaurada con la incubación de iones metálicos (21, 29).

IV.8 Mecanismo de acción de la pirazinamida

Los mecanismos de acción y resistencia de la PZA en *Mtb* no están completamente comprendidos (8). La PZA es una prodroga que ingresa en las micobacterias mediante difusión pasiva y, una vez en el citoplasma, se convierte en POA gracias a la acción de la enzima PZAsa (8, 58). El POA,

forma activa del fármaco, se acumula en el citoplasma y es expulsado de los bacilos por medio de un sistema de bombas de eflujo aún no identificado. En un ambiente extracelular ácido, el POA se protona y vuelve a ingresar a la célula, liberando protones y acidificando levemente el citoplasma (59). El transporte y la permeabilidad de la membrana micobacteriana se ven alterados, causando daño celular (53, 59, 60) (Figura 2). La enzima PZAsa se expresa de manera constitutiva (53,60), y cualquier cambio en la expresión del gen *pncA*, podría afectar la actividad general de la PZAsa.

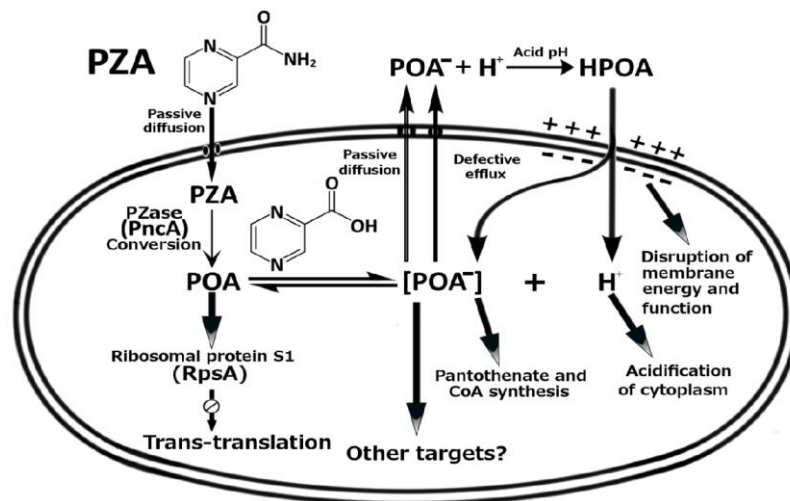


Figura 2: Mecanismo de acción y resistencia a PZA propuesto en *M. tuberculosis*. Fuente: Ying Zhang, et al. (2013) (7)

IV.9 Mecanismo de resistencia a pirazinamida

La resistencia a la pirazinamida en *Mtb* es principalmente explicada por la presencia de mutaciones en el gen *pncA*, gen que codifica para la enzima PZAsa. Esta enzima es responsable de convertir la PZA en su forma activa (POA). Las mutaciones en *pncA* pueden llevar a una disminución o pérdida completa de la actividad enzimática de PZAsa, lo que a su vez impide la conversión de PZA a POA y, en consecuencia, reduce la actividad antimicobacteriana de la PZA. Estas mutaciones han sido identificadas en aproximadamente el 72% al 97% de las cepas de *Mtb* resistentes a PZA y están distribuidas a lo largo de todo el gen, principalmente en la región promotora, sitio activo y sitio de coordinación de metales (58, 60, 61).

A lo largo de los años, se han propuestos nuevos mecanismos de resistencia a la pirazinamida en *Mtb* diferentes a las mutaciones en el gen *pncA*. En 2011, Shi W. *et al.*, mostró que la PZA inhibe la trans-traducción en *Mtb*, un proceso para la supervivencia bacteriana en condiciones de estrés (62). En este estudio, se propuso a la proteína ribosómica S1 (*RpsA*), como posible objetivo para la unión con POA. Para ello, los autores estudiaron una variante mutante de *RpsA*, llamada *RpsA* Δ A438, hallada en una cepa resistente a la PZA de *Mtb*. Los experimentos revelaron que esta variante no interactuaba con POA ni afectaba la actividad de trans-traducción, a diferencia de la versión de tipo salvaje de *RpsA*. Sugiriendo que el POA se une al extremo C-terminal de *RpsA*, inhibiendo la trans-traducción en *Mtb*.

Sin embargo, Dillom *et al.*, no encontraron una interacción de afinidad entre POA y *RpsA* utilizando la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) cuando se normalizaron las concentraciones de POA y pH (63). Además, se dio a conocer que la cepa DHMH444 de *Mtb* con el polimorfismo *RpsA* Δ A438 demostró ser susceptible a PZA en un modelo murino de infección (64). Estas inconsistencias subrayan la complejidad del mecanismo de resistencia a la PZA y señalan la necesidad de una investigación más exhaustiva.

Por otro lado, se ha reportado la posible implicación del gen Rv3601c en el mecanismo de resistencia a la PZA en *Mtb*. Este gen codifica para una aspartato 1-descarboxilasa (*PanD*) el cual participa en la síntesis de B-alanina, precursor de la biosíntesis de pantotenato y coenzima A, moléculas esenciales para la supervivencia bacteriana. Shuo Zhang *et al.*, dieron a conocer la existencia de mutaciones en el gen Rv3601c que estaban vinculadas con la resistencia a la PZA en cepas de *Mtb* que no presentaban alteraciones en los genes *pncA* y *RpsA* (65). Asimismo, Gopal *et al.*, demostraron que el tratamiento con POA condujo a una disminución en las concentraciones de todos los precursores de coenzima A, downstream al paso catalítico mediado por *PanD*. También observaron que el POA, pero no su forma inactiva PZA, se unía a *PanD*, una interacción que no ocurrió en las versiones mutantes de la enzima. Basándose en estos resultados, los autores sugirieron que *PanD* es un blanco directo del POA y que su unión bloquea la vía de síntesis de la coenzima A (66). Estudios posteriores revelaron que esta

inhibición en la síntesis de coenzima A se producía a través de la participación de una proteasa conocida como caseinolítica ClpC1-ClpP. En el 2020, Gopal *et al.*, demostraron que la porción del extremo C terminal de la enzima *PanD*, compuesta por 13 aminoácidos, actúa como una etiqueta de degradación reconocida por el sistema ClpC1-ClpP. En consecuencia, la unión del POA a *PanD* provoca un incremento en la degradación del objetivo en cuestión (67). Curiosamente, se había reportado previamente que las mutaciones presentes en ambos genes provocan el mismo nivel de resistencia de PZA/POA en *Mtb*, dando a sugerir un posible vínculo entre el mecanismo de acción entre estos genes (68).

Otros de los orígenes de resistencia a PZA que hoy en día se encuentra en constante investigación son las bombas de eflujo. Estas proteínas transmembrana, responsables de expulsar sustancias tóxicas como los antibióticos fuera de la célula bacteriana, han sido vinculadas a la resistencia a PZA. En 2017, Zhang Y *et al.*, identificaron cuatro genes de bombas de eflujo (Rv0191, Rv3756c, Rv3008, Rv1667c), cuyos niveles de sobreexpresión individual estaban relacionados con la resistencia a PZA en *Mtb* (69).

La relación entre las bombas de eflujo y la resistencia a PZA fue posteriormente corroborada en 2019 por Liu J, *et al.*, quienes encontraron una asociación entre la mutación V219A/S292L en el gen de bomba de eflujo Rv1258c y la resistencia a pirazinamida, isoniazida y estreptomicina en *Mtb*

(70). A pesar de estos hallazgos, el papel exacto de las bombas de eflujo en el mecanismo de resistencia a PZA aún no ha sido tan claramente definido como otros mecanismos de resistencia.

IV.10 Metalochaperonas

Las metalochaperonas son proteínas altamente especializadas que facilitan la inserción eficiente y segura de iones metálicos en las metaloenzimas. Esta función garantiza que los metales apropiados sean incorporados con precisión en los lugares correctos de las enzimas que requieren estos cofactores. Las metalochaperonas también tienen un papel esencial en el equilibrio de los metales en la célula, ofreciendo protección contra el estrés tóxico relacionado con los metales y asegurando que las enzimas metalodependientes mantengan su actividad funcional (71,72). Además, se ha demostrado que las metalochaperonas garantizan que el metal correcto sea insertado de manera específica en la enzima correspondiente. Esto es particularmente relevante en entornos donde múltiples metales compiten por el mismo sitio de unión (73). El conocimiento sobre las metalochaperonas sigue siendo incompleto a pesar del papel esencial que desempeñan en la célula; no se comprende cabalmente cómo reconocen y distinguen entre diferentes iones metálicos y metaloenzimas. (74). La red de interacciones entre metalochaperonas y metaloenzimas es compleja y no está completamente descrita en diversos microorganismos (75). Por último, se conoce poco del rol de las metalochaperonas en el desarrollo de las enfermedades, y de la

farmacorresistencia de diversos patógenos, a pesar de algunos hallazgos que se han encontrado en este sentido (76,77).

IV.11 Identificación de metalochaperonas candidatas a PZAsa

En la actualidad, no se cuenta con genes de metalochaperonas de PZAsa anotadas en el genoma de *Mtb*. Sin embargo, se han propuesto posibles genes candidatos a desempeñar este rol en esta bacteria. Sheen *et al.*, encontraron que el gen Rv2059, homólogo a una proteína transportadora de Zinc en *E. coli*, podría recuperar más del 50% de la actividad de la enzima Apo-PZAsa-*Mtb in vitro*. Sin embargo, la inactivación de este gen en la bacteria, no estuvo asociado significativamente a cambios en la susceptibilidad a PZA y tasa de flujo de POA (29).

Por otro lado, en el año 2020 se comenzó un proyecto de investigación de naturaleza *in silico* en el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, como parte del proyecto ICGEB “Role of a metallochaperone in the mechanisms of action and resistance to pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*”, con la finalidad de anotar y predecir genes candidatos a metalochaperonas de PZAsa en *Mtb*. En el presente trabajo (resultados aún no publicados), se anotaron genes de metaloproteínas candidatos a metalochaperonas en *Mtb*, mediante una búsqueda por homología usando la herramienta BLAST® v.2.6.0

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Posteriormente, los genes anotados, se filtraron y seleccionaron de acuerdo a la información existente de cada uno de ellos en la literatura. Se seleccionaron aquellos genes que no tengan funciones asociadas a metaloenzimas, proteínas de membrana, factores de transcripción, etc. Asimismo, se incorporaron en el estudio, aquellos genes que se encontraban anotados como proteínas hipotéticas.

A continuación, se recuperaron las estructuras 3D predichas de cada proteína candidata a metalochaperona de PZAsa-*Mtb* desde la "Base de datos de estructura de proteínas AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/search/text/O53500?suggested=true>)". En casos en los que la proteína no estaba incluida en la base de datos, se realizaron modelos utilizando la versión local de AlphaFold v.2.X (78). Posteriormente, se procedió a modelar la esfera de coordinación de cada estructura proteica con su respectivo metal. Durante este proceso, se ajustó el estado de protonación de los residuos de histidinas y cisteínas a un pH de 7.

Se identificaron los residuos de coordinación y los átomos donadores al metal con base en centros metálicos y secuencias previamente reportadas en la literatura. Asimismo, se determinó la geometría de coordinación del centro metálico, y se finalizó con una minimización de energía del centro de coordinación. Este paso implicó optimizar la geometría de coordinación mediante herramientas bioinformáticas, calculando los parámetros de coordinación entre el metal y los residuos donadores.

Finalmente, se realizó un ensayo de acoplamiento molecular a ciegas entre el cristal de la PZAsa de *Mtb* (PDB ID: 3PL1) empleando la herramienta local Haddock v.2.4 (19, 79) y cada una de las estructuras de las potenciales metalochaperonas modeladas de los genes candidatos. Como control positivo de interacción, se utilizó el ensayo de acoplamiento molecular de la proteína Rv2059 y el cristal de la PZAsa de *Mtb*, debido a que Rv2059 *in vitro* demostró ser capaz de transferir su cofactor metálico a la enzima Apo-PZAsa-*Mtb* y recuperar su actividad enzimática en más de un 50% (29). En este ensayo control, se encontró que el centro metálico de Rv2059 y el sitio de coordinación de metal de PZAsa-*Mtb* se acoplaban perfectamente uno frente al otro, y se encontraban a una distancia menor de ≈ 16 Å. (Figura 3)

Entre los hallazgos más significativos del ensayo de acoplamiento molecular a ciegas, se destacó que las proteínas hipotéticas de Zn^{+2} , Rv0944 y Rv2102, exhibieron conformaciones propicias para prever una posible transferencia de metal desde las metalochaperonas candidatas hacia la metaloenzima. Las conformaciones de interacción con mayor puntuación energética mostraron distancias de interacción entre centros metálicos más cercanas en comparación con las encontradas en Rv2059 (11.34 Å y 14.89 Å, respectivamente). (Figura 3, 4 y 5).

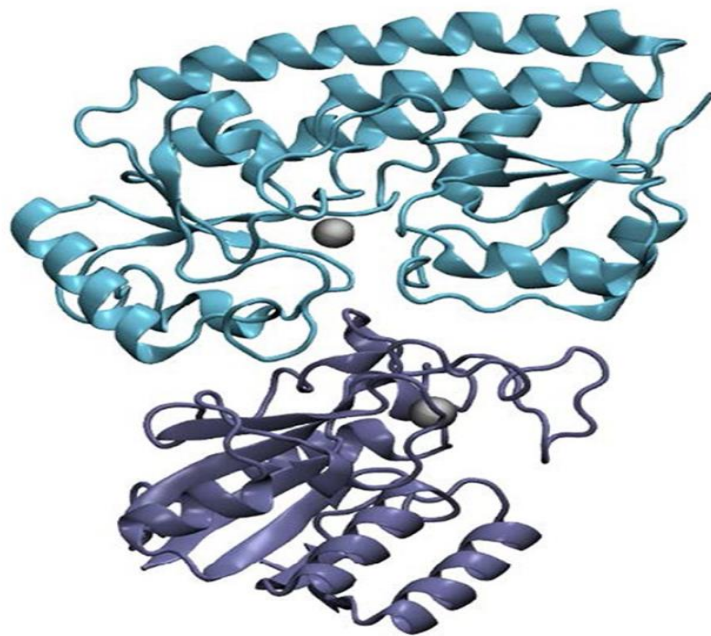


Figura 3: Docking molecular acoplado de la enzima PZAsa de *M. tuberculosis* con la metaloproteína Rv2059. Naranja: PZAsa y Verde: Rv2059. La distancia de interacción fue de 16 Å.

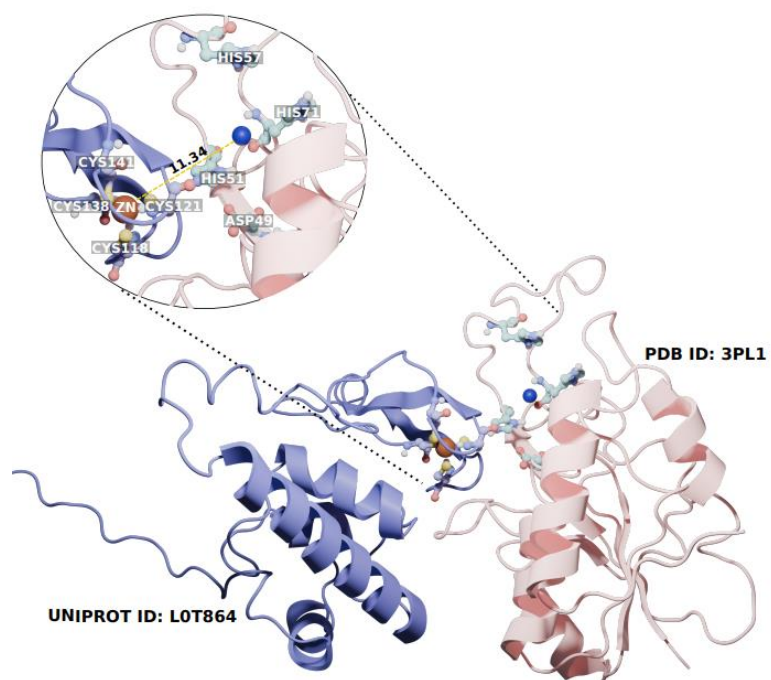


Figura 4: Docking molecular acoplado de la enzima PZAsa de *M. tuberculosis* con la metaloproteína Rv0944 (ID: L0T864). Rosado: PZAsa y Morado: Rv0944. La distancia de interacción fue de 11.34 Å.

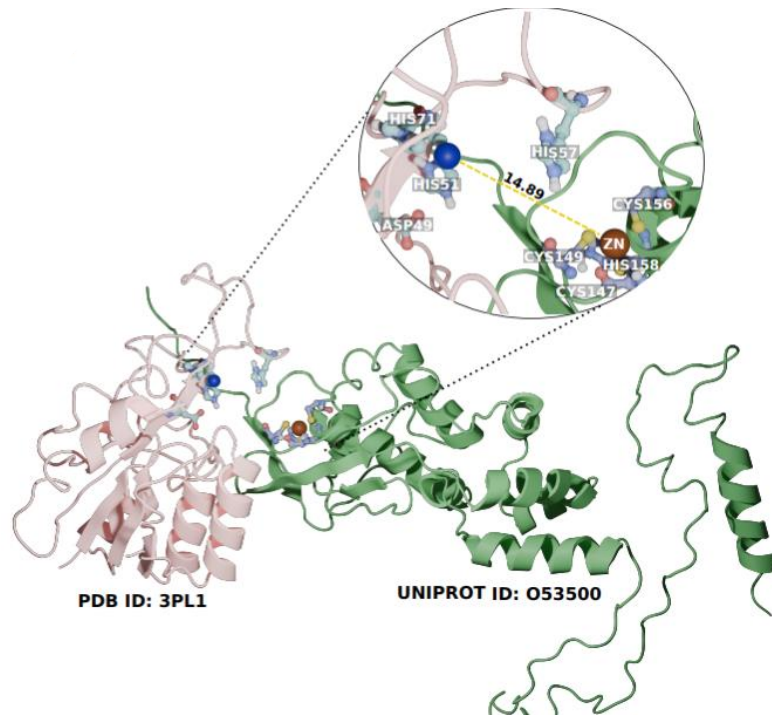


Figura 5: Docking molecular acoplado de la enzima PZAsa de *M. tuberculosis* con la metaloproteína Rv2102 (ID: O53500). Rosado: PZAsa y Verde: Rv2102. La distancia de interacción fue de 14.89Å.

IV.12 TEMA

El ensayo directo de Microplaca Tetrazolio (TEMA) es una técnica clave para evaluar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a una variedad de medicamentos antituberculosos de primera línea. Este método funciona mediante la exposición de cepas de *Mtb* a diferentes medicamentos en concentraciones variables dentro de pocillos en microplacas. Después de un período de incubación, se añade un compuesto de tetrazolio a los pocillos. El tetrazolio actúa como un indicador de la viabilidad celular: las bacterias vivas reducen este compuesto, lo que resulta en un cambio de color observable. El color resultante en los pocillos indica si las bacterias *Mtb* han sobrevivido en presencia de un medicamento específico y, por lo tanto, si la cepa es resistente o susceptible a ese medicamento en particular (80).

La aplicación de esta técnica presenta ventajas notables, como la rapidez en la obtención de resultados y un menor costo en comparación con otros métodos de diagnóstico de susceptibilidad. No obstante, también conlleva desafíos, como la variabilidad en la sensibilidad de las pruebas y la necesidad de manipular cultivos vivos de *Mtb*. A pesar de estas limitaciones, el TEMA conserva su importancia como una herramienta esencial para discernir tratamientos eficaces y contrarrestar la propagación de cepas resistentes no solo a PZA, sino también a otros fármacos utilizados en la lucha contra la tuberculosis (81, 82).

IV.13 ORBIT

ORBIT (Oligonucleotide-mediated recombineering followed by Bxb1 integrase targeting) es una técnica novedosa estandarizada por Kenan C Murphy en el año 2018. ORBIT fue diseñado para eliminar genes cromosómicamente en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* (30). Esta técnica, como su mismo nombre lo indica, combina la recombinación homóloga mediada por un oligonucleótido, seguido de una recombinación de sitio específico. La aplicación de la técnica ORBIT para eliminar genes en un único paso, requiere de los siguientes componentes:

- Plásmido pKM461. Vector que cumple las funciones de recombinación. Este vector expresa la annelease RecT del micobacteriófago Che9c, el cual da lugar a la recombinación homóloga del oligonucleótido sintético sobre el gen target que se desea eliminar (83). Por otro lado, este mismo vector también expresa una integrasa del micobacteriofago Bxb 1, el cual participa en el proceso de recombinación sitio específico del plásmido de selección en el oligonucleótido guía. La expresión de ambos genes está regulada por la presencia de una molécula inductora llamada anhidrotetraciclina (ATc). (Figura 6A)
- Oligonucleótido sintético. Conocido también como oligonucleótido guía. Esta comprende 188 bases, de las cuales los extremos flanqueantes deben contener como mínimo las secuencias

correspondientes a los diez primeros y últimos codones del gen target que se desea eliminar. Al interior de los extremos flanqueantes se encuentra la secuencia de attP (48 bases), reconocido por la integrasa Bxb 1. El diseño del oligo, debe tomarse en base a la hebra rezagada del gen target. (Figura 6B)

- Plásmido de selección (pKM464). Conocido también como vector ORBIT. Este plásmido permitirá seleccionar las cepas que eliminaron el gen target mediante la recombinación del oligonucleótido guía en la ubicación cromosomal del gen de interés. Una característica de este vector es que carece de un origen de replicación en micobacterias (OriM), por tanto, es incapaz de replicarse por sí mismo. Debido a esta característica, el vector contiene una secuencia attB, para poder garantizar la permanencia de este mediante el proceso de recombinación de sitio específico con el oligonucleótido guía localizado en el cromosoma. Por tanto, la integración del vector de selección al cromosoma permitirá la selección de bacterias que eliminaron el gen target mediante la recombinación del oligo, ya que estas cepas conservarán el gen de resistencia del plásmido suicida. (Figura 6C).

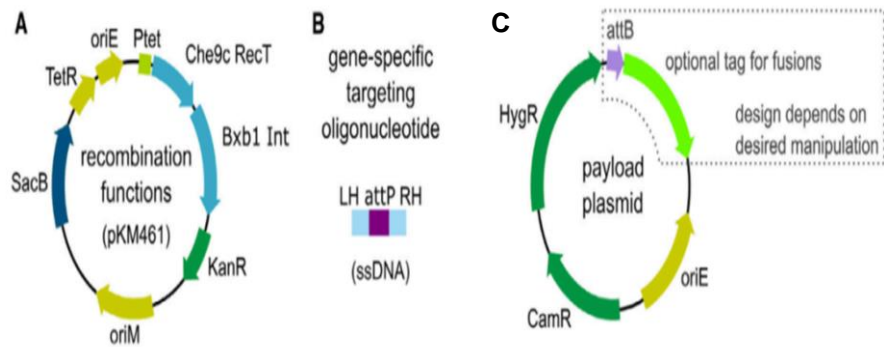


Figura 6 Componentes de la técnica ORBIT. A. Plásmido que cumple las funciones de recombinación (pKM461) expresa de manera inducida las enzimas Che9c-RecT y Bxb 1 Int. B. Oligonucleótido guía diseñado a partir del gen target y contiene la secuencia attP. C. Plásmido de selección (pKM464), contiene la secuencia attB y es un vector no replicativo en *M. tuberculosis*. Fuente: Kenan C.Murphy, 2018 (30).

Los eventos de recombinación de ORBIT para eliminar el gen target, comienza con la inducción de las proteínas Che9c-RecT y Bxb 1 Int en cepas de *Mtb* que han sido previamente transformadas con el plásmido pKM461. Estas cepas se someterán a una segunda transformación, donde se introducirán el oligonucleótido guía y el plásmido pKM464. La enzima Che9c-RecT reconocerá las secuencias homólogas del oligonucleótido guía y lo hibridará en la hebra rezagada del gen target, introduciendo de esta manera la secuencia attP en el cromosoma bacteriano de las células hijas durante el proceso de replicación. Seguidamente la enzima integrasa Bxb1 mediará la

integración del plásmido pKM464, que carga la secuencia attB, al cromosoma bacteriano. Ambos eventos de recombinación ocurren en el mismo periodo de replicación del cromosoma. Por tanto, sólo las cepas de *Mtb* que hayan eliminado el gen target mediante la recombinación del oligonucleótido guía, podrán ser seleccionadas con higromicina, cassette de resistencia del plásmido pKM464. (Figura 7)

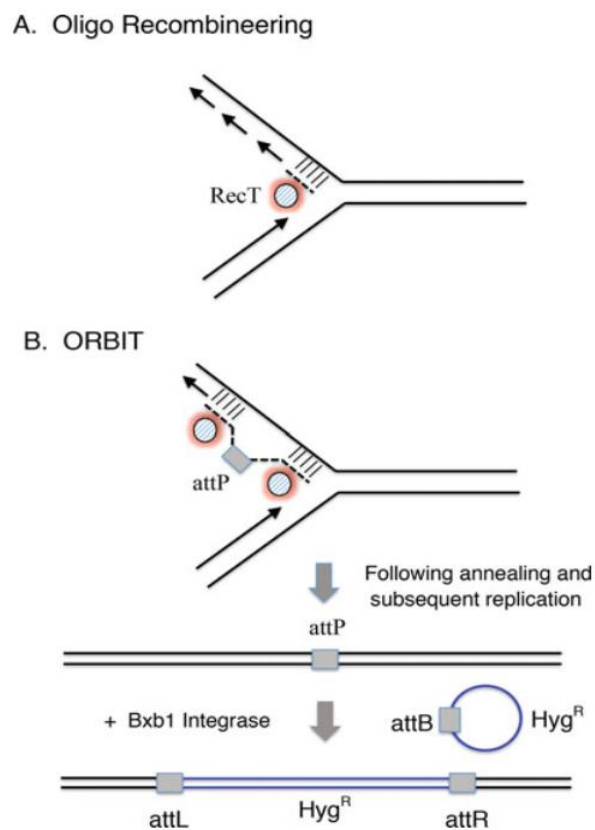


Figura 7. Procesos de recombinación mediados por ORBIT para eliminar un gen target. A. Recombinación del oligonucleótido guía en el gen target. B. Integración del vector de selección ORBIT (pKM464). Fuente: Kenan C.Murphy, 2021. (84)

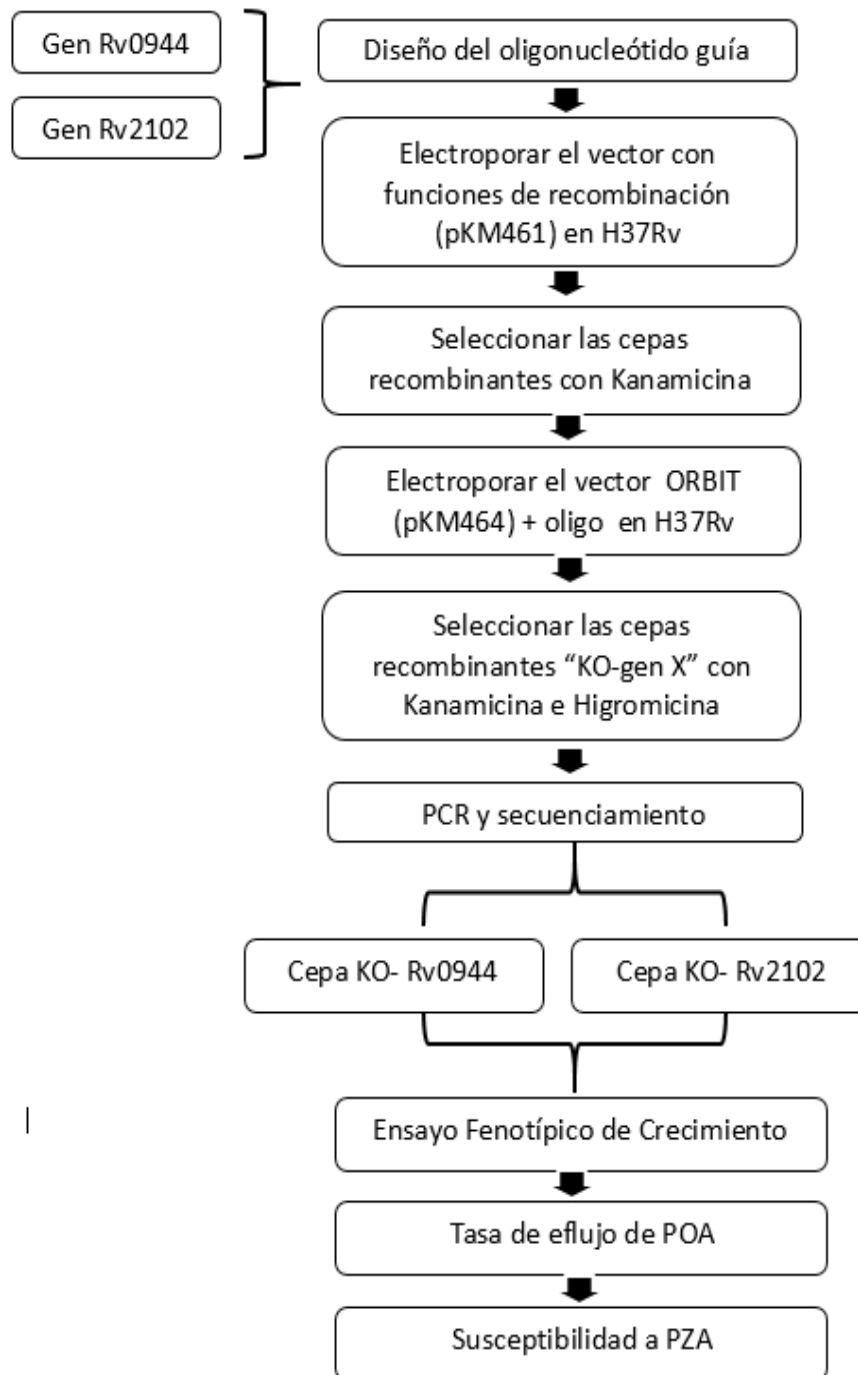
V. METODOLOGÍA

V.1 Tipo de estudio

Este estudio fue de tipo exploratorio-correlacional y de enfoque analítico-experimental.

V.2 Diseño de estudio

Los genes candidatos a metalochaperonas de PZAs a estudiar (Rv0944 y Rv2102) provienen del proyecto ICGEB “Role of a metallochaperone in the mechanisms of action and resistance to pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*” (SIDISI: 204745). Ambos genes fueron removidos de manera individual en la cepa H37Rv de *Mtb*, mediante la técnica ORBIT. Para luego evaluar el efecto de la remoción de cada gen sobre la tasa de eflujo de POA y la susceptibilidad a PZA en la bacteria. (Esquema 1)



Esquema 1: Flujograma de Trabajo

V.3 Lugar de estudio

El presente estudio se realizó en el laboratorio de *M. Tuberculosis* de bioseguridad nivel III y laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de bioseguridad nivel II de bioseguridad de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

V.4 Material Biológico

El laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia dispone de un banco de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, las cuales se encuentran criopreservadas siguiendo las normas de bioseguridad. La lista de cepas de *M. tuberculosis* empleadas en este estudio se encuentra en la tabla 1.

Los plásmidos pKM461 y pKM464 empleados para remover los genes Rv0944 y Rv2102, fueron donados por el Dr. Anthony Baughn, del departamento de Department of Microbiology and Immunology de la Universidad de Minnesota. Por otro lado, los oligonucleótidos guías diseñados y empleados en el presente estudio, fueron sintetizados por la empresa biotecnológica “Integrated DNA Technologies (IDT)”.

Tabla 1: Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* empleadas en el presente estudio y sus características

Cepa	Características	Referencia
H37Rv	Wild type	Laboratorio BBM LID
H37Rv KO- <i>pncA</i>	<i>pncA</i> ::hyg	Boshoff et al. (85)
DM 97	MDR	Laboratorio BBM LID

V.5 Procedimiento experimental

V.5.1. Remoción de los genes candidatos a metalochaperonas de PZAsa mediante la técnica de ORBIT en *M. tuberculosis*.

V.5.1.1 Diseño del oligonucleótido guía

Durante la duplicación del cromosoma bacteriano, el oligonucleótido guía empleado en la técnica ORBIT se recombina como un fragmento de okazaki en la ubicación del gen target; por tanto, las secuencias flanqueantes que conforman los oligonucleótidos guía deben diseñarse como el reverso complementario de la hebra parental que se replica de forma rezagada (30,84).

El diseño del oligonucleótido guía se inició con la creación de una secuencia precursora del oligo. Para esto, se ha generado un archivo de secuencias de ADN utilizando la hebra codificante de los genes objetivo

a evaluar, que corresponden a las proteínas candidatas a metalochaperonas de PZAsa (Rv0944, Rv2102). Este archivo abarcó desde 200 bases aguas arriba del codón de inicio hasta 200 bases aguas abajo del codón de parada. Cada uno de los extremos flanqueantes de la secuencia precursora de oligonucleótido guía se compuso de 70 bases, incluyendo los 10 primeros y últimos codones de cada gen objetivo. La secuencia attP reconocida por la integrasa Bxb1 (GGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGT ACAAACC) se insertó en el centro de las secuencias flanqueantes extraídas de cada gen objetivo.

Para seleccionar la secuencia final que dará lugar a los oligonucleótidos guía de cada gen, se aplicó la siguiente regla: “Si la dirección de la transcripción del gen target apunta hacia el origen cromosómico, se selecciona la secuencia precursora del oligonucleótido guía como el oligonucleótido guía. Si la dirección de transcripción del gen objetivo apunta en sentido contrario al origen cromosómico, se seleccionará a la hebra complementaria de la secuencia precursora de oligonucleótido guía como el oligonucleótido guía”. En ambos casos, la secuencia del oligonucleótido guía se diseñó como el reverso complementario de la hebra que se replica de forma rezagada en cada gen target.

V.5.1.2 Electroporación del vector pKM464 (1ra Electroporación)

Preparación de células competentes. La cepa H37Rv de *Mtb* fue cultivada en 5 ml de caldo 7H9 enriquecido con un 10% de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa), 0.2% de glicerol y 0.05% de Tween 80 a 37°C con agitación constante (200 rpm) durante 10 días. Luego, se transfirió 3 ml del cultivo saturado a un matraz con 50 ml de caldo 7H9 enriquecido y se incubó en agitación constante a 37°C hasta que alcanzó un OD: 0.6-0.8. Posteriormente, se agregó 5 ml de glicina 2M. El cultivo con glicina se incubó a 37°C durante 16 horas. Luego, se cosechó las células por centrifugación a 3000 g durante 10 min a 17°C y se resuspendió en 10 ml de glicerol al 10%. Este paso se repitió dos veces. Finalmente, se volvió a cosechar las células por centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 10%.

Para la electroporación, se dispusieron 200 µl de células competentes en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, al cual se le añadieron 5 µl del plásmido pKM461, alcanzando así una concentración final de 150 ng/µl. La suspensión celular se transfirió a una cubeta de electroporación. La electroporación se llevó a cabo mediante un pulso de 2.5 kV, 25 µF, 1000 ohmios, y un tiempo de pulso óptimo de 22 ms. La suspensión celular se recuperó en 5 ml de medio 7H9 enriquecido y se incubó a 37°C con agitación constante durante 16 horas. Después de

eso, las células se recuperaron por centrifugación a $3000\times g$ durante 10 min a 17°C y se resuspendieron en 1 ml de medio 7H9-OADC. Luego se prepararon diluciones del cultivo con medio 7H9 enriquecido (1:100, 1:1000).

Finalmente, se sembró 1 μl de la muestra directa y las respectivas diluciones, de manera independiente, en placas 7H10-OADC con y sin antibiótico (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina) y se procedió a incubar a 37°C durante 3 semanas. (Figura 8).

Se llevaron a cabo los siguientes controles de electroporación:

1. Control de cepa: Se electroporó solo la cepa H37Rv y se sembró en placas con y sin antibiótico, con el fin de verificar si la cepa utilizada para la electroporación estaba libre de contaminación.
2. Control de agua: Se electroporó la cepa H37Rv con agua PCR y se sembró en placas con y sin antibiótico, con el fin de verificar si el agua PCR utilizada para resuspender el plásmido pKM461 estaba libre de contaminación.

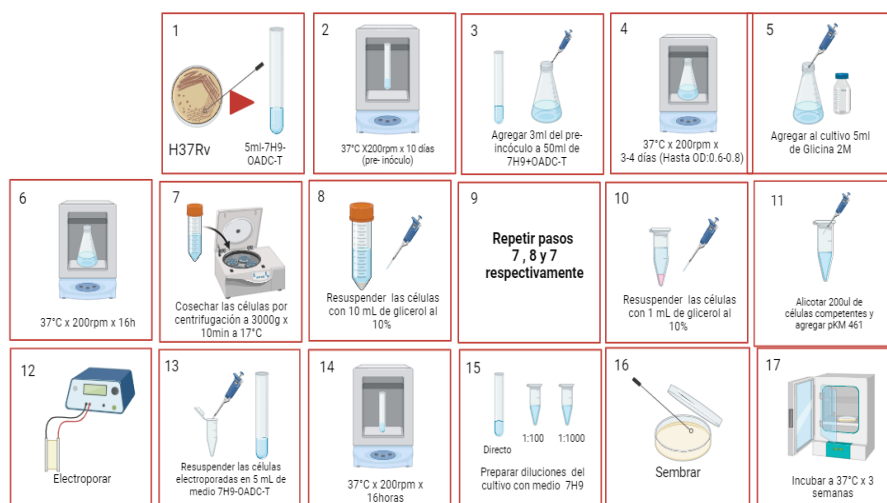


Figura 8: Electroporación del plásmido pKM461 en H37Rv *M. tuberculosis*. Pasos en la electroporación del plásmido pKM461 en la cepa H37Rv de *Mtb*. El plásmido pKM461 expresa de manera inducida las proteínas Che9c RecT e integrasa Bxb 1 encargados de los procesos de recombinación.

V.5.1.3 Preparación de crioviales saturados de H37Rv+ pKM461

A partir de una placa crecida de 3 semanas de una colonia aislada de H37Rv electroporado con el plásmido pKM461, se transfirió 2 asadas de cultivo sólido a un matraz conteniendo 50 ml de medio 7H9-OADC-T y se incubaron a 37°C con agitación durante aproximadamente dos semanas, hasta alcanzar un valor final del OD dentro del rango deseado (1.3-1.8).

Las células fueron recolectaron mediante centrifugación a 2000×g durante 20 min a 4°C y se suspendieron en 6 ml de medio 7H9-OADC

enriquecido con un 50% de glicerol. Finalmente, estas células se alicotaron en tubos de crioviales de 2 ml y se almacenaron a una temperatura de -70°C hasta que fueran necesarias para su uso.

V.5.1.4 Electroporación del vector pKM464 y oligonucleótido guía (2da electroporación)

A partir de un criovial saturado que contenía cepas H37Rv previamente transformadas con el plásmido pKM461 (kanR), se añadió 500 μl de suspensión celular a un matraz con 50 ml de medio 7H9-OADC-T (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina). Las células se cultivaron con agitación constante (200 rpm) a 37°C hasta que alcanzaron un OD de 0.8-1. Luego, se agregó al cultivo celular una solución de anhidrotetraciclina (ATc) disuelta en etanol absoluto (500 $\text{ng}/\mu\text{l}$). El cultivo se incubó a 37°C con agitación constante durante 8 horas.

Posteriormente, se agregó 5 ml de glicina 2M al cultivo, y se incubó a 37°C con agitación durante 16 horas adicionales, para inducir la formación de células competentes. Luego, las células se recolectaron mediante centrifugación a $3000\times g$ durante 10 min a 17°C y se resuspendieron en 30 ml de glicerol al 10%. Este paso se repitió dos veces. Finalmente, las células recolectadas por centrifugación se resuspendieron en 3 ml de glicerol al 10%.

Para la electroporación, se dispusieron 400 μl de células competentes en una cubeta de electroporación, a las que se agregaron 400 ng de plásmido pKM464 y 1 μg de oligonucleótido guía. La electroporación

se realizó con un pulso de 2.5 kV, 25 μ F, 1000 ohmios y un tiempo de pulso óptimo de 22 ms.

La suspensión celular se recolectó en 5 ml de medio 7H9 enriquecido, y se incubó a 37°C con agitación constante durante 16 horas. Después de este período, las células se recuperaron por centrifugación a 3000 \times g durante 10 min a 17°C y se resuspendieron en 1ml de medio 7H9-OADC. Luego se prepararon diluciones (1:10 y 1:60) con medio 7H9 enriquecido.

Finalmente, se sembraron 100 μ l de la muestra directa y las respectivas diluciones, de manera independiente, en placas 7H10-OADC con y sin antibiótico (50 μ g/ml de higromicina + 25 μ g/ml kanamicina) y se incubaron a 37°C durante 3 semanas (Figura 9).

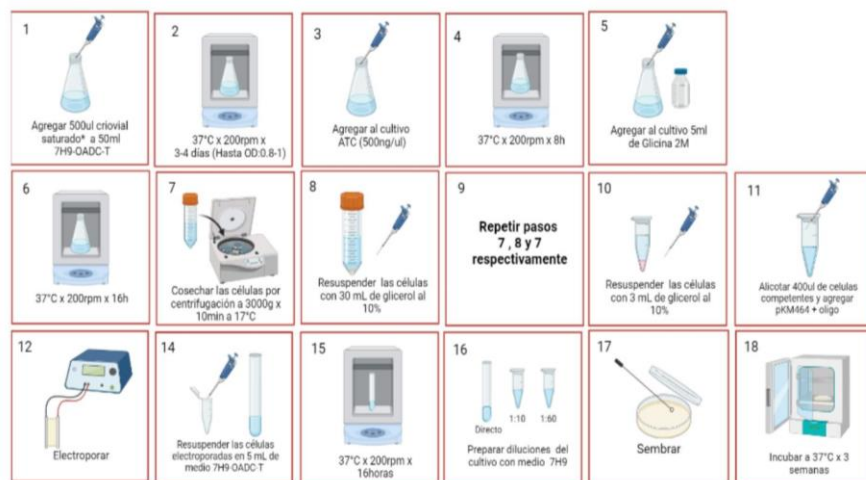


Figura 9: Electroporación del plásmido pKM464 + oligo en H37Rv *M. tuberculosis*: En la figura se muestran los pasos a seguir para obtener una electroporación exitosa del plásmido pKM464 + oligonucleótido guía del gen target en H37Rv.

Como parte de los controles de electroporación, se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

A. Control de oligo: La cepa H37Rv se electroporó con el plásmido pKM464 sin la presencia del oligonucleótido guía. Luego, se sembró en placas con y sin antibiótico. El propósito de este control fue verificar que las cepas seleccionadas en presencia de higromicina correspondieran exclusivamente a las cepas que hayan recombinado el oligonucleótido guía e integrado el plásmido suicida (pKM464) en la ubicación del cromosoma donde se encontraba el gen objetivo (Figura 10).

B. Control de cepa: Se realizó una electroporación solo con la cepa H37Rv, y luego se sembró en placas con y sin antibiótico. Este control tenía como objetivo confirmar que la cepa utilizada para la electroporación estuviera libre de contaminación (Figura 10).

C. Control de agua: La cepa H37Rv se electroporó utilizando agua PCR en lugar del oligonucleótido guía, y luego se sembró en placas con y sin antibiótico. Este control se efectuó para asegurarse de que

el agua PCR, empleada para resuspender el plásmido pKM464 y el oligonucleótido guía, estuviera libre de contaminantes (Figura 10).

Tabla 2: Número de electroporaciones realizadas

N ^o	Nombre	Electroporación			
		Cepa (H37Rv+pK M461)	Oligo	pKM 464	Agua PCR
1	H37Rv KO Rv0944	+	Rv0944	+	-
2	H37Rv KO Rv2102	+	Rv2102	+	-
3	Control de oligo	+	-	+	-
4	Control de cepa	+	-	-	-
5	Control de agua	+	-	-	+

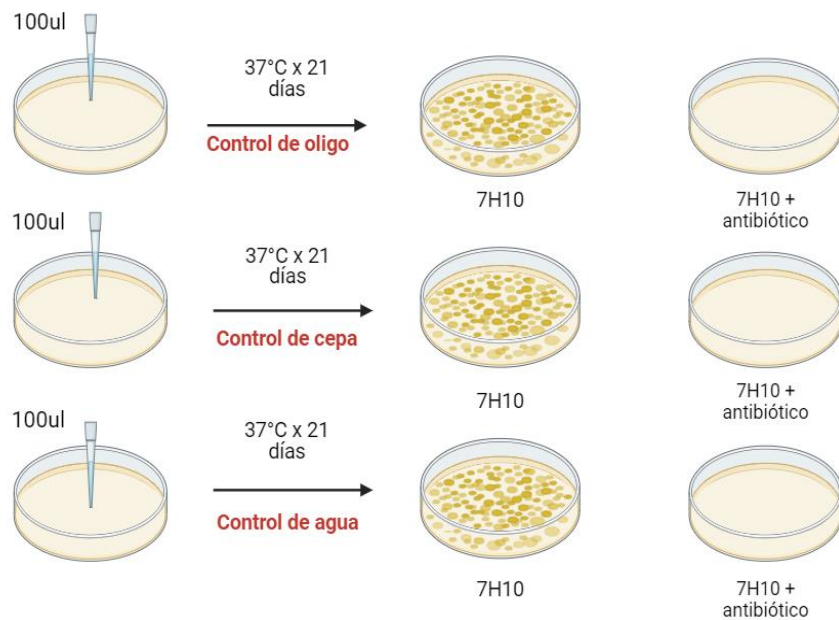


Figura 10: Controles de electroporación.

V.5.1.5 Confirmación de los procesos de recombinación y eliminación de los genes objetivos.

La eliminación de los genes objetivos en las cepas recombinantes se verificó mediante PCR y secuenciamiento de las uniones laterales (Figura 11). Para ello, se diseñaron primers direccionados a las regiones upstream y downstream del cromosoma que no contienen las secuencias flanqueantes de los oligonucleótidos ORBIT (Primer #3 y #4 de la figura 11), y primers que contienen las secuencias oriE e hygR del plásmido pKM 464 (Primer #5 y #6 de la figura 11). El secuenciamiento de los productos de PCR de las uniones laterales generados por los primers #3 y #5 + #6 y #4, nos permitió verificar los

procesos de recombinación mediados por ORBIT en la ubicación de los genes target.



Figura 11: Verificación por PCR de las cepas recombinantes. El diagrama muestra la ubicación de los primers que se emplearon para verificar los procesos de recombinación mediada por la técnica ORBIT y la eliminación del gen target.

Tabla 3: Primers para confirmación de los procesos de recombinación y eliminación de los genes objetivos.

Cepa	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Tamaño del producto de PCR
H37Rv-KO Rv0944	CGC CTG GAA ACG CAC AAC (#3)	CCT GCT GGG TTT CCG CAC (#5)	455 pb unión lateral izquierda
	GAC CAA CAT CTT CGT GGA CCT (#6)	GGC GAA GGA CTG GGC CAT (#4)	618 pb unión lateral derecha
H37Rv-KO Rv2102	GA CTT GGT GGT CAC CGA CGG (#3)	CCT GCT GGG TTT CCG CAC (#5)	458 pb unión lateral izquierda

H37Rv KORv2102	GAC CAA CAT CTT CGT GGA CCT (#6)	TGG GAA CCG GTG CCA ACC (#4)	647 pb unión lateral derecha
-------------------	-------------------------------------	---------------------------------	------------------------------------

V.5.1.5.1 Verificación por PCR

La extracción de ADN se realizó a partir de las cepas H37Rv recombinadas que carecían de los genes objetivo (Rv0944 y Rv2102, respectivamente) utilizando el método de la proteinasa K (consultar los detalles en anexos). El producto de ADN extraído se diluyó a una proporción de 1/10 y luego se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de las uniones laterales en cada una de las cepas recombinantes. Para este procedimiento, se preparó un "master mix" para cada par de cebadores, como se indica en la tabla 3. En cada mezcla se añadieron 0.5 μ M de cada cebador forward y reverse, 1 μ l de dNTPs de 10 mM, 1 μ l de ADN extraído previamente diluido a 1/10, 0.02 U/ μ l de Phusion High Fidelity (Thermo Fisher Scientific) y 10 μ l de 5X Phusion High Fidelity (Thermo Fisher Scientific), para obtener un volumen final de 50 μ l. Se siguieron las siguientes condiciones: 30 seg de denaturación inicial a 98°C, 35 ciclos de 10 seg denaturación a 98°C, 30 seg a 65-67°C de hibridación y 30 seg a 72°C de extensión, y 10 min de extensión final a 72°C. Los tamaños esperados de las uniones laterales amplificadas de cada cepa recombinante (Tabla 3), se verificó en un gel de agarosa al 1%.

V.5.1.5.2 Verificación por secuenciamiento

Las uniones laterales derecha e izquierda de las cepas recombinantes H37Rv KO-Rv0944 y H37Rv KO-Rv2102 se mandaron a secuenciar en la empresa Psomagen. Para este propósito, se emplearon los cebadores forward y reverse #3 y #5 para la unión lateral izquierda, y #4 y #6 para la unión lateral derecha. Ambas hebras del DNA fueron secuenciadas.

Para el análisis del secuenciamiento se procedió a identificar las siguientes regiones:

- Unión lateral izquierda: upstream cromosoma, oligonucleótido izquierda, región attL, plásmido pKM 464.
- Unión lateral derecha: plásmido pKM464, región attR, oligonucleótido derecha, downstream cromosoma.

5'CGCCTGGAAACGCACCAACTTTCTGTGACCGCGAC
GCTCGGCCTCGCTGACGCCGGCCACCGCATTGTCAT
CGTCGGCAGGGGTGCTGGTGGCCGGGACGCCGCA
GCCGCGCGCGCTCGGTTTGTCTGGTCAACCACCGC
GGTCTCCGTCGTCAGGATCATCTCGAGTCTAGAGC
ATGCACTAGTGCGGCCGCTAGCGGTACCAGATCTG
GGCCCTTAAGTCGCGTTGCGCTCGGTCGTTCCGGCT
GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAA
TACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGA

**AAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAG
GAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAAT
CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGG
3'**

Esquema 2: Unión lateral izquierda H37Rv KO-Rv0944 (Top chromosome). En el esquema se muestra la unión lateral izquierda de la hebra superior del DNA de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv0944. La región subrayada corresponde a la ubicación del primer forward. El color negro corresponde la región upstream del cromosoma. El color azul corresponde al segmento izquierdo del oligonucleótido integrado. El color rojo corresponde a la secuencia attL. El color amarillo corresponde parte del segmento ORI del plásmido pKM464 integrado.

**5'CCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTC
GATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTA
TGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTT
CCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT
TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTAT
TACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCA
GCCGAACGACCGAGCGCAACGCGACTTAAGGGCCC
AGATCTGGTACCGCTAGCGGCCGCACTAGTGCATG
CTCTAGACTCGAGATGATCCTGACGACGGAGACCG
CGGTGGTTGACCAGACAAACCAGCGCGCGCGGCT**

GCGGCGTCCCGGCCACCAGCACCCCTGCCGACGAT
GACAATGCGGTGGCCGGCGTCAGCGAGGCCGAGCG
TCGCGGTACAGAAAGTTGGTGCGTTTCCAGGCG 3'

Esquema 3: Unión lateral izquierda H37Rv KO-Rv0944 (Bottom chromosome). En el esquema se muestra la unión lateral izquierda de la hebra inferior del DNA de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv0944. La región subrayada corresponde a la ubicación del primer reverse. El color amarillo corresponde parte del segmento ORI del plásmido pKM464 integrado. El color rojo corresponde a la secuencia attL. El color azul corresponde al segmento izquierdo del oligonucleótido integrado. El color negro corresponde la región upstream del cromosoma.

5'GACCAACATCTTCGTGGACCTGGCCGCGACCGAG
GTCACCGGGATCGTCGACTTCACCGACGTCTATGC
GGGAGACTCCCGCTACAGCCTGGTGCAACTGCATC
TCAACGCCTTCCGGGGCGACCGCGAGATCCTGGCC
GCGCTGCTCGACGGGGCGCAGTGGAAGCGGACCG
AGGACTTCGCCCGCGAACTGCTCGCCTTCACCTTCC
TGCACGACTTCGAGGTGTTTCGAGGAGACCCCGCTG
GATCTCTCCGGCTTCACCGATCCGGAGGAACTGGC
GCAGTTCCTCTGGGGGCCCGGACACCGCCCCCG
GCGCCTGACGCCCCCTCTAGCTGATCACCGCGGCC
ATGATGGCATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGAC
TGAGCCTTTCGTTTTATTGATGCCTGGCAGTCGAT

CGTACGCTAGTTAACTACGTCGACATCGATAAGCTT
GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCAGTGGTGTACGG
TACAAACCGACCGGCGTATGTCGCGGGCTGCTCAAG
TAGTCGATATGCTCACC GGAGTGACTCGCCAGAAG
ATCCTGATCACCGGCGCCAGTTCCGGCCTGGGGCGCCG
GGATGGCCCGATCCTTCGCC 3'

Esquema 4: Unión lateral derecha H37Rv KO-Rv0944 (Top chromosome). En el esquema se muestra la unión lateral derecha de la hebra superior del DNA de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv0944. La región subrayada corresponde a la ubicación del primer forward. El color amarillo corresponde parte del cassette *hygR* del plásmido pKM464 integrado. El color rojo corresponde a la secuencia *attR*. El color azul corresponde al segmento derecho del oligonucleótido integrado. El color negro corresponde la región downstream del cromosoma.

5'**GGCGAAGGATCGGGCCAT**CCCGGCGCCCAGGCCGG
AACTGGCGCCGGTGATCAGGATCTTCTGGCGAGTCA
CTCCGGTGAGCATATCGACTACTTGAGCAGCCGCG
ACATACGCCGGT**CGGTTTGTACCGTACACCACTGA**
GACCGCCGTCGTCGACAAGCCAAGCTTATCGATGT
CGACGTAGTTAACTAGCGTACGATCGACTGCCAGG
CATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTG
GGCCTTTCGTTTTATGCCATCATGGCCGCGGTGATC
AGCTAGAGGGGGCGTCAGGCGCCGGGGGCGGTGT

**CCGGCGGCCCCCAGAGGAACTGCGCCAGTTCCTCC
 GGATCGGTGAAGCCGGAGAGATCCAGCGGGGTCTC
 CTCGAACACCTCGAAGTCGTGCAGGAAGGTGAAGG
 CGAGCAGTTCGCGGGCGAAGTCCTCGGTCCGCTTC
 CACTGCGCCCCGTCGAGCAGCGCGGCCAGGATCTC
 GCGGTGCGCCCCGGAAGGCGTTGAGATGCAGTTGCA
 CCAGGCTGTAGCGGGAGTCTCCCGCATAGACGTCG
 GTGAAGTCGACGATCCCGGTGACCTCGGTGCGGGC
 CAGGTCCACGAAGATGTTGGTC 3'**

Esquema 5: Unión lateral derecha H37Rv KO-Rv0944 (Bottom chromosome). En el esquema se muestra la unión lateral derecha de la hebra inferior del DNA de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv0944. La región subrayada corresponde a la ubicación del primer reverse. El color negro corresponde la región downstream del cromosoma. El color azul corresponde al segmento derecho del oligonucleótido integrado. El color rojo corresponde a la secuencia attR. El color amarillo corresponde parte del cassette hygR del plásmido pKM464 integrado.

**5' GACTTGGTGGTCACCGACGGCGAAGGCTGGCTGA
 CCGAACTGTCCACCCGCGATCTGCGCGAGGTGTTTCG
 CGCTGTCCGAAGGCGCCGTCGGTGAGTAGCACCTG
 GTATCCACCACCGTCCGGTTTGTCTGGTCAACCACC
 GCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCTCGAGTCTAGA**

GCATGCACTAGTGCGGCCGCTAGCGGTACCAGATC
TGGGCCCTTAAGTCGCGTTGCGCTCGGTCGTTTCGG
CTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGT
AATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAG
GAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCC
AGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT
CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAA
ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACA
GG 3'

Esquema 6: Unión lateral izquierda H37Rv KO-Rv2102 (Top chromosome). En el esquema se muestra la unión lateral izquierda de la hebra superior del DNA de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv2102. La región subrayada corresponde a la ubicación del primer forward. El color negro corresponde a la región upstream del cromosoma. El color azul corresponde al segmento izquierdo del oligonucleótido integrado. El color rojo corresponde a la secuencia attL. El color amarillo corresponde a parte del segmento ORI del plásmido pKM464 integrado.

5'CCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTC
GATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTA
TGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTT
CCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT
TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTAT
TACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCA

GCCGAACGACCGAGCGCAACGCGACTTAAGGGCCC
AGATCTGGTACCGCTAGCGGCCGCACTAGTGCATG
CTCTAGACTCGAGATGATCCTGACGACGGAGACCG
CGGTGGTTGACCAGACAAACC**GGACGGTGGTGGAT**
ACCAGGTGCTACTCACCGACGGCGCCTTCGGACAG
CGCGAACACCTCGCGCAGATCGCGGGTGGACAGTTC
GGTCAGCCAGCCTTCGCCGTCGGTGACCACCAAGTC 3'

Esquema 7: Unión lateral izquierda H37Rv KO-Rv2102 (Bottom chromosome). En el esquema se muestra la unión lateral izquierda de la hebra inferior del DNA de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv2102. La región subrayada corresponde a la ubicación del primer reverse. El color amarillo corresponde parte del segmento ORI del plásmido pKM464 integrado. El color rojo corresponde a la secuencia attL. El color azul corresponde al segmento izquierdo del oligonucleótido integrado. El color negro corresponde la región upstream del cromosoma.

5'GACCAACATCTTCGTGGACCTGGCCGCGACCGAG
GTCACCGGGATCGTCGACTTCACCGACGTCTATGC
GGGAGACTCCCGCTACAGCCTGGTGCAACTGCATC
TCAACGCCTTCGGGGCGACCGCGAGATCCTGGCC
GCGCTGCTCGACGGGGCGCAGTGGAAGCGGACCG
AGGACTTCGCCC**GCGAACTGCTCGCCTTCACCTTCC**
TGCACGACTTCGAGGTGTTTCGAGGAGACCCCGCTG

GATCTCTCCGGCTTCACCGATCCGGAGGAACTGGC
 GCAGTTCCTCTGGGGGCGCCGGACACCGCCCCG
 GCGCCTGACGCCCCCTCTAGCTGATCACCGCGGCC
 ATGATGGCATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGAC
 TGAGCCTTTCGTTTTATTGATGCCTGGCAGTCGAT
 CGTACGCTAGTTAACTACGTCGACATCGATAAGCTT
GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCAGTGGTGTACGG
TACAAACCACGCACCATCACAAACAGCGCGGGCGGC
TGATCCCAGCGCACCCCTTCGAATCGGCCGAAGTC
ACTGTCGTAGGACACGATGCTGGCGCGATGCTCGACG
 GCAAGCGCGGCCAGATGCGCGTCGTTGACCAGGTTGG
 CACCGGTTCCCA 3'

Esquema 8: Unión lateral derecha H37Rv KO-Rv2102 (Top chromosome). En el esquema se muestra la unión lateral derecha de la hebra superior del DNA de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv2102. La región subrayada corresponde a la ubicación del primer forward. El color amarillo corresponde parte del cassette *hygR* del plásmido pKM464 integrado. El color rojo corresponde a la secuencia *attR*. El color azul corresponde al segmento derecho del oligonucleótido integrado. El color negro corresponde la región downstream del cromosoma.

5'TGGGAACCGGTGCCAACCTGGTCAACGACGCGCATC
 TGGCCGCGCTTGCCGTCGAGCATCGCGCCAGCATCGTG
 TCCT**ACGACAGTGA**CTTCGGCCGATT**CGAAGGGGT**

GCGCTGGGATCAGCCGCCCGCGCTGTTGTGATGGT
GCGTGGTTTGTACCGTACACCACTGAGACCGCGT
CGTCGACAAGCCAAGCTTATCGATGTCGACGTAGT
TAACTAGCGTACGATCGACTGCCAGGCATCAAATA
AAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCG
TTTTATGCCATCATGGCCGCGGTGATCAGCTAGAG
GGGGCGTCAGGCGCCGGGGGCGGTGTCCGGCGGC
CCCCAGAGGAACTGCGCCAGTTCCTCCGGATCGGT
GAAGCCGGAGAGATCCAGCGGGGTCTCCTCGAACA
CCTCGAAGTCGTGCAGGAAGGTGAAGGCGAGCAGT
TCGCGGGCGAAGTCCTCGGTCCGCTTCCACTGCGC
CCCGTCGAGCAGCGCGGCCAGGATCTCGCGGTTCGC
CCCGGAAGGCGTTGAGATGCAGTTGCACCAGGCTG
TAGCGGGAGTCTCCCGCATAGACGTCGGTGAAGTC
GACGATCCCGGTGACCTCGGTTCGCGGCCAGGTCCA
CGAAGATGTTGGTC 3'

Esquema 9: Unión lateral derecha H37Rv KO-Rv2102 (Bottom chromosome). En el esquema se muestra la unión lateral derecha de la hebra inferior del DNA de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv2102. La región subrayada corresponde a la ubicación del primer reverse. El color negro corresponde la región downstream del cromosoma. El color azul corresponde al segmento derecho del oligonucleótido integrado. El color rojo corresponde a la secuencia attR. El color amarillo corresponde parte del cassette hygR del plásmido pKM464 integrado.

V.5.2. Ensayo fenotípico de crecimiento.

A partir de una placa de cultivo sólido de 3 semanas de cada una de las cepas recombinantes (H37Rv-KO-Rv0944 y H37Rv-KO-Rv2102), se preparó una suspensión bacteriana y se llevó a un estándar de McFarland 2 con medio 7H9-OADC (consultar detalles en Anexos). Luego, se sembraron 50 μ l de la suspensión bacteriana en placas de agar 7H10-OADC y se incubaron a 37°C durante un período de 20 días. Para fines de control de crecimiento, se incluyeron las cepas H37Rv (wild type) y H37Rv KO-*pncA*. Por otro lado, se colocó 30 ml del cultivo bacteriano en un matraz de 250 ml y se midió el OD inicial. Se incubó durante 14 días a 37°C y cada dos días se midió la densidad óptica a 600nm.

V.5.3. Tasa de eflujo de POA

V.5.3.1. Elaboración y validación de la curva estándar de POA

A partir de una placa de cultivo sólido de 3 semanas de la cepa H37Rv, se preparó una suspensión bacteriana llevándola a un estándar de McFarland de 2, luego se incubó a 37°C durante 4 días. El sobrenadante se extrajo por centrifugación a 3000 \times g por 10 min a 17°C, y se esterilizó usando un filtro de jeringa estéril 0.22 μ m. El sobrenadante estéril de H37Rv fue utilizado para preparar soluciones estándares con concentraciones conocidas de ácido pirazinoico (1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8mM, 10 mM, 12 mM, 14 mM, 16 mM, 18 mM, 20 mM).

Posteriormente, se realizó la reacción de Wayne a cada una de las soluciones estándares para conocer su densidad óptica correspondiente a 450 nm. Para la reacción de Wayne se añadió 300 µl de solución estándar en un tubo de 1.5ml de microcentrífuga, se agregó 30 sulfato de amonio ferroso al 20%, se agitó y centrifugó dos veces a 10000 g x 5 min. Luego se transfirió 100 µl a una placa de 96 pocillos por triplicado y se procedió a leer en un espectrofotómetro (Spectra mMax 190) a 450 nm. Las lecturas obtenidas fueron promediadas y ajustadas para la elaboración de la curva estándar. Para ajustar las lecturas de los estándares, se tomaron 10 lecturas de blanco, el cual estuvo conformado solo por el sobrenadante estéril de H37Rv más sulfato de amonio ferroso al 10%. A partir del promedio de las lecturas de los blancos, se calcularon el límite inferior de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de la curva estándar. Para validar la curva estándar, se evaluó la reproducibilidad de los valores obtenidos, tomando en cuenta tres concentraciones conocidas de la curva estándar (1 mM, 10 mM y 20 mM). Para cada uno, se tomaron diez mediciones y se calculó el % de recuperación ($\text{mM POA teórico/mM POA experimental} * 100$) y el coeficiente de variación. Finalmente, se calculó el coeficiente de determinación (R^2) para evaluar la linealidad de la curva estándar.

V.5.3.2. Preparación de cultivos para la cuantificación de POA

A partir de una placa de cultivo sólido de 3 semanas, se preparó una suspensión bacteriana llevándola a un estándar de McFarland de 2,

equivalente aproximadamente a un OD de 0.5. Luego se alicotó 1.8 ml de la suspensión bacteriana en 6 pocillos de una placa de cultivo celular Corning™ de 24 pocillos con tapa. La suspensión bacteriana se cultivó a 37°C por 4 días. Luego se procedió a inocular 200 µl de la droga pirazinamida para que la concentración final sea 800 µg/ml en cada pocillo, e inmediatamente se procedió a procesar el sobrenadante y medir el OD 600 nm del primer pocillo, cultivo control de inoculación (día 0). La placa con el cultivo celular restante se mantuvo a 37°C, y cada dos días se procesaba el sobrenadante y medía el OD. Los días evaluados después de la introducción de la droga fueron: 2, 4, 6, 8, 10. Los cuales correspondían al tiempo de incubación del cultivo bacteriano con la droga pirazinamida.

Para obtener el sobrenadante, cada cultivo bacteriano se centrifugó en tubos de 2 ml con tapa rosca a 10,000×g por 10 min, el sobrenadante se trasladó a otro tubo de 2 ml y se inactivó a 95°C por 30 min en un thermoblock. Los sobrenadantes inactivos se guardaron a -20°C hasta su posterior uso en la reacción de Wayne. Este procedimiento se repitió 4 veces por cada cepa recombinante (H37Rv-KO-Rv0944 y H37Rv-KO-Rv2102) y se tuvo como controles a la cepa salvaje H37Rv y la cepas H37Rv-KO-*pncA* y DM 97.

V.5.3.3. Cuantificación de la tasa de eflujo de POA

Para determinar la concentración de ácido pirazinoico (POA) en los sobrenadantes inactivados, se descongelaron dichas muestras a temperatura ambiente y se tomaron 300 µl de cada una, las cuales se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. A continuación, se añadieron 30 µl de una solución de sulfato de amonio ferroso al 20% a cada tubo, seguido de dos rondas de centrifugación a 10,000×g durante 5 min cada una. Posteriormente, se tomó 100 µl de la mezcla resultante y se dispusieron en triplicado en una placa de 96 pocillos. Finalmente, se procedió a medir la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 450 nm utilizando un espectrofotómetro (Spectra mMax 190). Las lecturas por triplicados obtenidos se promediaron y se ajustaron con la lectura del día 0. Luego, se calculó la concentración de POA (mM) presente en cada sobrenadante, correspondiente a diferentes días de incubación con la droga PZA, usando la curva estándar. La concentración de POA obtenida en cada día de incubación por cepa, fue normalizada en función al crecimiento bacteriano (OD 600 nm).

V.5.4. Ensayo de susceptibilidad a PZA en *M. tuberculosis* mediante el ensayo de TEMA

A partir de una placa de cultivo sólido de 3 semanas, se preparó una suspensión bacteriana llevándola a un estándar de McFarland de 1

(consultar detalles en Anexos). Posteriormente, se realizó una dilución en 1/25 con medio 7H9. La distribución de la placa de TEMA empleado para el ensayo se muestra en la figura 12.

Por cada cepa, se trabajó tres ensayos de susceptibilidad con 3 drogas (PZA, POA e INH) a dos diferentes pH (6.8 y 6.2). La concentración de droga probada en la primera y segunda columna de la placa fue de 2 X, siendo X para PZA 1600 µg/ml, POA 1600 µg/ml e INH 32 µg/ml. A partir de la tercera columna, la concentración de la droga iba disminuyendo en ½. La primera columna se utilizó como control de droga (sin cepa), y las últimas 3 columnas (10-12) fueron utilizadas como control de cepa (sin droga).

La placa TEMA que contenía el cultivo bacteriano se incubó a 37°C. En el quinto y décimo día, se añadieron 50 µl de una solución de sal de tetrazolium (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a los tres primeros pozos de control (B 10-12 y E10-12) de las cepas a pH 6.8 y pH 6.2, respectivamente. Luego, se dejó incubar por 24 horas a 37°C hasta observar un cambio de color de amarillo a violeta. En caso de no observar este cambio de color en los pozos de control de cepa, se volvía agregar la solución de sal de tetrazolio a la siguiente fila (C10-12 y F10-12), y así sucesivamente hasta observar un cambio del viraje de color. Una vez que se observó el cambio de color, al día siguiente se llevó a cabo la

revelación de toda la sección de la placa a ese pH con la solución de sal de tetrazolium.

La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de la droga para cada cepa se determinó en función de la concentración más baja de la droga en la que no se observó crecimiento bacteriano y, por lo tanto, no se manifestó un cambio de color significativo. Para confirmar el MIC observado en la placa TEMA, se verificó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano en todos los pozos utilizando un microscopio invertido.

Este ensayo de susceptibilidad por TEMA se realizaron por triplicado a cada una de las cepas recombinantes (H37Rv-KO-Rv0944 y H37Rv-KO-Rv2102), y a las cepas H37Rv y H37Rv-KO-*pncA*. Estas últimas fueron utilizadas como control de susceptibilidad a PZA.

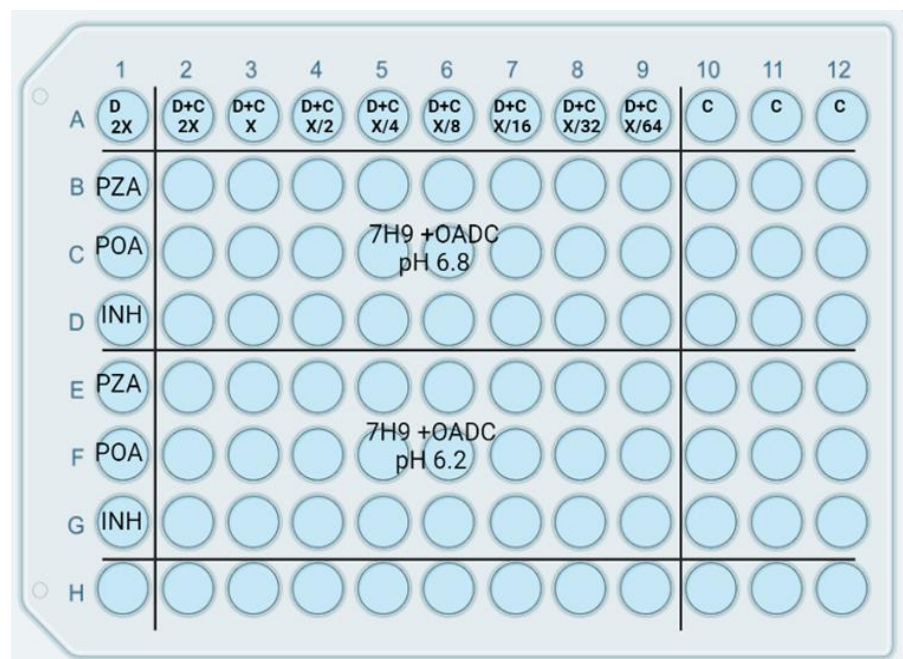


Figura 12: Distribución de la placa TEMA para determinar la susceptibilidad a PZA. La droga POA se utilizó como un control de susceptibilidad a PZA independiente de la actividad enzimática. La droga INH se utilizó como un control de susceptibilidad de las cepas evaluadas. La susceptibilidad de cada droga se evaluó a dos pH diferentes (6.8 y 6.2). La columna 1 representa el control de droga (sin cepa), mientras que, las columnas 10-12 representan los controles de cepa (sin droga). Las columnas 2-9 contienen 100 µl de cepa + 100 µl de droga de mayor a menor concentración respectivamente. La concentración de droga probada fue la siguiente: 2X PZA= 1600 µg/ml, 2X POA= 1600 µg/ml, 2X INH= 32 µg/ml.

V.5.5. Análisis estadísticos

La curva estándar y la tasa de flujo de POA de cada grupo de bacterias, se evaluaron mediante un modelo de regresión lineal, donde se calculó el coeficiente de determinación (R^2) y la significancia de la pendiente. El cambio de la tasa de crecimiento bacteriano y la tasa de eflujo de POA entre las cepas recombinantes vs cepa wild type en los tiempos evaluados, se determinó mediante un modelo de regresión lineal múltiple con un intervalo de confianza al 95% utilizando el software estadístico Stata versión 17.

VI. RESULTADOS

VI.1 Remoción de los genes candidatos a metalochaperonas de PZAsa mediante la técnica de ORBIT en *M. tuberculosis*

VI.1.1. Diseño del oligonucleótido guía

Las secuencias de los oligonucleótidos guías se diseñaron como reversos complementarios de la hebra parental que se replica de forma rezagada.

En lo que respecta al gen Rv2102, su dirección de transcripción se orienta hacia el OriM, lo que llevó a la elección de la secuencia precursora del oligonucleótido guía como el oligonucleótido guía del gen Rv2102. En contraste, en el caso del gen Rv0944, la dirección de transcripción se dirige en sentido opuesto al OriM, por lo que se optó por el reverso complementario de la secuencia precursora del oligonucleótido guía como el oligonucleótido para el gen Rv0944 (Figura 13, 14, 15). Los oligonucleótidos guías para cada gen están conformados por 188 bases. Las secuencias marcadas de color azul, corresponden a los diez primeros y últimos codones de cada gen. Las secuencias marcadas de color rojo, corresponden a la secuencia attP, siendo el *core* la secuencia subrayada.

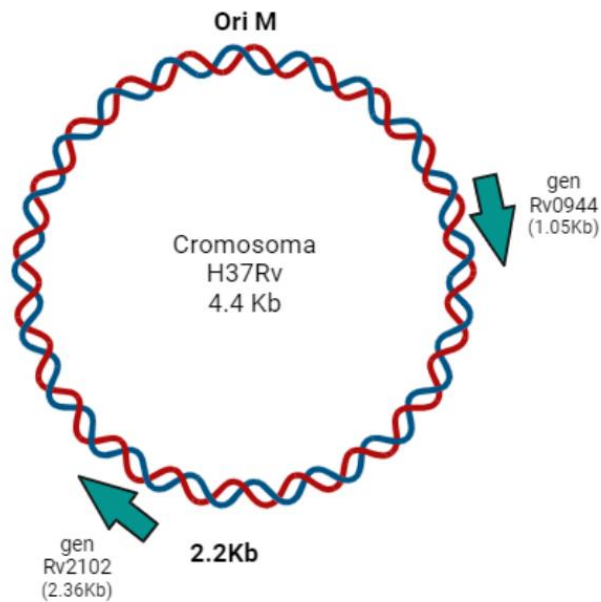


Figura 13: Dirección de transcripción de los genes Rv0944 y Rv2102.

El gen Rv0944 se aleja del Origen de replicación (Ori M). El gen Rv2102, se acerca al origen de replicación.

```

5'ATCAGGATCTTCTGGCGAGTCACTCCGGTGAGCATATCGACTACTTGAGC
AGCCGCGACATACGCCGGTCGGTTTGTACCGTACACCACTGAGACCCGGG
TGGTTGACCAGACAAACCGAGCGCGCGGGCTGCGGCGTCCC GGCCACCA
GCACCCCTGCCGACGATGACAATGCGGTGGCCGGCGTC 3'

```

Figura 14: Oligonucleótido guía para eliminar el gen Rv0944 en H37Rv *M. tuberculosis*.

```
5'GATCTGCGCGAGGTGTTTCGCGCTGTCCGAAGGCGCCGTCGGTGAGTAGCA  
CCTGGTATCCACCACCGTCCGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTG  
GTGTACGGTACAAACCACGCACCATCACAACAGCGCGGGCGGCTGATCCCCA  
GCGCACCCCTTCGAATCGGCCGAAGTCACTGTCGT 3'
```

Figura 15: Oligonucleótido guía para eliminar el gen Rv02102 en H37Rv *M. tuberculosis*.

VI.1.2. Electroporación del vector pKM461

Tras un periodo de incubación de 3 semanas a 37°C, se obtuvo cepas aisladas de H37Rv electroportadas con el plásmido pKM461 (kanR) en placas de 7H10 con kanamicina (Figura 16A). Por otro lado, los controles de electroporación (control de agua y control de cepa) como se esperaba, no crecieron en las placas de 7H10 con kanamicina (Figura 16C y 16E); y crecieron únicamente en las placas de 7H10 (Figura 16D y 16F). Estos controles nos sirvieron para garantizar que las cepas aisladas en las placas con antibiótico corresponden únicamente a cepas de H37Rv que incorporaron el plásmido pKM461, y no corresponde a una posible contaminación durante el proceso de electroporación o contaminación en el agua PCR que se usó a diluir los plásmidos.

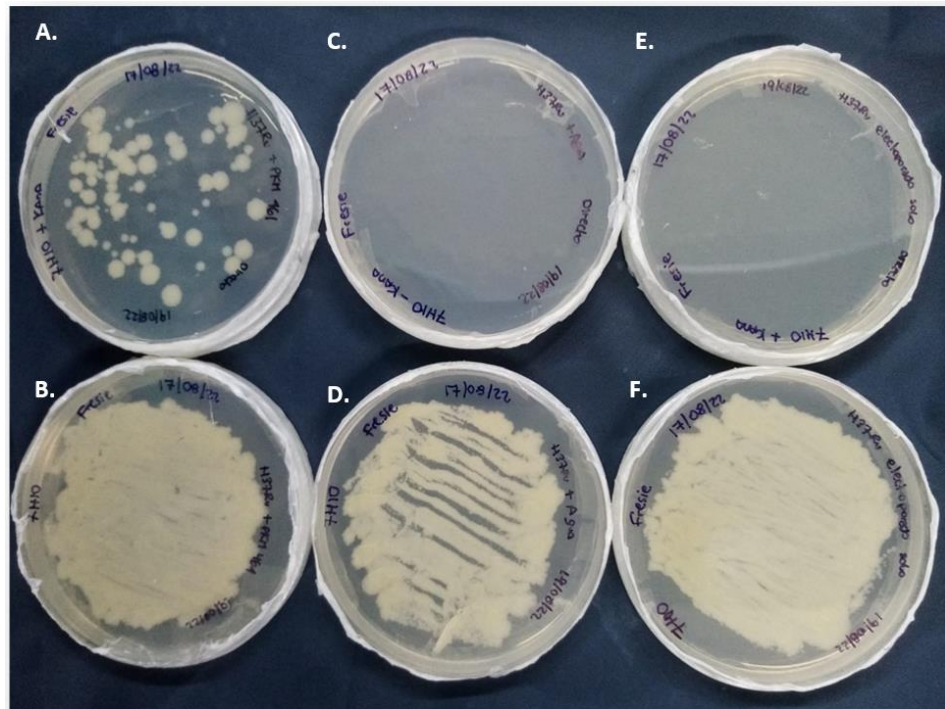


Figura 16: Electroporación del plásmido pKM 461 en H37Rv. A. H37Rv electroporado con pKM461 sembrado en 7H10 +kan. B. H37Rv electroporado con pKM 461 sembrado en 7H10. C. H37Rv electroporado con agua PCR sembrado en 7H10 + kan (control de agua). D. H37Rv electroporado con agua PCR sembrado en 7H10 (control de agua). E. H37Rv electroporado sembrado en 7H10 + kan (control de cepa). F. H37Rv electroporado sembrado en 7H10 (control de cepa).

VI.1.3. Electroporación del vector pKM464 y oligonucleótido guía

Después de la electroporación con el plásmido pKM 464 (hygR) y el oligonucleótido guía se obtuvo crecimiento de las cepas de H37Rv (kanR).

Estas cepas se cultivaron en placas de agar 7H10 conteniendo kanamicina e higromicina (Figura 17 y 18).

Asimismo, los controles de electroporación, que incluyeron controles de oligo, agua y cepa, como era de esperar, no mostraron crecimiento en las placas de agar 7H10 con kanamicina e higromicina (Figura 19B, D y F). Estos únicamente crecieron en las placas de 7H10 con kanamicina (Figura 19A, C y E). Por lo tanto, no se detectó evidencia de posible contaminación durante el proceso de electroporación y se confirmó la importancia del oligonucleótido para obtener cepas recombinantes resistentes a higromicina.

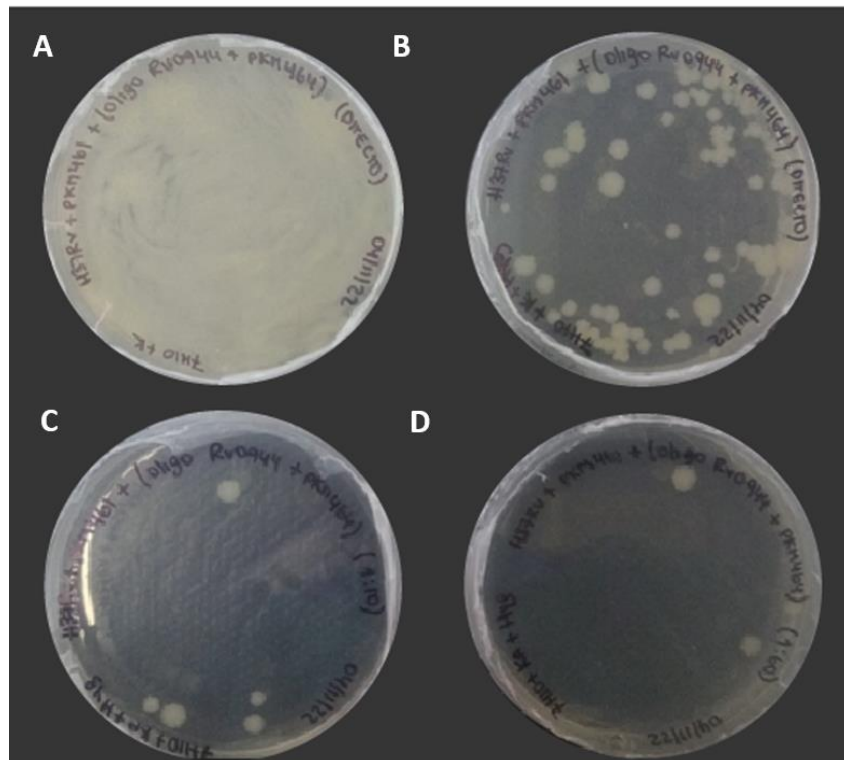


Figura 17: Electroporación del plásmido pKM464 + oligo Rv0944 en H37Rv (kanR). A. H37Rv (kanR) electroporado con pKM464 + oligo Rv0944 sembrados en placas 7H10 + kan. B, C y D. H37Rv (kanR) electroporado con pKM464 + oligo Rv0944 sembrados en placas 7H10 + kan + hyg (directo, 1/10 dil y 1/60 dil respectivamente).

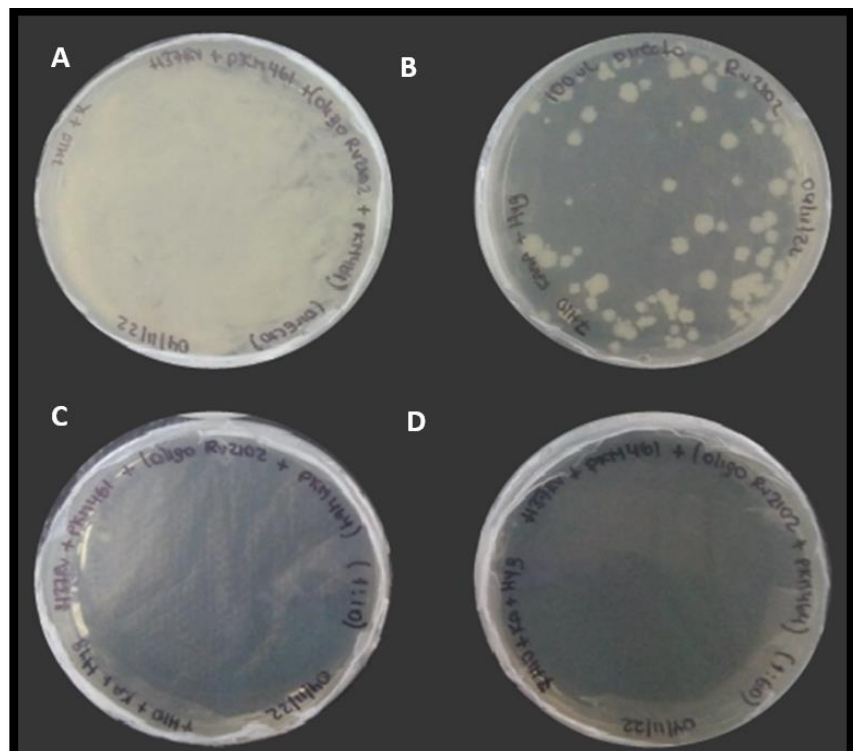


Figura 18: Electroporación del plásmido pKM464 + oligo Rv2102 en H37Rv (kanR). A. H37Rv (kanR) electroporado con pKM464 + oligo Rv2102 sembrados en placas 7H10 + kan. B, C y D. H37Rv (kanR) electroporado con pKM464 + oligo Rv2102 sembrados en placas 7H10 + kan + hyg (directo, 1/10 dil y 1/60 dil respectivamente).

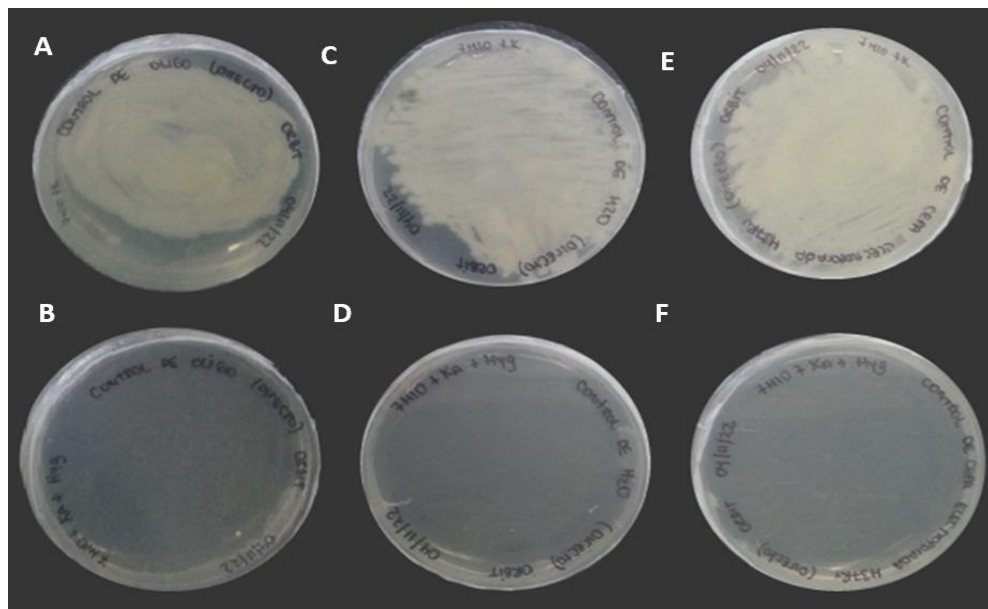


Figura 19: Controles de Electroporación. **A.** H37Rv (kanR) electroporado con pKM464 sembrado en 7H10 + kan. **B.** H37Rv (kanR) electroporado con pKM464 sembrado en 7H10 + kan + hyg (control de oligo). **C.** H37Rv (kanR) electroporado con agua sembrado en 7H10 + kan. **D.** H37Rv (kanR) electroporado con agua sembrado en 7H10 + kan + hyg (control de agua). **E.** H37Rv (kanR) electroporado sembrado en 7H10 + kan. **F.** H37Rv (kanR) electroporado sembrado en 7H10 + kan + hyg (control de cepa).

VI.1.4. Confirmación por PCR de los procesos de recombinación y eliminación de los genes objetivos.

Al realizar la amplificación de las uniones laterales izquierda y derecha utilizando los pares de primers detallados en la tabla 3 para las cepas

recombinantes, se obtuvieron productos de PCR con tamaños aproximados de 455 y 618 pb para H37Rv-KO-Rv0944, y 458 y 647 pb para H37Rv-KO-2102 (Figura 20).



Figura 20. Corrida de electroforesis al 1% de los productos de PCR de las uniones laterales. Carril M: representa el marcador de 1Kb. Carril 1 y 2: La unión lateral izquierda y derecha, respectivamente, de H37Rv-KO-Rv2102. Carril 3 y 4: La unión lateral izquierda y derecha, respectivamente, de H37Rv-KO-Rv0944

VI.1.5. Confirmación por secuenciamiento de los procesos de recombinación y eliminación de los genes objetivos.

El secuenciamiento de la doble hebra de las uniones laterales izquierda y derecha de las cepas recombinantes H37Rv-KO-Rv 0944/ KO-Rv2102, confirmó que en la posición del gen target se encontraba el oligonucleótido guía recombinado para cada gen y el plásmido pKM 464 integrado. En las figuras 21-28 se observan que las uniones laterales izquierda está conformado por la secuencia upstream del cromosoma, el oligonucleótido guía de la izquierda, la región attL, y el plásmido pKM 464; mientras que, las uniones laterales derecha está conformado por el plásmido pKM 464, la región attR, el oligonucleótido guía de la derecha, y parte de la secuencia downstream cromosoma.

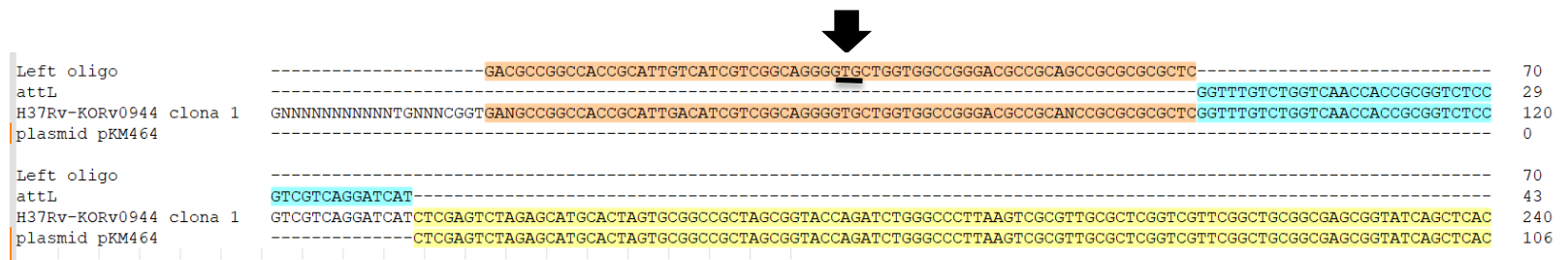


Figura 21: Secuenciamiento de la unión lateral izquierda H37Rv KO-Rv0944 (Top chromosome 5'-3'). En la figura se muestran las secuencias que conforman la unión lateral izquierda de la hebra superior de la cepa recombinante H37Rv KO-

Rv0944 de la clona 1. Naranja: Oligonucleótido guía izquierda (70 bases). Celeste: Secuencia attL (43 bases). Amarillo: plásmido pKM464. Para el secuenciamiento, se utilizó la tecnología de Illumina y el primer forward en la preparación de la muestra. El primer forward híbrida a 88 pb upstream del codón de inicio del gen Rv0944 (señalado en la flecha).

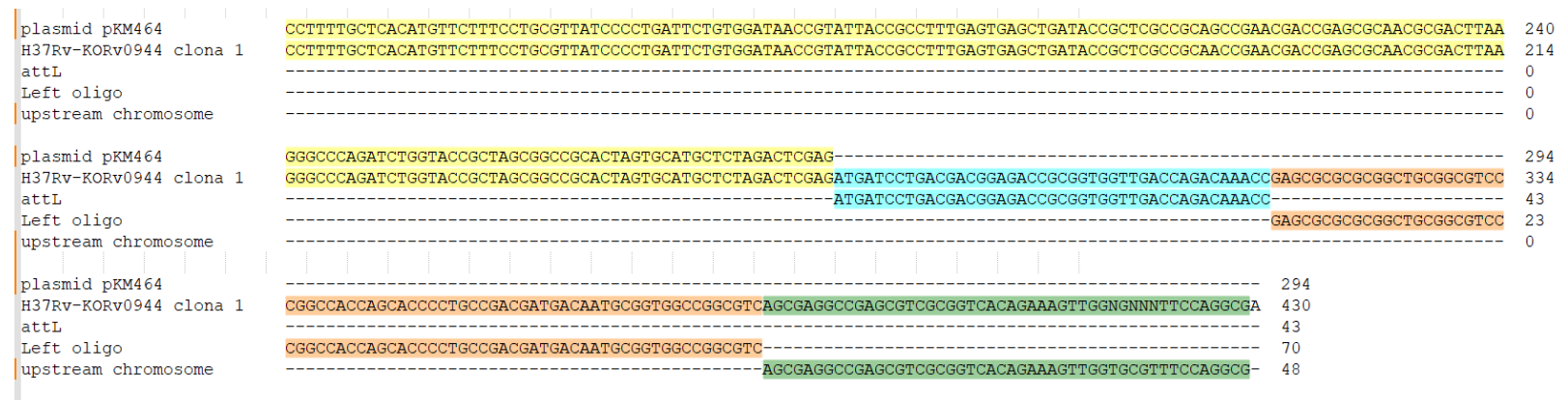


Figura 22: Secuenciamiento de la unión lateral izquierda H37Rv KO-Rv0944 (Bottom chromosome 5'-3'). En la figura se muestran las secuencias que conforman la unión lateral izquierda de la hebra inferior de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv0944 de la clona 1. Amarillo: reverso complementario del plásmido pKM464. Celeste: reverso complementario de la secuencia attL (43 bases). Naranja: reverso complementario del oligonucleótido guía izquierda (70 bases). Verde: reverso

complementario a la región upstream del cromosoma (48 bases). Para el secuenciamiento, se utilizó la tecnología de Illumina y el primer reverse en la preparación de la muestra. El primer reverse híbrida en la región Ori del plásmido pKM 464.

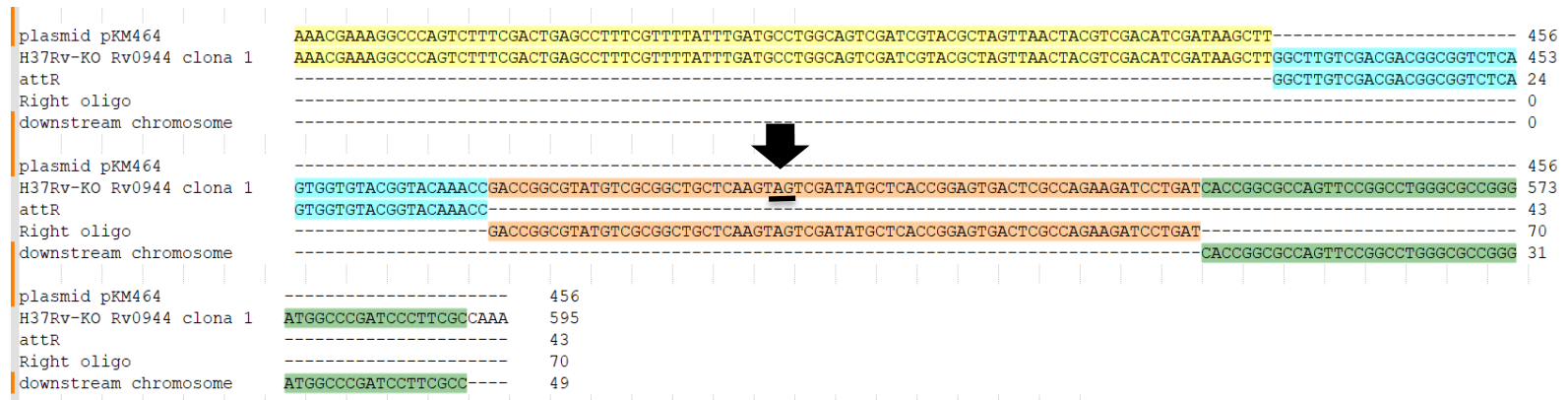


Figura 23: Secuenciamiento de la unión lateral derecha H37Rv KO-Rv0944 (Top chromosome 5'-3'). En la figura se muestran las secuencias que conforman la unión lateral derecha de la hebra superior de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv0944 de la clona 1. Amarillo: plásmido pKM464. Celeste: secuencia attR (43 bases). Naranja: oligonucleótido guía derecha (70 bases). Verde: región downstream del cromosoma (49 bases). El oligonucleótido guía derecha contiene el codón

de stop (señalado en la flecha). Para el secuenciamiento, se utilizó la tecnología de Illumina y el primer forward en la preparación de la muestra. El primer forward híbrida en la región *hygR* del plásmido pKM 464.

```

H37Rv-KO Rv0944 clona 1  GNNNNGNNGGNNNTGGCNCGGTGATCAGGATCTTCTGGCGAGTCACTCCGGTGAGCATATCGACTACTTGAGCAGCCGCGACATACGCCGGTCGGTTTGTACCGTACACCACTGAGACCG 120
Right oligo              -----ATCAGGATCTTCTGGCGAGTCACTCCGGTGAGCATATCGACTACTTGAGCAGCCGCGACATACGCCGGTC----- 70
attR                    -----GGTTTGTACCGTACACCACTGAGACCG----- 27
plasmid pKM464          ----- 0

H37Rv-KO Rv0944 clona 1  CCGTCGTCGACAAGCCAAGCTTATCGATGTCGACGTAGTTAACTAGCGTACGATCGACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATGCCAT 240
Right oligo              ----- 70
attR                    CCGTCGTCGACAAGCC----- 43
plasmid pKM464          -----AAGCTTATCGATGTCGACGTAGTTAACTAGCGTACGATCGACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATGCCAT 104

```

Figura 24: Secuenciamiento de la unión lateral derecha H37Rv KO-Rv0944 (Bottom chromosome 5´-3´). En la figura se muestran las secuencias que conforman la unión lateral derecha de la hebra inferior de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv0944 de la clona 1. Naranja: reverso complementario del oligonucleótido guía derecho (70 bases). Celeste: reverso complementario de la secuencia attR (43 bases). Amarillo: reverso complementario del plásmido pKM464. Para el secuenciamiento, se utilizó la tecnología de Illumina y el primer reverse en la preparación de la muestra. El primer reverse híbrida a 89 bases downstream del reverso complementario del codón de parada del gen Rv0944.

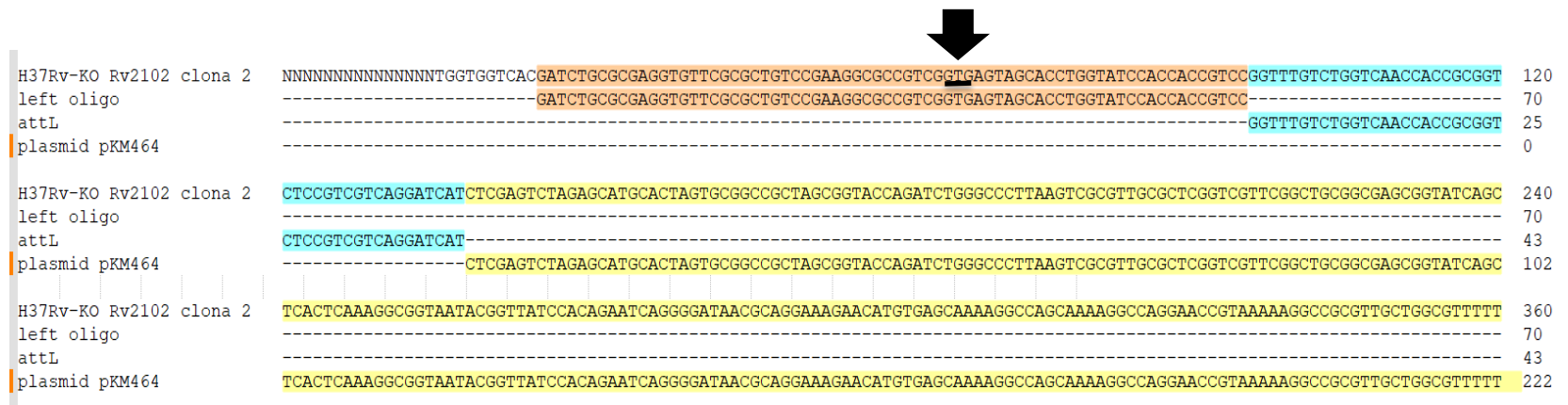


Figura 25: Secuenciamiento de la unión lateral izquierda H37Rv KO-Rv2102 (Top chromosome 5'-3'). En la figura se muestran las secuencias que conforman la unión lateral izquierda de la hebra superior de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv2102 de la clona 2. Naranja: Oligonucleótido guía izquierda (70 bases). Celeste: Secuencia attL (43 bases). Amarillo: plásmido pKM464. Para el secuenciamiento, se utilizó la tecnología de Ilumina y el primer forward en la preparación de la muestra. El primer forward híbrida a 91 pb upstream del codón de inicio del gen Rv2102 (señalado en la flecha).

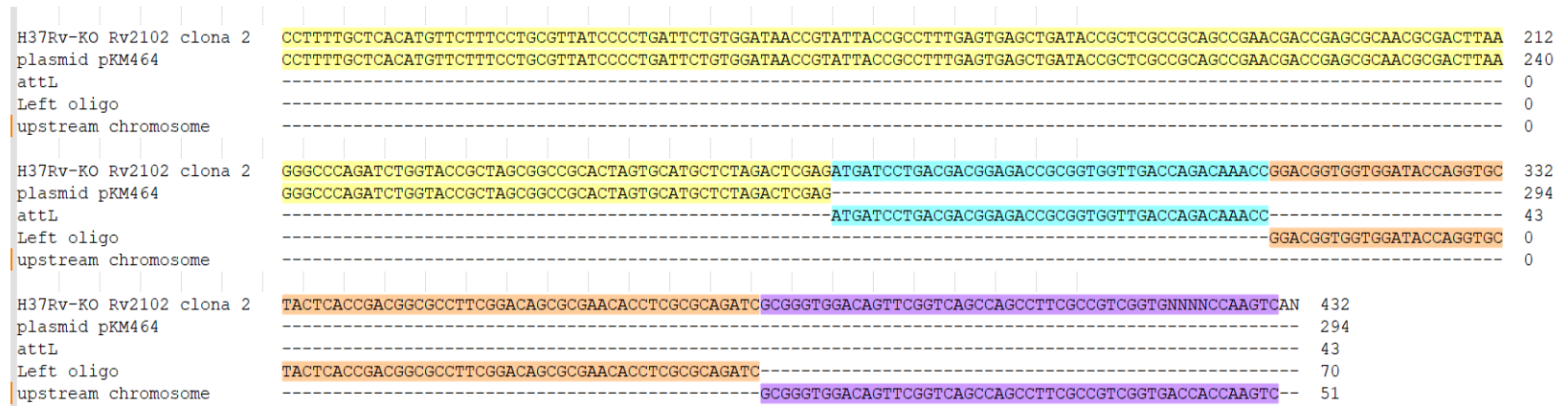


Figura 26: Secuenciación de la unión lateral izquierda H37Rv KO-Rv2102 (Bottom chromosome 5'-3'). En la figura se muestran las secuencias que conforman la unión lateral izquierda de la hebra inferior de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv2102 de la clona 2. Amarillo: reverso complementario del plásmido pKM464. Celeste: reverso complementario de la secuencia attL (43 bases). Naranja: reverso complementario del oligonucleótido guía izquierda (70 bases). Morado: reverso complementario a la región upstream del cromosoma (51 bases). Para el secuenciamiento, se utilizó la tecnología de Illumina y el primer reverse en la preparación de la muestra. El primer reverse híbrida en la región Ori del plásmido pKM 464.

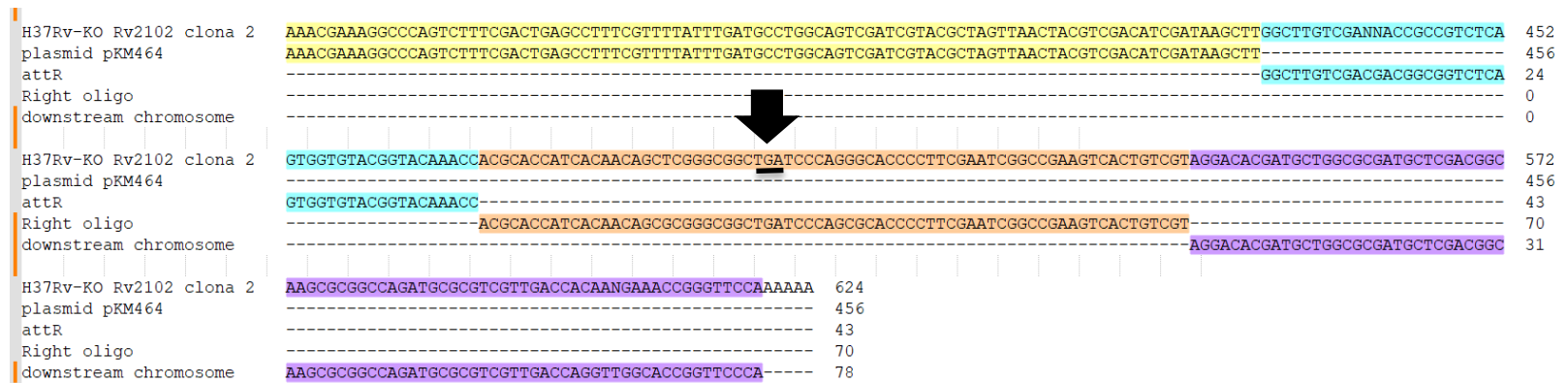


Figura 27: Secuenciamiento de la unión lateral derecha H37Rv KO-Rv2102 (Top chromosome 5'-3'). En la figura se muestran las secuencias que conforman la unión lateral derecha de la hebra superior de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv2102 de la clona 2. Amarillo: Plásmido pKM464. Celeste: Secuencia attR (43 bases). Naranja: oligonucleótido guía derecha (70 bases). Verde: Región downstream del cromosoma (78 bases). El oligonucleótido guía derecha contiene el codón de stop (señalado en la flecha). Para el secuenciamiento, se utilizó la tecnología de Illumina y el primer forward en la preparación de la muestra. El primer forward híbrida en la región hygR del plásmido pKM 464.

H37Rv-KO Rv2102 clona 2	NNNNNNNATNNGNCGCTTGCCGTCNAGCATCGCGCCAGCATCGTGTCCTACGACAGTGACTTCGGCCGATTTCGAAGGGGTGCGCTGGGATCAGCCGCCCGCGCTGTTGTGATGGTGCCT	120
Right oligo	-----ACGACAGTGACTTCGGCCGATTTCGAAGGGGTGCGCTGGGATCAGCCGCCCGCGCTGTTGTGATGGTGCCT	70
attR	-----	0
plasmid pKM464	-----	0
H37Rv-KO Rv2102 clona 2	GGTTTGTACCGTACACCCTGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAAGCTTATCGATGTCGACGTAGTTAACTAGCGTACGATCGACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGA	240
Right oligo	-----	70
attR	GGTTTGTACCGTACACCCTGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCC-----	43
plasmid pKM464	-----AAGCTTATCGATGTCGACGTAGTTAACTAGCGTACGATCGACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGA	77
H37Rv-KO Rv2102 clona 2	AAGACTGGGCCTTTCGTTTTATGCCATCATGGCCGCGGTGATCAGCTAGAGGGGGCGTCAGGCGCCGGGGCGGTGTCCGGCGGCCCCAGAGGAACTGCGCCAGTTCCCTCCGGATCGGT	360
Right oligo	-----	70
attR	-----	43
plasmid pKM464	AAGACTGGGCCTTTCGTTTTATGCCATCATGGCCGCGGTGATCAGCTAGAGGGGGCGTCAGGCGCCGGGGCGGTGTCCGGCGGCCCCAGAGGAACTGCGCCAGTTCCCTCCGGATCGGT	197

Figura 28: Secuenciamiento de la unión lateral derecha H37Rv KO-Rv2102 (Bottom chromosome). En la figura se muestran las secuencias que conforman la unión lateral derecha de la hebra inferior de la cepa recombinante H37Rv KO-Rv2102 de la clona 2. Naranja: Reverso complementario del oligonucleótido guía derecho (70 bases). Celeste: Reverso complementario de la secuencia attR (43 bases). Amarillo: Reverso complementario del plásmido pKM464. Para el secuenciamiento, se utilizó la tecnología de Illumina y el primer reverse en la preparación de la muestra. El primer reverse híbrida a 89 bases downstream del reverso complementario del codón de parada del gen Rv0944.

VI.2 Ensayo Fenotípico de Crecimiento

En la prueba fenotípica cualitativa de crecimiento bacteriano (Figura 29), se observó que la inactivación de los genes candidatos a metalochaperonas de PZAsa en las cepas recombinantes (H37Rv KO-Rv0944/Rv2102) no afecta negativamente el crecimiento bacteriano. Además, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento bacteriano entre las cepas recombinantes KO y la cepa de referencia H37Rv en los diferentes días evaluados, $p > 0.05$. (Figura 30).

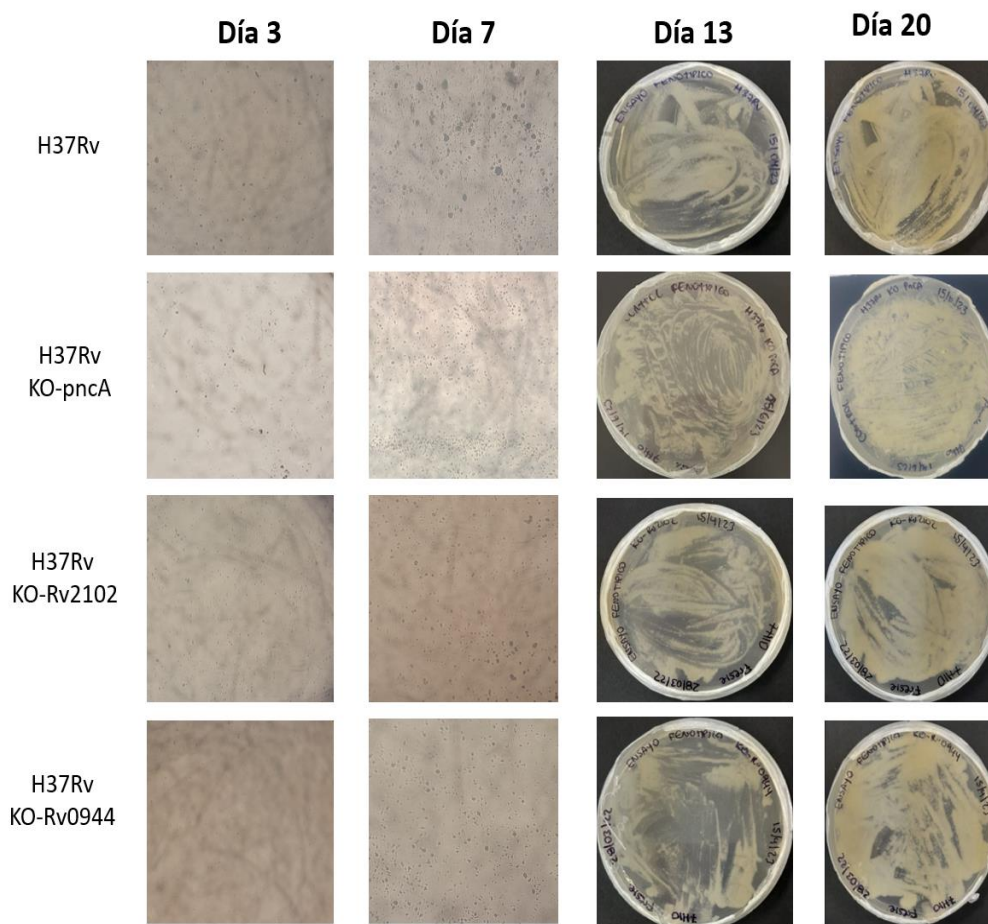


Figura 29: Ensayo fenotípico cualitativo del crecimiento bacteriano de las cepas recombinantes H37Rv KO-Rv0944/Rv2102 y las cepas control H37Rv y H37Rv-KO*pncA* a los 3, 7,13 y 20 días.

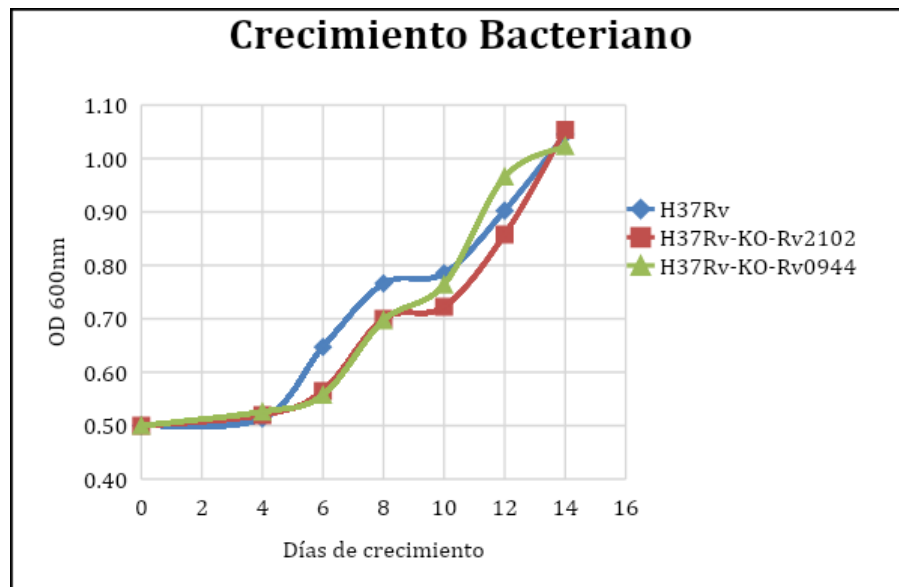
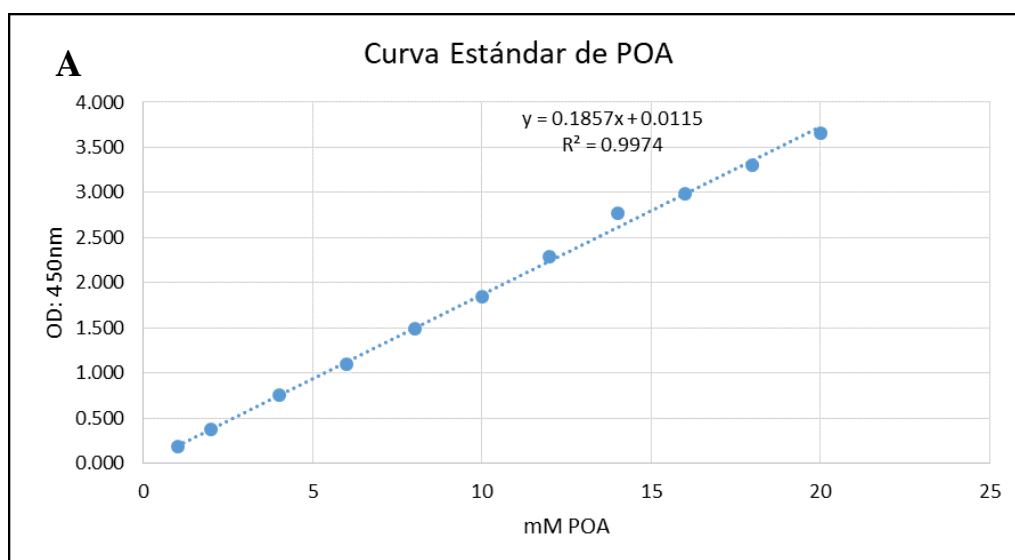


Figura 30: Cuantificación del crecimiento bacteriano (OD 600nm) de las cepas recombinantes H37Rv KO-Rv0944/Rv2102 y las cepa wild type H37Rv a los 4, 6, 8, 10, 12, 14 días. ($p > 0.05$)

VI.3 Tasa de eflujo de POA

VI.3.1. Curva estándar de POA

La curva estándar utilizando diversas concentraciones de ácido pirazinoico (POA) que abarcaban desde 1 hasta 20 mM, mostró una relación lineal significativa entre la concentración de POA y la densidad óptica a 450 nm, R^2 (0.99). Se observó que, por cada incremento de 1 mM en la concentración de POA, la densidad óptica a 450 nm aumentó en 0.1857 unidades ($p < 0.0001$). Además, se determinó que la concentración mínima detectable de POA por el instrumento fue de 0.17 mM, mientras que la concentración mínima cuantificable alcanzó los 0.52 mM. Por otro lado, los estándares de POA utilizados en la validación de la reproducibilidad, con concentraciones de 1 mM, 10 mM y 20 mM, exhibieron coeficientes de variación bajos de 3.17%, 1.36%, y 2.02%, respectivamente, obteniéndose valores de recuperación de 92.9% -103.9%.



B

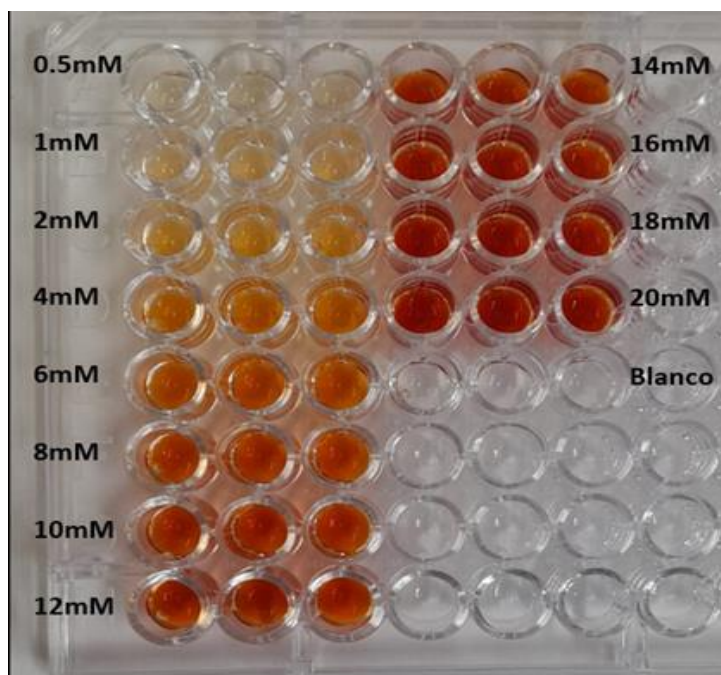


Figura 31: Curva estándar de POA. A. Regresión lineal positiva fuerte entre la concentración de POA (mM) y las unidades de densidad óptica a 450 nm, $R^2=0.99$. $Y=0.1857X + 0.0115$. ($p=0.0001$) B. Wayne Cualitativo de los estándares de POA.

Tabla 4: Validación de blancos, límites de detección y cuantificación de POA

Blanco			
OD1	OD2	OD3	promedio
0.123	0.133	0.138	0.13
0.109	0.106	0.116	0.11
0.109	0.106	0.127	0.11
0.118	0.107	0.127	0.12
0.11	0.109	0.119	0.11
0.108	0.114	0.115	0.11
0.12	0.121	0.138	0.13
0.138	0.111	0.152	0.13
0.123	0.133	0.138	0.13
0.109	0.106	0.116	0.11
Promedio			0.12
Desviación estandar			0.01
Limite inferior de detección			0.17
Limite inferior de cuantificación			0.52

Tabla 5: Validación de Reproducibilidad a 1mM de POA

Validación a 1 mM					
Repetición	promedio OD	promedio OD corregido	mM POA teórico	mM POA experimental	% recuperación
1	0.32	0.201	1	1.02	102.1
2	0.31	0.193	1	0.98	97.6
3	0.32	0.201	1	1.02	102.2
4	0.32	0.202	1	1.03	102.6
5	0.32	0.201	1	1.02	101.9
6	0.32	0.203	1	1.03	103.1
7	0.32	0.200	1	1.01	101.3
8	0.30	0.184	1	0.93	92.9
9	0.32	0.203	1	1.03	103.0
10	0.32	0.197	1	1.00	100.1
Promedio				1.01	
Desviación Estándar				0.03	
Coficiente de Variación				3.17	

Tabla 6: Validación de reproducibilidad a 10 mM de POA

Validación a 10 mM					
Repetición	promedio OD	promedio OD corregido	mM POA teórico	mM POA experimental	% recuperación
1	1.98	1.864	10	9.98	99.8
2	1.99	1.871	10	10.01	100.1
3	2.01	1.890	10	10.12	101.2
4	2.02	1.904	10	10.19	101.9
5	2.01	1.889	10	10.11	101.1
6	2.01	1.887	10	10.10	101.0
7	2.01	1.887	10	10.10	101.0
8	1.96	1.837	10	9.83	98.3
9	1.94	1.823	10	9.76	97.6
10	1.99	1.873	10	10.03	100.3
Promedio				10.02	
Desviación Estándar				0.14	
Coefficiente de Variación				1.36	

Tabla 7: Validación de reproducibilidad a 20 mM de POA

Validación a 20 mM					
Repetición	promedio OD	promedio OD corregido	mM POA teórico	mM POA experimental	% recuperación
1	3.76	3.643	20	19.56	97.8
2	3.77	3.653	20	19.61	98.1
3	3.97	3.850	20	20.67	103.3
4	3.87	3.745	20	20.11	100.5
5	3.83	3.712	20	19.93	99.6
6	3.87	3.745	20	20.11	100.5
7	3.99	3.871	20	20.78	103.9
8	3.83	3.712	20	19.93	99.6
9	3.82	3.698	20	19.85	99.3
10	3.81	3.695	20	19.83	99.2
Promedio				20.04	
Desviación Estándar				0.41	
Coefficiente de Variación				2.02	

VI.3.2. Cuantificación de la tasa de eflujo de POA en *M. tuberculosis*

Al analizar la tasa de eflujo de ácido pirazinoico (POA), se encontró que la cepa wild type H37Rv mostró una tasa de eflujo de 0.6833 mMPOA/OD600 x d-1. En contraste, las cepas recombinantes de *Mtb*, en las cuales se han eliminado individualmente los genes Rv0944 y Rv2102 mediante la técnica ORBIT, exhibieron una reducción significativa en la tasa de eflujo de POA de -0.0675 mM POA/OD600 x d-1 (9.87%) y -0.15 mM POA/OD600 x d-1 (21%), respectivamente, en comparación con la cepa de referencia H37Rv. Sin embargo, esta disminución no fue completa, como se evidencia en la cepa resistente a PZA H37Rv KO-*pncA* y una cepa clínica MDR resistente a PZA (DM 97) (Figura 32 y 33).

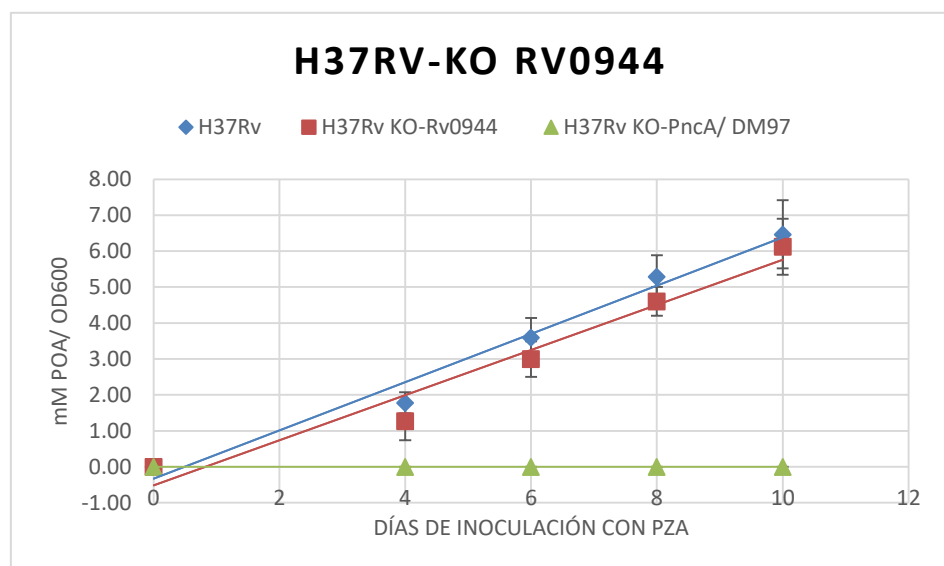


Figura 32: Medición de la tasa de flujo de POA de H37Rv-KO Rv0944. Se observa un cambio significativo en la tasa de flujo de POA

entre la cepa de referencia H37Rv y la cepa de *M. tuberculosis* con el gen Rv0944 removido ($p=0.033$). La tasa de flujo de POA de las cepas resistentes a PZA (H37Rv KO-Rv2102 y DM 97) fue cero.

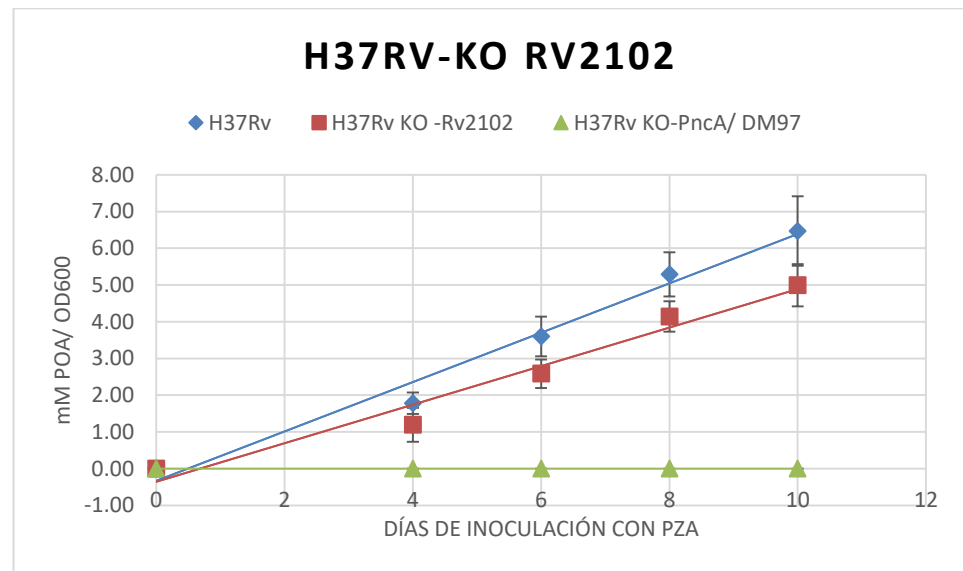


Figura 33: Medición de la tasa de flujo de POA de H37Rv-KO Rv2102. Se observa un cambio significativo en la tasa de flujo de POA entre la cepa de referencia H37Rv y la cepa de *M. tuberculosis* con el gen Rv2102 removido ($p=0.000$). La tasa de flujo de POA de las cepas resistentes a PZA (H37Rv KO-Rv2102 y DM 97) fue cero.

Tabla 7: Valores de cuantificación de POA en *M. tuberculosis*

Promedio mM POA (DE)					
Cepa	Días de Inoculación con PZA				
	0	4	6	8	10
H37Rv	0.00 (0)	1.78 (0.29)	3.60 (0.54)	5.29 (0.6)	6.47 (0.94)
H37Rv KO – Rv0944	0.00 (0)	1.25(0.46)	2.69 (0.82)	4.09 (1.18)	5.71(1.14)
H37Rv KO - Rv2102	0.00 (0)	1.19 (0.46)	2.58 (0.39)	4.14 (0.42)	4.99 (0.57)
H37Rv KO- <i>pncA</i>	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)
DM 97	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)

VI.4 Prueba de susceptibilidad a PZA

Los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) en PZA fueron más elevados en las cepas H37Rv KO-Rv0944/Rv2102 (MIC=400 y 200 µg/ml) en comparación con la cepa de referencia susceptible H37Rv (MIC=200 y 100 µg/ml) a los pH de 6.8 y 6.2, respectivamente. En contraste, el MIC de la droga PZA en la cepa de referencia resistente H37Rv KO-*pncA* superó ampliamente los valores obtenidos en las cepas recombinantes para ambos pH (>1600 µg/ml) (Figura 34 y 35).

Por otro lado, no se evidenciaron variaciones en los valores de MIC para la droga POA en las cepas recombinantes en comparación con la cepa de referencia susceptible (MIC=100 µg/ml y 50 µg/ml) en los pH 6.8 y 6.2, respectivamente. No obstante, se registró un leve aumento en el MIC de la

droga POA en la cepa de referencia resistente en comparación con las cepas previamente mencionadas (MIC=200 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$). (Figura 34 y 35). Finalmente, se observó que todas las cepas de *Mtb* evaluadas fueron susceptibles para las concentraciones de droga isoniazida (INH) probadas.

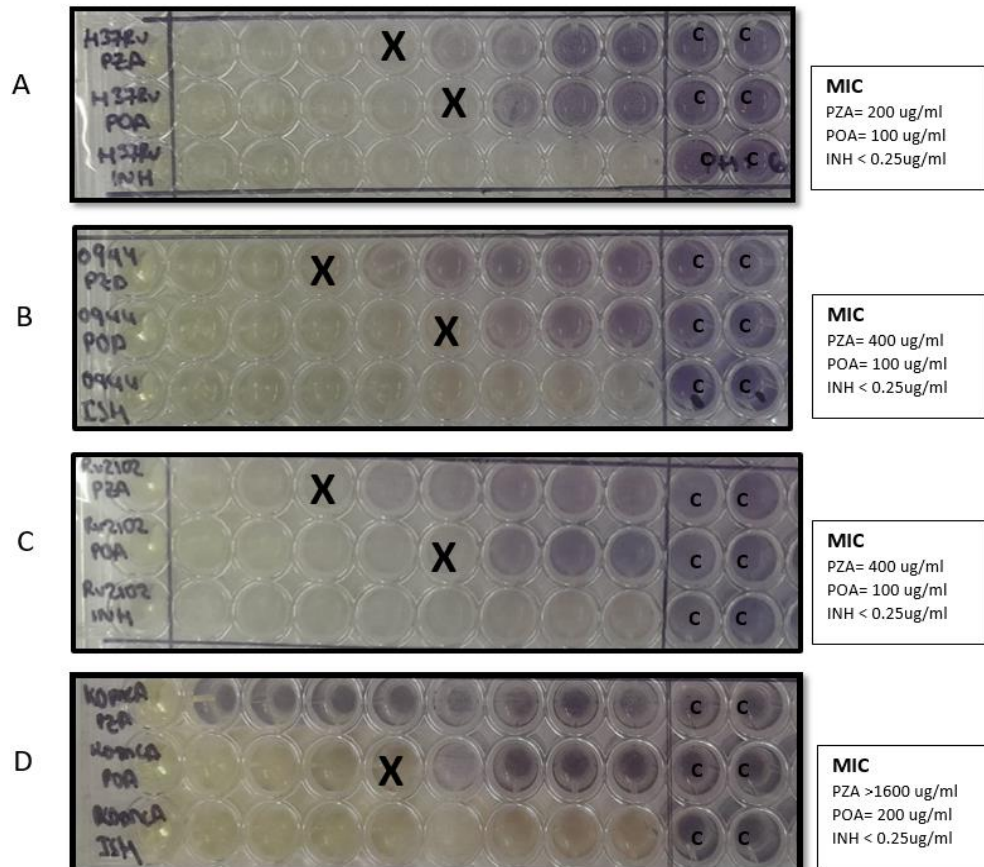


Figura 34: Prueba de susceptibilidad a drogas (TEMA) a pH 6.8. A. H37Rv, MIC de 200 $\mu\text{g/ml}$ para PZA, 100 $\mu\text{g/ml}$ para POA y <0.25 $\mu\text{g/ml}$ para INH. B. H37Rv KO-Rv0944, MIC de 400 $\mu\text{g/ml}$ para PZA, 100 $\mu\text{g/ml}$ para POA y <0.25 $\mu\text{g/ml}$ para INH. C. H37Rv KO-Rv2102, MIC de 400 $\mu\text{g/ml}$ para PZA, 100 $\mu\text{g/ml}$ para POA y <0.25 $\mu\text{g/ml}$ para INH. D. H37Rv

KO-*pncA*, MIC de >1600 µg/ml para PZA, 200 µg/ml para POA y <0.25 µg/ml para INH.

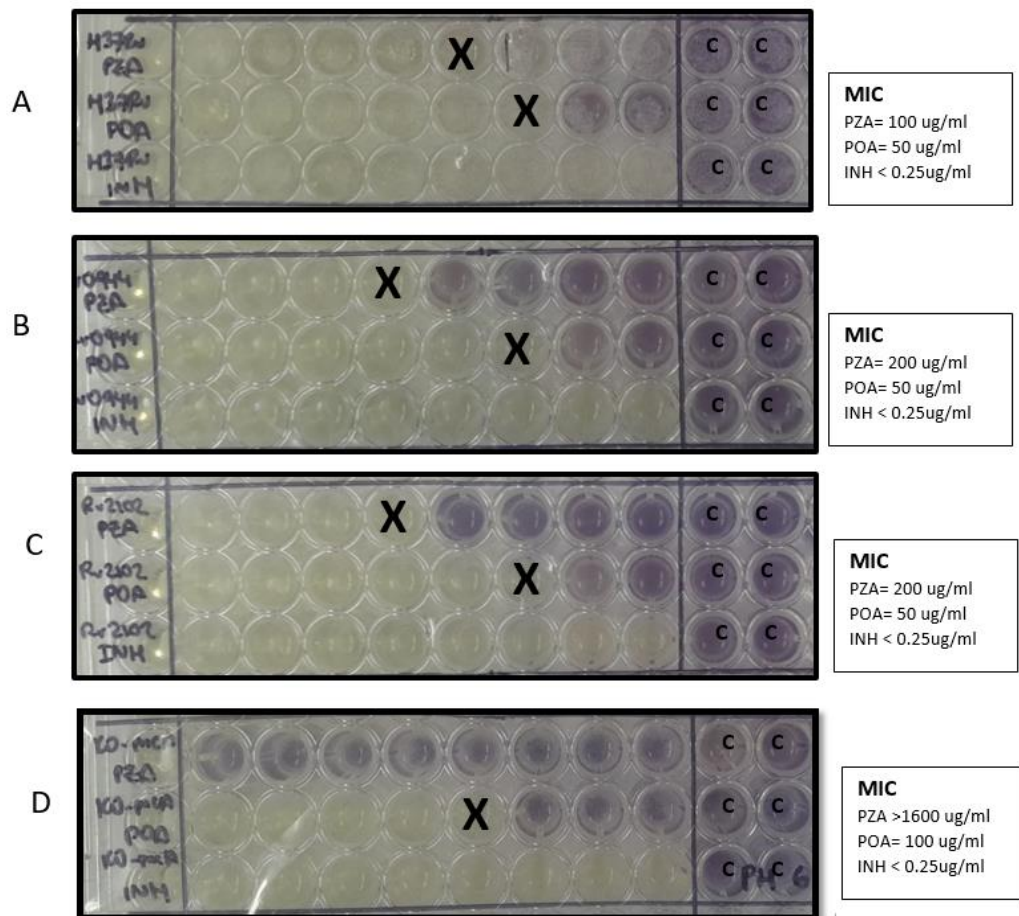


Figura 35: Prueba de susceptibilidad a drogas (TEMA) a pH 6.2. A. H37Rv, MIC de 100 µg/ml para PZA, 50 µg/ml para POA y <0.25 µg/ml para INH. B. H37Rv KO-Rv0944, MIC fueron de 200 µg/ml para PZA, 50 µg/ml para POA y <0.25 µg/ml para INH. C. H37Rv KO-Rv2102, MIC de 200 µg/ml para PZA, 50 µg/ml para POA y <0.25 µg/ml para INH. D. H37Rv KO-*pncA*, MIC de >1600 µg/ml para PZA, 100 µg/ml para POA y <0.25 µg/ml para INH.

VII. DISCUSIÓN

El estudio de metalochaperonas como nuevo mecanismo de acción y resistencia a PZA en *M. tuberculosis* es un campo de investigación emergente en la comunidad científica. En el presente estudio se ha evaluado la posible acción de dos metalochaperonas candidatas de la enzima PZAsa codificadas por los genes Rv0944 y Rv2102 mediante la generación de cepas H37Rv knockout, y la evaluación de la actividad enzimática de PZAsa y resistencia a PZA en *Mtb*.

Las metaloproteínas codificadas por los genes Rv0944 y Rv2102 fueron seleccionadas como candidatos a metalochaperonas de PZAsa en la bacteria debido a que demostraron presentar conformaciones y distancias de interacción favorables entre sus centros metálicos y la enzima PZAsa de *Mtb*, semejante a lo obtenido con la metalochaperona Rv2059, para predecir una posible transferencia de metal desde la metalochaperona candidata hacia la enzima PZAsa (resultados aún no publicado).

Nuestros resultados revelaron que la remoción individual de los genes Rv0944 y Rv2102 en *Mtb*, produjo una disminución significativa en la tasa de eflujo de POA con respecto a la cepa wild type H37Rv ($p=0.033$ y $p=0.000$, respectivamente). Sin embargo, esta disminución no fue completa, en contraste con lo observado en cepas resistentes a PZA, como H37Rv KO-*pncA* (una cepa genéticamente modificada resistente a PZA) y DM 97 (una cepa clínica MDR resistente a PZA) (86, 87, 88).

La evaluación de la tasa de eflujo de POA proporciona una medida indirecta de la formación de POA intracelular, y por lo tanto, de la actividad enzimática. El POA generado se expulsa activamente desde la bacteria hacia el medio extracelular, facilitado por un transporte activo deficiente en *Mtb* y el pH extracelular. Esto establece un equilibrio entre sus formas protonada (HPOA) e ionizada (POA⁻), el cual tiende a acumularse en el exterior cuando el pH extracelular se sitúa cerca de 6.8-7 (59). La reducción en la tasa de eflujo de POA en aislados clínicos que presentan mutaciones en el gen *pncA* se ha asociado con la resistencia a la droga PZA en *Mtb* (89). Esto se debe a que a un pH ácido extracelular, el transporte activo de POA altera el potencial de membrana y afecta el transporte de nutrientes hacia el interior de la célula, lo que constituye uno de los principales mecanismos que contribuyen a la muerte de la bacteria (7,8, 90).

En nuestro estudio, la disminución parcial de la tasa de eflujo de POA en las cepas recombinantes de *Mtb*, donde se removieron de manera individual los genes Rv0944 y Rv2102, se asoció con un leve incremento en la resistencia a PZA a los pH 6.8 y 6.2 evaluados (MIC=400 µg/ml y MIC=200 µg/ml, respectivamente). Mientras tanto, las cepas H37Rv KO-*pncA* y DM 97, que son resistentes a la PZA, exhibieron valores de MIC superiores a 1600 µg/ml en ambos pH. La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de una droga sirve para evaluar la eficacia de la droga contra una cepa específica. La resistencia de un microorganismo a una droga se asocia con valores de MIC elevados (91). Los valores de MIC para la droga PZA en *Mtb* pueden variar según las condiciones de prueba, los procedimientos realizados, el pH y el tipo de cepa. Para la cepa de

referencia H37Rv, los valores de MIC pueden oscilar entre 50 µg/ml y 100 µg/ml en el rango de pH de 5.8 a 6.0 (92, 93, 94, 95). En nuestro estudio, determinamos un valor de MIC de 200 µg/ml a un pH de 6.8 y de 100 µg/ml a un pH de 6.2 para la cepa de referencia H37Rv que evaluamos mediante el método de TEMA. La evaluación de la susceptibilidad a la PZA a pH inferiores a 6.2 representó un desafío en nuestro estudio, ya que no se detectó crecimiento en pH cercanos a 5.5.

A diferencia de otras drogas antituberculosas, la PZA es una droga paradójica, ya que solo es letal para las bacterias con metabolismo reducido (30). Este efecto bactericida es impulsado por el pH ácido (5.5) del medio intracelular de los fagolisosomas de los macrófagos activados, donde se encuentran las bacterias en estado latente (41, 96). Debido a esta característica única de la droga es común obtener resultados falsos positivos en las pruebas de susceptibilidad a la PZA en *Mtb* cuando se realizan a pH ácidos cercanos a 5.5. Esto se debe a la falta de crecimiento bacteriano *in vitro*, que ocurre como resultado de un proceso de adaptación que experimenta *Mtb* ante el bajo pH del medio de cultivo (97, 98, 99). Ante estos desafíos técnicos, en nuestro estudio optamos por realizar las pruebas de susceptibilidad a pH 6.8 y 6.2, y encontramos que los valores de MIC de la droga en la cepa de referencia a pH 6.2, se encontraba dentro del rango de variación reportado por varios grupos de investigación (92, 93, 94, 95).

Por otro lado, al evaluar la susceptibilidad de POA a diferentes valores de pH, no se observaron cambios en los valores de MIC en comparación con la cepa de referencia H37Rv (MIC=100 µg/ml a pH 6.8 y MIC=50 µg/ml a pH 6.2). Esto

podría sugerir que el aumento de la resistencia observado en las cepas recombinantes de *Mtb* podría deberse a la pérdida parcial de la actividad de la enzima PZAsa como resultado de la remoción individual de los genes Rv0944 y Rv2102 en la bacteria.

En cuanto a las cepas resistentes a PZA evaluadas, los valores de MIC para POA en diferentes valores de pH (datos no mostrados para DM 97) fueron ligeramente más altos en comparación con la cepa de referencia H37Rv (MIC=200 µg/ml a pH 6.8 y MIC=100 µg/ml a pH 6.2). Esto podría indicar la posible presencia de mecanismos de resistencia a PZA independientes de la actividad enzimática de la PZAsa. Actualmente, la comunidad científica se encuentra investigando nuevos mecanismos de resistencia a PZA que podrían estar relacionados a objetivos proteicos dentro del citosol, como la proteína ribosómica S1 (*RpsA*) que participa en el proceso de traducción y la enzima aspartato 1-d Descarboxilasa (*PanD*) que participa en la biosíntesis de la coenzima A (62,65).

A diferencia de otras drogas antituberculosas que son ampliamente utilizadas en el tratamiento de primera línea, el mecanismo de acción y resistencia de PZA es poco comprendido y más complejo (7, 8, 53). La pérdida de la actividad de la enzima PZAsa debido a mutaciones en el gen *pncA*, es considerado como el principal mecanismo de resistencia a PZA (7,60,61); sin embargo, actualmente no todas las cepas resistentes a PZA presentan mutaciones en el gen *pncA* (16, 17,18). Por lo que se plantea la posibilidad de que existan otros mecanismos de resistencia a PZA que sean independientes de las mutaciones en el gen *pncA* (16, 17, 18, 33).

La enzima PZAsa es fundamental para el metabolismo de la droga. Es importante destacar que la PZAsa se clasifica como una metaloenzima, donde su cofactor metálico juega un rol crucial en el proceso de catálisis (21,23). Por lo tanto, la ausencia del cofactor metálico conduce a la pérdida de actividad enzimática (23).

Actualmente, la naturaleza exacta del cofactor metálico para la PZAsa en *Mtb* sigue siendo un enigma sin resolver. Aunque se ha identificado la presencia de Fe^{+2} dentro del cristal de la enzima (19), otros estudios han reportado la presencia de Mn^{+2} y Zn^{+2} en la proteína recombinante de *Mtb* (20). Además, se ha observado que Co^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} pueden reactivar la enzima PZAsa *in vitro* (21). En un ensayo realizado por nuestro grupo de investigación, hemos encontrado que el Ni^{+2} puede reactivar la enzima PZAsa con una intensidad comparable a la del Co^{+2} (resultados aún no publicados). A raíz de todas estas observaciones en torno a la enzima, se plantea la posibilidad de que *in vitro* la PZAsa podría ser lo que se conoce como "cofactorialmente promiscua," lo que implica que tiene la capacidad de interactuar con múltiples cofactores metálicos en su sitio de coordinación de metal. Mahmoud *et al.*, presentaron un estudio de mecánica cuántica que respalda esta hipótesis (22). Para que un ion metálico pueda actuar como cofactor de PZAsa, debe cumplir dos requisitos fundamentales. Primero, debe establecer enlaces estables con los residuos de coordinación de la enzima, lo que garantiza la viabilidad energética del complejo formado. Segundo, debe tener la capacidad de polarizar los enlaces O-H de las moléculas de agua presentes en el sitio de coordinación del metal, lo que conduce a la formación de agua activada. Este último proceso es crucial para la formación del segundo intermediario en la reacción enzimática (23). En el estudio se demostró

que el $Zn^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+}$ confiere una alta estabilidad al complejo proteína-metal, mientras que, $Ni^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+} > Zn^{2+}$ presentan una mayor capacidad de polarización de las moléculas de agua (22). A pesar de la alta promiscuidad de la PZAsa observada *in vitro* hacia los metales de transición mencionados, aún no se sabe si esta característica se mantiene *in vivo* durante la infección.

En la actualidad, se conoce que los iones metálicos son fundamentales en una variedad de procesos metabólicos dentro de las bacterias. No obstante, tanto el exceso como la escasez de estos iones pueden ser perjudiciales, incluso letales, y afectar negativamente el crecimiento bacteriano (100,101). Por lo tanto, las bacterias han desarrollado mecanismos para regular cuidadosamente la cantidad de metales presentes en su entorno, conocidos como homeostasis de metales (102, 103, 104). Entre los metales considerados como posibles cofactores metálicos de la PZAsa, el zinc, hierro y manganeso se destacan como los más importantes para el metabolismo bacteriano, mostrando una alta biodisponibilidad y encontrándose mayormente como cofactores de proteínas (24, 102, 105, 106). Para mantener la homeostasis de estos metales, las bacterias dependen de una serie de procesos regulados por proteínas especializadas. Estas proteínas tienen la capacidad de detectar variaciones en la cantidad de metales libres en el citosol, movilizar los metales desde y hacia las reservas internas, facilitar la importación, exportación, secuestro y transporte de metales (102).

Durante el proceso de infección, las bacterias enfrentan el reto de adquirir metales esenciales para su crecimiento dentro del entorno hostil del huésped (101). Los macrófagos, como parte de la respuesta inmunitaria, adoptan una estrategia para obstaculizar este proceso mediante la expresión de la proteína NRAMP1, clave en la resistencia natural. Esta proteína actúa limitando la disponibilidad de hierro y manganeso dentro de las vacuolas fagocíticas, dificultando así el desarrollo bacteriano (107,108). Contrariamente, el zinc se incrementa intencionadamente en estas vacuolas, con el propósito de eliminar y/o limitar el crecimiento de las bacterias a través de la intoxicación por este metal (100). Esta dinámica subraya un sofisticado mecanismo de defensa del huésped destinado a combatir la infección, manipulando la disponibilidad de metales cruciales para la supervivencia bacteriana. Por lo tanto, especulamos que durante la infección, la enzima PZAsa de *Mtb* podría estar coordinando con Zn^{2+} como una estrategia de adaptación bacteriana (109), dado la abundancia de este metal en el entorno y su alta afinidad hacia los ligandos en el sitio de coordinación de la enzima.

Por otro lado, se ha dado a conocer que la activación de PZAsa en la bacteria podría requerir de un proceso asistido, donde participen metalochaperonas y diferentes proteínas transportadoras y reguladoras de metales (21, 29). Sin embargo, aún se conoce poco sobre las proteínas involucradas en la activación de la enzima y cómo se podría llevar a cabo este proceso.

Hasta la fecha, solo se ha reportado a la proteína codificada por el gen Rv2059 como posible metalochaperona de PZAsa (29). Esta proteína es homóloga a la

proteína transportadora de Zinc, ZnuA en *E. coli* (110, 111), y en estudios *in vitro*, ha logrado reactivar en un 69% la actividad de la apo PZAsa recombinante de *Mtb*. Además, la inactivación del gen Rv2059 en *Mtb* se ha asociado a una disminución de la tasa de eflujo de POA y a un incremento en la resistencia a PZA en la bacteria (resultados aún no publicados). No obstante, la disminución de la tasa de eflujo de POA no fue completa, contrario a lo observado en los aislados clínicos resistentes a esta droga. Por lo que el proceso de activación de la enzima PZAsa podría ser más complejo e involucrar la participación de más de una proteína metalochaperona o transportadora de metal.

En este estudio, proporcionamos información de la posible participación en el proceso de activación de PZAsa de dos nuevas proteínas, codificadas por los genes Rv0944 y Rv2102. Ambas proteínas tienen centros metálicos con afinidad por el cofactor Zn^{+2} . Estudios a nivel de genómica y proteómica han confirmado la existencia de estas dos proteínas en *Mtb* (112, 113, 114). La proteína codificada por el gen Rv2102 no ha sido funcionalmente caracterizada hasta la fecha. Por el contrario, la proteína codificada por el gen Rv0944 ha sido identificada previamente como homóloga a una formamidopirimidina ADN glicosilasa. Sin embargo, posteriormente se reportó que carecía de actividad de ADN glicosilasa/liasa (114, 115).

En nuestro estudio, la remoción individual de los genes candidatos a metalochaperonas de PZAsa en *Mtb*, Rv2102 y Rv0944, se asoció con una disminución en la tasa de eflujo de POA y un ligero incremento en la resistencia a

PZA en la bacteria, similar a lo observado con la proteína metalochaperona Rv2059 (resultados aún no publicados). Estos hallazgos coinciden con los resultados obtenidos en el ensayo de acoplamiento molecular diseñado para identificar metaloproteínas capaces de transferir metal hacia la PZAsa en *Mtb* (resultados aún no publicados). Por lo cual, sugerimos que los genes Rv0944 y Rv2102 podrían estar implicados en el mecanismo de activación de la enzima PZAsa en *Mtb*, posiblemente como metalochaperonas o proteínas transportadoras de metales. No obstante, se requiere llevar a cabo más estudios para confirmar esta hipótesis.

El gen *pncA*, codifica para la enzima PZAsa, es considerado no esencial para la sobrevivencia de *Mtb*, por lo que su inactivación no afecta el crecimiento bacteriano. En bacterias, la función biológica de *pncA* radica en su participación en una de las vías biosintéticas de rescate de NAD⁺, específicamente en la conversión de nicotinamida a ácido nicotínico para la vía de Preiss y Handler (10, 56, 57). NAD⁺ es un cofactor esencial para las células, participando en diversas reacciones clave como la producción de energía, regulación metabólica y mantenimiento del equilibrio redox, etc (116, 117, 118). Dada su importancia, los organismos han desarrollado una gran plasticidad en su biosíntesis (10).

En procariontes, la biosíntesis de novo de NAD⁺ puede ocurrir a partir de aspartato, fosfato de dihidroxiacetona y triptófano, mientras que su reciclaje puede lograrse a través de una variedad de vías, utilizando productos de degradación del NAD⁺ como ácido nicotínico, nicotinamida, ribósido de ácido nicotínico o ribósido de nicotinamida (10,119,120,121). Para patógenos como *Mtb*, la vía de reciclaje representa una estrategia vital para obtener este cofactor directamente de su

huésped, especialmente ante la escasez de nutrientes en el interior de los fagos lisosomas (13,122). No obstante, Boshoff *et al.* descubrieron que, aunque el reciclaje de NAD⁺ aumenta en *Mtb* durante la infección y en condiciones de hipoxia, ni la vía de biosíntesis de novo ni la vía de rescate son esenciales para la supervivencia bacteriana en dicho entorno (12). Este hallazgo resalta la gran plasticidad metabólica de *Mtb* durante la infección. Asimismo, se sugiere que la contribución de la vía de rescate de nicotinamida a partir del gen *pncA* no parece ser tan significativa para la biosíntesis de NAD⁺ y la sobrevivencia de la bacteria, a diferencia de la vía de rescate de ácido nicotínico o la vía biosintética de novo a cargo de los genes *pncB2* y *nadABC*, respectivamente (12,123). Estos genes, junto con *nadR*, muestran un aumento en su expresión bajo estas condiciones. Aunque no se conoce la función exacta de *nadR* en la biosíntesis de NAD⁺ en *Mtb*, en otros microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Haemophilus influenzae*, *nadR* es una enzima multifuncional que participa en la vía de rescate de ribósido de nicotinamida, convirtiéndolo en mononucleótido de nicotinamida (NMN) y posteriormente en NAD⁺, mediante sus dominios ribosil nicotinamida quinasa (RNK) y dominio NMN adenil transferasa (NMNAT) (124,125, 126, 127). Por lo tanto, se cree que la inactivación de los genes de metalochaperonas involucrados en la activación de la enzima PZAsa en *Mtb* no debería afectar la sobrevivencia de la bacteria, pero sí su capacidad de metabolizar la droga PZA y, por lo tanto, su susceptibilidad durante la infección. En el presente estudio, confirmamos que los genes *Rv2102* y *Rv0944*, candidatos a metalochaperonas de PZAsa en *Mtb*, presentan una baja vulnerabilidad genética, por lo que su remoción no interfiere con el crecimiento *in vitro*.

Hasta el momento, nuestro entendimiento acerca del funcionamiento de las metalochaperonas es limitado, y la identificación y estudio de estas proteínas es un campo en desarrollo (71, 72, 73, 74). Además, aún no hemos alcanzado una comprensión completa de cómo las metalochaperonas garantizan la especificidad en la transferencia de metales a las metaloenzimas. Del mismo modo, la red de interacciones entre metalochaperonas y metaloenzimas sigue siendo compleja y no está completamente esclarecida en diversos microorganismos.

En algunos casos, la activación de una metaloenzima puede requerir la colaboración de múltiples metalochaperonas y/o proteínas transportadoras de metales, como se observa en el caso de la enzima ureasa de diferentes microorganismos, cuya activación involucra a las metalochaperonas Ure D, E, F y G (128, 129, 130). Por otro lado, también existen metalochaperonas que pueden interactuar con más de una metaloproteína objetivo, como es el caso de la metalochaperona bacteriana de cobre CopZ, homóloga de Atx1 de *S. cerevisiae*, que además transfiere Cu^{+2} a las ATPasas de tipo CopA 1 y CopA2, también transfiere Cu^{+2} al factor de transcripción CopY para regular el tráfico de este metal en la bacteria (131, 132, 133, 134).

Debido a la complejidad que hemos observado en la activación de la enzima PZAsa en *Mtb*, es plausible sugerir que su mecanismo de activación podría implicar una intrincada red de interacciones que involucran a varias metalochaperonas y/o proteínas transportadoras de metales. En este contexto, las proteínas codificadas por los genes Rv0944 y Rv2102 podrían desempeñar un papel fundamental en estas

interacciones. Es importante continuar realizando estudios en este campo, ya que una fuente potencial de resistencia a PZA podría radicar en la pérdida de la función de la enzima PZAsa debido a la interrupción de este proceso de activación asistido, posiblemente causada por mutaciones en los genes involucrados.

Los estudios de genómica funcional en *Mtb* son importantes para comprender la biología de la bacteria, identificar nuevos genes involucrados al mecanismo de resistencia, encontrar blancos terapéuticos, etc. (135). En el presente estudio, se estandarizó y empleo la técnica ORBIT (Oligonucleotide-mediated recombineering followed by Bxb1 integrase targeting) para remover los genes de interés (30,84). ORBIT representa una alternativa rápida y económica para estudiar la funcionalidad de los genes no esenciales en *Mtb* relacionados al mecanismo de resistencia a drogas antituberculosas. A diferencia de otras técnicas de edición genética que se han venido usando en *Mtb* para generar knockout, como recombinación homóloga, recombineering, transducción especializada de fagos, etc. ORBIT proporciona una alternativa eficaz para abordar los desafíos más destacados que se enfrentan en la edición de genes de *Mtb*. Estos desafíos incluyen la limitada capacidad de captar fragmentos de ADN largos, la baja eficiencia de la recombinación, la selección de colonias recombinantes, los cortes específicos y la construcción de sistemas laboriosos, entre otros (83, 136, 137, 138).

La estrategia de ORBIT se basa en el diseño de un oligonucleótido corto de 188 bases que contiene únicamente las secuencias flanqueantes específicas del gen objetivo, junto con una breve secuencia de 48 bases reconocida por la integrasa

Bxb1 (attP). La ventaja de utilizar un oligonucleótido pequeño radica en su mayor eficiencia de captación por parte de la bacteria en comparación con fragmentos de ADN largos. Además, para protegerlo de la degradación por nucleasas, se introduce una mayor cantidad de oligonucleótido (1 µg) en una cepa de *Mtb* que ha expresado las proteínas de recombinación RecT de Che9c y Bxb1 durante 18 horas (30,84).

Una vez que el oligonucleótido ingresa a la micobacteria, esta es dirigida por RecT hacia gen target y recombinada, empleándose como fragmento de okazaki durante la replicación de la bacteria. La recombinación del oligonucleótido conduce a la eliminación de la secuencia de nucleótidos del gen target que no estaban incluidos en el diseño del oligonucleótido. De esta manera, se interrumpe la secuencia del gen (30,84).

La identificación de las cepas recombinantes que han perdido el gen objetivo se lleva a cabo de manera sencilla mediante la integración específica *in situ* de un vector suicida denominado pKM 464. Este vector está equipado con un marcador de selección hygR y contiene una secuencia attB. La secuencia attB se une al oligonucleótido guía previamente recombinado, de manera específica en la región attP, gracias a la acción de la enzima Bxb1. Este proceso permite una selección eficaz de las cepas recombinantes que han experimentado la eliminación del gen objetivo (30, 84).

La principal ventaja de ORBIT radica en que ambos eventos de recombinación se llevan a cabo en un solo paso dentro de la célula, lo que acelera significativamente la obtención de resultados y minimiza la cantidad de material necesario.

VIII. CONCLUSIONES

- La remoción individual de los genes Rv2102 y Rv0944 en H37Rv, mediante la técnica ORBIT, no interfiere con el crecimiento bacteriano in vitro de *Mycobacterium Tuberculosis*.
- La remoción individual de los genes Rv2102 y Rv0944 en H37Rv disminuye la tasa de eflujo de POA en $-0.15 \text{ mM POA/OD600 x d}^{-1}$ (21%) y $-0.0675 \text{ mM POA/OD600 x d}^{-1}$ (9.87%), respectivamente, por lo que podría estar relacionado con la pérdida parcial de la actividad en la enzima PZAsa.
- La remoción individual de los genes Rv2102 y Rv0944 en H37Rv disminuyeron parcialmente la susceptibilidad a PZA, pero no de POA a los pH de 6.2 y 6.8.

IX. DIRECCIONES A FUTURO

- Complementar las cepas recombinantes H37Rv KO- Rv0944 y H37Rv KO- Rv2102 con sus respectivos genes en plásmidos integrativos, y luego evaluar el efecto reverso sobre la tasa de flujo de POA y resistencia a PZA.
- Expresar de forma recombinante las proteínas Rv0944 y Rv2102 y evaluar su capacidad de reactivación a la proteína Apo-PZAsa de *Mtb*.
- Evaluar el efecto sinérgico de la inactivación simultánea de los siguientes pares de genes Rv0944/ Rv2102, Rv0944/ Rv2059, Rv2102/ Rv059 y Rv0944/ Rv2102/Rv2059, sobre la tasa de flujo de POA y resistencia a PZA en *Mtb*.
- Secuenciar y analizar el diferencial de expresión del transcriptoma cuando los genes Rv0944, Rv2102 y Rv2059 se encuentran inactivados de forma individual en *Mtb*, y la bacteria se encuentra expuesta a 0, 25 y 50 µg/ml de PZA y a diferentes condiciones de pH (6.8, 6.0 y 5.5)

X. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022.
2. CDC MINSA. Vigilancia de tuberculosis [Internet]. Perú: CDC MINSA; 2020. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/vigilancia-epidemiologica/vigilancia-de-tuberculosis/>
3. MINSA. DPCTB: Portal de Información [Internet]. Gob.pe. Disponible en: <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/DashboardDPCTB/Dashboard.aspx>
4. Bansal R, Sharma D, Singh R. Tuberculosis and its treatment: An overview. *Mini Rev Med Chem*. 2018; 18(1):58-71.
5. Fogel N. Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015; 95(5):527–31.
6. Steele MA, Des Prez RM. The role of pyrazinamide in tuberculosis chemotherapy. *Chest*. 1988; 94(4):845–50
7. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. *Microbiol Spectr*. 2013; 2(4):1–12.
8. Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52:790–795.

9. Zhang Y, Zhang J, Cui P, Zhang Y, Zhang W. Identification of Novel Efflux Proteins Rv0191, Rv3756c, Rv3008, and Rv1667c Involved in Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(8):1–10
10. Gazzaniga F, Stebbins R, Chang SZ, McPeck MA, Brenner C. Microbial NAD metabolism: Lessons from comparative genomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009;73(3):529–41.
11. Rohde KH, Sorci L. The prospective synergy of antitubercular drugs with NAD biosynthesis inhibitors. *Front Microbiol*. 2021; 11: 634640.
12. Boshoff HIM, Xu X, Tahlan K, Dowd CS, Pethe K, Camacho LR, et al. Biosynthesis and Recycling of Nicotinamide Cofactors in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*. 2008;283 (28):19329–41.
13. Vilchèze C, Weinrick B, Wong K-W, Chen B, Jacobs WR Jr. NAD⁺ auxotrophy is bacteriocidal for the tubercle bacilli. *Mol Microbiol*. 2010;76(2):365–77.
14. Mahmood N, Bhatti S, Abbas SN, Shahid S, Nasir SB. The *pncA* gene mutations of *Mycobacterium tuberculosis* in multidrug-resistant tuberculosis. *Biotechnol Appl Biochem*. 2022; 69(5):2195–204.
15. Bi J, Wang H, Xie J. Comparative genomics of NAD(P) biosynthesis and novel antibiotic drug targets. *J Cell Physiol*. 2011; 226(2):331–40.
16. Allana S, Shashkina E, Mathema B, Bablishvili N, Tukvadze N, Shah NS, et al. *pncA* gene mutations associated with pyrazinamide resistance in drug-resistant tuberculosis, South Africa and Georgia. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23(3):491–5.

17. Zimic M, Sheen P, Quiliano M, Gutierrez A, Gilman RH. Peruvian and globally reported amino acid substitutions on the *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase suggest a conserved pattern of mutations associated to pyrazinamide resistance. *Infect Genet Evol.* 2010; 10(2):346–9.
18. Shi D, Zhou Q, Xu S, Zhu Y, Li H, Xu Y. Pyrazinamide resistance and *pncA* mutation profiles in multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Drug Resist.* 2022; 15:4985–94.
19. Petrella S, Gelus-Ziental N, Maudry A, Laurans C, Boudjelloul R, Sougakoff W. Crystal structure of the pyrazinamide of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. *PloS One.* 2011; 6(1):e15785.
20. Zhang H, Deng J-Y, Bi L-J, Zhou Y-F, Zhang Z-P, Zhang C-G, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* nicotinamidase/pyrazinamidase: Characterization of *Mycobacterium tuberculosis pncA*. *FEBS J.* 2008; 275(4):753–62.
21. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, Christiansen G, Moreno-Román P, Gutiérrez AH, Sotelo J, Evangelista W, Fuentes P, Rueda D, Flores M, Olivera P, Solis J, Pesaresi A, Lamba D, Zimic M. Role of metal ions on the activity of *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87:153–161.
22. Khadem-Maaref M, Mehrnejad F, Phirouznia A. Effects of metal-ion replacement on pyrazinamidase activity: A quantum mechanical study. *J Mol Graph Model.* 2017; 73:24–9.

23. Du X, Wang W, Kim R, Yakota H, Nguyen H, Kim S-H. Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry*. 2001; 40:14166–14172.
24. Outten CE, O’Halloran TV. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*. 2001; 292(5526):2488–92.
25. Rosenzweig AC. Metallochaperones: bind and deliver. *Chem Biol*. 2002; 9(6):673–7.
26. Capdevila DA, Edmonds KA, Giedroc DP. Metallochaperones and metalloregulation in bacteria. *Essays Biochem*. 2017; 61(2):177–200.
27. Maciag A, Dainese E, Rodriguez GM, Milano A, Provvedi R, Pasca MR, Smith I, Palù G, Riccardi G, Manganelli R. Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. *J Bacteriol*. 2007;189: 730–740.
28. Lee YH, Dorwart MR, Hazlett KRO, Deka RK, Norgard MV, Radolf JD, Hasemann CA. The Crystal Structure of Zn(II)-Free *Treponema pallidum* TroA, a Periplasmic Metal-Binding Protein, Reveals a Closed Conformation. *J Bacteriol*. 2002; 184: 2300–2304.
29. Sheen P, Monsalve A, Campos J, Huerta R, Antiparra R, Arteaga H, et al. Metallochaperones Are Needed for *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli* Nicotinamidase-Pyrazinamidase Activity. *J Bacteriol*. 2020; 202(2): e00331-19
30. Murphy KC, Nelson SJ, Nambi S, Papavinasasundaram K, Baer CE, Sassetti CM. ORBIT: A new paradigm for genetic engineering of *Mycobacterial* chromosomes. *MBio*. 2018;9(6).

31. den Hertog AL, Sengstake S, Anthony RM. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* fails to bite? *Pathog Dis*. 2015;73(6):ftv037.
32. Njire M, Tan Y, Mũgweru J, Wang C, Guo J, Yew W, et al. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Review and update. *Adv Med Sci*. 2016;61(1):63–71.
33. Singh P, Mishra AK, Malonia SK, Chauhan DS, Sharma VD, Venkatesan K, et al. The paradox of pyrazinamide: an update on the molecular mechanisms of pyrazinamide resistance in *Mycobacteria*. *J Commun Dis*. 2006;38(3):288–98.
34. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med*. 2006;100(11):1862-70.
35. Dheda K, Gumbo T, Gandhi NR, et al. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. *Lancet Respir Med*. 2019;7(4):820-26.
36. Ministerio de Salud del Perú. Informe de la Situación de la Tuberculosis en el Perú. Lima: Ministerio de Salud del Perú; 2019.
37. Alarcón V, Alarcón E, Figueroa C, Mendoza-Ticona A. Tuberculosis en el Perú: Situación epidemiológica, avances y desafíos para su control. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2017; 34(2):299.
38. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5(1):39-47.

39. Barry CE, Boshoff HI, Dartois V, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7(12):845-55.
40. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31:475-527.
41. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2016; 2(1):1–23.
42. Skoura E, Zumla A, Bomanji J. Imaging in tuberculosis. *Int J Infect Dis.* 2015; 32:87-93.
43. Steingart KR, Henry M, Ng V, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6(9):570-581.
44. Pfyffer GE, Palicova F. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, et al., eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 10th ed. Washington, DC: American Society of Microbiology; 2011:472-502.
45. Kent PT, Kubica GP. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory.* U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control; 1985.
46. Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 1974; 109(1):147-151.

47. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, et al. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27(1):3-20.
48. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med.* 2010; 363(11):1005-1015.
49. Coll F, McNerney R, Preston MD, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med.* 2015; 7:51.
50. World Health Organization. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment, 2022 update. Geneva: World Health Organization; 2022.
51. Tiberi S, Muñoz-Torrico M, Duarte R, Dalcolmo M, D'Ambrosio L, Migliori G-B. New drugs and perspectives for new anti-tuberculosis regimens. *Pulmonology.* 2018; 24(2):86–98.
52. Dalmer O, Walter E, Firma E. Merck in Darmstadt. Verfahren zur Herstellung von Abkömmlingen der Pyrazinmonocarbonsäure. Patentiert im Deutschen Reiche vom 8. Juli 1934 ab. German patent 632 257 Klasse 12 p Gruppe 6 M 127990 IV a/12 p. 1936.
53. Zhang, Y., & Mitchison, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.* 2003; 7(1):6-21.

54. McDermott, W., & Tompsett, R. Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environments in vitro. *American Review of Tuberculosis*. 1954; 70(4):748-754.
55. McCune RM, Jr, Tompsett R. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. I. The persistence of drug-susceptible tubercle bacilli in the tissues despite prolonged antimicrobial therapy. *J Exp Med*. 1956; 104:737–762.
56. Preiss J, Handler P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* [Internet]. 1958;233(2):488–492.
57. Preiss J, Handler P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* [Internet]. 1958;233(2):492-500
58. Scorpio, A., et al., Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997. 41(3): p. 540-3.
59. Zhang, Y., et al., Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol*, 1999. 181(7): p. 2044-9.
60. Cheng, S.J., et al., *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. 44(3): p. 528-32.
61. Hirano, K., et al., Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis*, 1997. 78(2): p. 117-22.

62. Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE 3rd, et al. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2011; 333(6049):1630–2.
63. Dillon NA, Peterson ND, Feaga HA, Keiler KC, Baughn AD. Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of trans-Translation and RpsA. *Sci Rep*. 2017; 7(1):1–8.
64. Klemens SP, Sharpe CA, Cynamon MH. Activity of pyrazinamide in a murine model against *Mycobacterium tuberculosis* isolates with various levels of in vitro susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40:14-16.
65. Zhang S, Chen J, Shi W, Liu W, Zhang W, Zhang Y. Mutations in *PanD* encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect*. 2013; 2(1):1–5.
66. Gopal P, Nartey W, Ragunathan P, Sarathy J, Kaya F, Yee M, et al. Pyrazinoic acid inhibits Mycobacterial coenzyme A biosynthesis by binding to aspartate decarboxylase *PanD*. *ACS Infect Dis*. 2017; 3(11):807–19.
67. Gopal P, Sarathy JP, Yee M, Ragunathan P, Shin J, Bhushan S, et al. Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase. *Nat Commun*. 2020; 11(1):1–10.
68. Yee M, Gopal P, Dick T. Missense mutations in the unfoldase ClpC1 of the caseinolytic protease complex are associated with pyrazinamide

- resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61:e02342-02316.
69. Zhang Y, Zhang J, Cui P, Zhang Y, Zhang W. crossm Identification of Novel Efflux Proteins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(8):1–10
 70. Liu J, Shi W, Zhang S, Hao X, Maslov DA, Shur K V., et al. Mutations in efflux pump Rv1258c (Tap) cause resistance to pyrazinamide, isoniazid, and streptomycin in *M. tuberculosis*. *Front Microbiol.* 2019; 10:1–7.
 71. Waldron KJ, Robinson NJ. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7(1):25-35.
 72. Lill R. Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature.* 2009; 460(7257):831-838.
 73. Ma Z, Jacobsen FE, Giedroc DP. Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem. Rev.* 2009; 109(10):4644-4681.
 74. Foster AW, Osman D, Robinson NJ. Metal Preferences and Metallation. *J Biol Chem.* 2014; 289(41):28095-28103.
 75. Lill R, Hoffmann B, Molik S, et al. The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1823(9):1491-1508.
 76. Miller JJ, Kwan K, Gaiddon C, Storr T. A role for bioinorganic chemistry in the reactivation of mutant p53 in cancer. *J Biol Inorg Chem.* 2022; 27(4–5):393–403.
 77. Boal AK, Rosenzweig AC. Structural Biology of Copper Trafficking. *Chem Rev.* 2009; 109(10):4760-4779.

78. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583–589.
79. Dominguez, R. Boelens, A.M.J.J. Bonvin, HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1731–1737.
80. Tengerdy RP, Nagy JG, Martin B. Quantitative measurement of bacterial growth by the reduction of tetrazolium salts. *Appl Microbiol.* 1967; 15(4):954–5.
81. Wan Nor Amilah WAW, Mohammad Lukman Y, Siti Suraiya MN, Noor Izani NJ. Direct tetrazolium microplate assay (TEMA) for rapid drug susceptibility test screening of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trop Biomed.* 2016; 33(4):814–23.
82. Meinzen C, Proaño A, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Zimic M, et al. A quantitative adaptation of the Wayne test for pyrazinamide resistance. *Tuberculosis (Edinb).* 2016; 99:41–6.
83. Van Kessel JC, Marinelli LJ, Hatfull GF. Recombineering mycobacteria and their phages. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6(11):851–7.
84. Murphy KC. Oligo-Mediated Recombineering and its Use for Making SNPs, Knockouts, Insertions, and Fusions in *Mycobacterium tuberculosis*. En: *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US; 2021. p. 301–21.
85. Boshoff HI, Mizrahi V. Expression of *Mycobacterium smegmatis* pyrazinamidase in *Mycobacterium tuberculosis* confers hypersensitivity to

- pyrazinamide and related amides. *J Bacteriol.* octubre de 2000;182(19):5479-
86. Bosch B, DeJesus MA, Poulton NC, Zhang W, Engelhart CA, Zaveri A, et al. Genome-wide gene expression tuning reveals diverse vulnerabilities of *M. tuberculosis*. *Cell.* 2021; 184(17):4579-4592.e24.
 87. Lopez JM, Zimic M, Vallejos K, Sevilla D, Quispe-Carbajal M, Roncal E, et al. Quantitative ¹H nuclear magnetic resonance assay for the rapid detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples. *J Clin Microbiol.* 2023; 61(5).
 88. Rodriguez J, Alcántara R, Rodríguez J, Vargas J, Roncal E, Antiparra R, et al. Evaluation of three alternatives cost-effective culture media for *Mycobacterium tuberculosis* detection and drug susceptibility determination using the microscopic observation drug susceptibility (MODS) assay. *Tuberculosis (Edinb).* 2022; 137(102273):102273.
 89. Zimic M, Fuentes P, Gilman RH, Gutiérrez AH, Kirwan D, Sheen P. Pyrazinoic acid efflux rate in *Mycobacterium tuberculosis* is a better proxy of pyrazinamide resistance. *Tuberculosis (Edinb).* 2012; 92(1):84–91.
 90. Stehr M, Elamin AA, Singh M. Pyrazinamide: the importance of uncovering the mechanisms of action in mycobacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015; 13(5):593–603.
 91. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48:5–16.

92. Shi W. Activity of pyrazinamide against *Mycobacterium tuberculosis* at neutral pH in PZA-S1 minimal medium. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10(8):909.
93. Campanerut PAZ, Ghiraldi LD, Sposito FLE, Sato DN, Leite CQF, Hiroyuki Hirata M, et al. Rapid detection of resistance to pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* using the resazurin microtitre assay. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66(5):1044–6.
94. Gumbo T, Chigutsa E, Pasipanodya J, Visser M, van Helden PD, Sirgel FA, et al. The pyrazinamide susceptibility breakpoint above which combination therapy fails. *J Antimicrob Chemother*. 2014; 69(9):2420–5.
95. Thiede JM, Dillon NA, Howe MD, Aflakpui R, Modlin SJ, Hoffner SE, et al. Pyrazinamide susceptibility is driven by activation of the SigE-dependent cell envelope stress response in *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio*. 2022; 13(1).
96. Ravesloot-Chávez MM, Van Dis E, Stanley SA. The Innate Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Annu Rev Immunol*. 2021; 39(1):611–37.
97. APHL. Issues in *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTBC) Drug Susceptibility Testing: Pyrazinamide (PZA). Association of Public Health Laboratories; Washington, DC, USA; 2016.
98. Zhang Y., Permar S., Sun Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Med. Microbiol*. 2002; 51:42–49. doi: 10.1099/0022-1317-51-1-42.

99. Salfinger M. Drug-Resistant Tuberculosis: Inconsistent Results of Pyrazinamide Susceptibility Testing-Reply. *JAMA*. 1995; 273:917.
100. Djoko KY, Ong C-LY, Walker MJ, McEwan AG. The role of copper and zinc toxicity in innate immune defense against bacterial pathogens. *J Biol Chem*. 2015;290(31):18954–61.
101. Hood MI, Skaar EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(8):525–37.
102. Chandrangu P, Rensing C, Helmann JD. Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(6):338–50.
103. da Silva Neto JF, Staats CC, Pontes MH. Editorial: Metal homeostasis in microbial physiology and virulence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13.
104. Chareyre S, Mandin P. Bacterial iron homeostasis regulation by sRNAs. *Microbiol Spectr*. 2018;6(2).
105. Helmann JD. Specificity of Metal Sensing: Iron and Manganese Homeostasis in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*. 2014;289(41):28112–20.
106. Keyer K, Imlay JA. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(24):13635–40.
107. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 1997;388(6641):482–8.
108. Hanikenne M, Merchant SS, Hamel P. Transition Metal Nutrition. En: *The Chlamydomonas Sourcebook*. Elsevier; 2009. p. 333–99.

109. Natori Y, Nanamiya H, Akanuma G, Kosono S, Kudo T, Ochi K, et al. A fail-safe system for the ribosome under zinc-limiting conditions in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2007;63(1):294–307.
110. Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Petrarca P, Rotilio G, Battistoni A. High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infect Immun*. 2007; 75:5867-5876.
111. Yatsunyk L, Easton JA, Kim LR, Sugarbaker S, Bennett B, Brece RM, Vorontsov II, Tierney DL, Crowder MW, Rosenzweig AC. Structure and metal binding properties of ZnuA, a periplasmic zinc transporter from *Escherichia coli*. *J Biol Inorg Chem*. 2008; 13:271-288.
112. Chen Z-W, Fuchs K, Sieghart W, Townsend RR, Evers AS. Deep amino acid sequencing of native brain GABA_A receptors using high-resolution mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11(1):M111.011445.
113. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998; 393(6685):537–44.
114. Sidorenko VS, Rot MA, Filipenko ML, Nevinsky GA, Zharkov DO. Novel DNA glycosylases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry (Mosc)*. 2008; 73(4):442–50.
115. Guo Y, Bandaru V, Jaruga P, Zhao X, Burrows CJ, Iwai S, et al. The oxidative DNA glycosylases of *Mycobacterium tuberculosis* exhibit different substrate preferences from their *Escherichia coli* counterparts. *DNA Repair (Amst)*. 2010; 9(2):177–90.

116. Santos ARS, Gerhardt ECM, Parize E, Pedrosa FO, Steffens MBR, Chubatsu LS, et al. NAD⁺ biosynthesis in bacteria is controlled by global carbon/nitrogen levels via PII signaling. *J Biol Chem.* 2020;295(18):6165–76.
117. Wilkinson A, Day J, Bowater R. Bacterial DNA ligases. *Mol Microbiol.* 2001;40(6):1241–8.
118. Sorci L, Ruggieri S, Raffaelli N. NAD homeostasis in the bacterial response to DNA/RNA damage. *DNA Repair (Amst).* 2014;23:17–26.
119. Begley TP, Kinsland C, Mehl RA, Osterman A, Dorrestein P. The biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotides in bacteria. En: *Vitamins & Hormones.* Elsevier; 2001. p. 103–19.
120. Foster JW, Moat AG. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. *Microbiol Rev.* 1980;44(1):83–105.
121. Kurnasov O, Goral V, Colabroy K, Gerdes S, Anantha S, Osterman A, et al. NAD biosynthesis. *Chem Biol.* 2003;10(12):1195–204.
122. Berney M, Berney-Meyer L. Mycobacterium tuberculosis in the Face of Host-Imposed Nutrient Limitation. *Microbiol Spectr.* 2017;5(3).
123. Sharma S, Hsieh Y-C, Dietze J, Bockwoldt M, Strømmland Ø, Ziegler M, et al. Early evolutionary selection of NAD biosynthesis pathway in bacteria. *Metabolites.* 2022;12(7):569.
124. Kurnasov OV, Polanuyer BM, Ananta S, Sloutsky R, Tam A, Gerdes SY, et al. Ribosylnicotinamide kinase domain of NadR protein: Identification

- and implications in NAD biosynthesis. *J Bacteriol.* 2002;184(24):6906–17.
125. Singh SK, Kurnasov OV, Chen B, Robinson H, Grishin NV, Osterman AL, et al. Crystal Structure of *Haemophilus influenzae* NadR Protein. *J Biol Chem.* 2002;277(36):33291–9.
126. Merdanovic M, Sauer E, Reidl J. Coupling of NAD⁺ biosynthesis and nicotinamide ribosyl transport: Characterization of NadR ribonucleotide kinase mutants of *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol.* 2005;187(13):4410–20.
127. Foster JW, Park YK, Penfound T, Fenger T, Spector MP. Regulation of NAD metabolism in *Salmonella typhimurium*: molecular sequence analysis of the bifunctional nadR regulator and the nadA-pnuC operon. *J Bacteriol.* 1990;172(8):4187–96.
128. Biagi F, Musiani F, Ciurli S. Structure of the UreD–UreF–UreG–UreE complex in *Helicobacter pylori*: a model study. *J Biol Inorg Chem.* 2013; 18(5):571–7.
129. Fong YH, Wong HC, Yuen MH, Lau PH, Chen YW, Wong K-B. Structure of UreG/UreF/UreH complex reveals how urease accessory proteins facilitate maturation of *Helicobacter pylori* urease. *PLoS Biol.* 2013; 11(10):e1001678.
130. Boer JL, Quiroz-Valenzuela S, Anderson KL, Hausinger RP. Mutagenesis of *Klebsiella aerogenes* UreG to probe nickel binding and interactions with other urease-related proteins. *Biochemistry.* 2010; 49(28):5859–69.

131. Utz M, Andrei A, Milanov M, Trasnea PI, Marckmann D, Daldal F, et al. The Cu chaperone CopZ is required for Cu homeostasis in *Rhodobacter capsulatus* and influences cytochrome *cbb3* oxidase assembly. *Mol Microbiol.* 2019; 111:764-783.
132. Andrei A, Di Renzo MA, Öztürk Y, Meisner A, Daum N, Frank F, et al. The CopA2-Type P1B-Type ATPase CcoI Serves as Central Hub for *cbb3*-Type Cytochrome Oxidase Biogenesis. *Front Microbiol.* 2021; 12.
133. Harrison M, Jones C, Solioz M, Dameron C. Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25(1):29–32.
134. Cobine PA, George GN, Jones CE, Wickramasinghe WA, Solioz M, Dameron CT. Copper transfer from the *cu(I)* chaperone, CopZ, to the repressor, Zn(II)CopY: Metal coordination environments and protein interactions. *Biochemistry.* 2002; 41(18):5822–9.
135. Przybyla L, Gilbert LA. A new era in functional genomics screens. *Nat Rev Genet.* 2022; 23(2):89–103.
136. Agarwal N. Construction of a novel CRISPRi-based tool for silencing of multiple genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Plasmid.* 2020; 110(102515):102515.
137. Aldovini A, Husson RN, Young RA. The *uraA* locus and homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol.* 1993; 175(22):7282–9.
138. Balasubramanian V, Pavelka MS Jr, Bardarov SS, Martin J, Weisbrod TR, McAdam RA, et al. Allelic exchange in *Mycobacterium tuberculosis* with long linear recombination substrates. *J Bacteriol.* 1996; 178(1):273–9.

ANEXOS

Anexo 1: Preparación de células electrocompetentes y electroporación en *Mycobacterium tuberculosis*

- Inocular una asada de una colonia de *M. tuberculosis* en 5 mL de caldo 7H9-OADC-T. Vortexear e incubar a 37°C por 10 a 15 días.
- Inocular de 3 mL del cultivo inicial en 50 mL de caldo 7H9 enriquecido en un matraz de 250 mL (preparar los 50 mL de medio 24 horas antes para verificar que el matraz no esté contaminado) y continuar la incubación a 37°C a 100 rpm hasta obtener un OD600 de 0.6 a 0.8.
- Adicionar 0.1 volúmenes (5 mL) de glicina 2M e incubar por 16 a 24 horas antes de cosechar las células.
- Cosechar las células por centrifugación a 3000 g por 10 min a 17°C.
- Lavar las células con 10 mL de glicerol al 10% frío.
- Centrifugar a 3000 g por 10 min a 17°C.
- Lavar las células con 10 mL de glicerol al 10% frío.
- Resuspender las células en 1 mL de glicerol al 10% frío.
- Adicionar 0.5 a 5 µg de ADN libre de sales en no más de 5 µl de volumen a 0.2 mL de suspensión de las células competentes.
- Transferir la solución anterior a una cubeta de electroporación (0.2 cm electrode gap electroporation cuvette, BTX).

- Ubicar la cubeta en la cámara de electroporación y someterla a un pulso de 2.5 kV, 25 μ F, con la resistencia pulso-controlador a 1000 ohms. Los tiempos constantes de pulso óptimo son 15 a 25 ms.
- Recuperar la suspensión celular inmediatamente dentro de 5 mL de medio 7H9 enriquecido (sin antibiótico).
- Incubar a 37°C por 16 horas. NOTA: Este paso permite la expresión de cualquier gen de resistencia a un antibiótico determinado contenido en el ADN.
- Cosechar las células por centrifugación a 3000 g por 10 min a 17°C.
- Agregar 1000 μ l de medio 7H9 enriquecido, homogenizar por pipeteo.
- Preparar diluciones para el conteo de colonias (Ejemplo 1:10 y 1:100).
- Plaquear 1- 50 μ l de cada una de las diluciones en agar 7H10 enriquecido con kanamicina (25 μ g/mL) e incubar las placas a 37°C hasta que las colonias comiencen a ser visibles (aproximadamente 3 semanas).

Anexo 2: Extracción de ADN de *M. tuberculosis* con el método de proteinasa K

- Preparar crioviales estériles, cada uno con 3 perlas de vidrio y 500µl de buffer TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 8).
- A partir de un cultivo sólido puro, tomar una asada y resuspender las micobacterias en el vial exclusivamente haciendo uso del asa. No utilizar el vórtex.
- Con ayuda del termo-block, someter a 80°C por 20 min.
- Agregar 50 µl de Lisozima (10 mg/ml). Homogeneizar con ayuda del vortex. Incubar a 37°C toda la noche.
- Agregar 75µl de SDS 10% y 20 µl de Proteinasa K (20mg/ml). Homogeneizar con ayuda del vortex e incubar 3 horas a 65°C. (Incubar a 56°C x 2 horas)
- Agregar 100 µl de NaCl 5M.
- Agregar 100 µl de CTAB/NaCl (precalentado a 65°C). Homogeneizar con ayuda del vortex e incubar 10 min a 65°C.
- Agregar 750 µl de la mezcla Fenol-Cloroformo-Isoamílico (25:24:1). Homogeneizar con ayuda del vortex y centrifugar a 10000 rpm por 5 min y a 4°C.
- Colectar el sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo.
- Agregar 750 µl de la mezcla Cloroformo-Isoamílico (24:1). Homogeneizar con ayuda del vortex y centrifugar a 10000 rpm por 5 min y a 4°C.
- Colectar el sobrenadante y transferir a un nuevo tubo.

- Agregar 1ml de Etanol frío. Homogeneizar por inversión y someter a -70°C por 15 min
- Centrifugar a 10000 rpm por 8 min.
- Descartar el sobrenadante.
- Agregar 1ml de alcohol frío 70° .
- Centrifugar a 10000 rpm por 3 min. (Lavado)
- Descartar el sobrenadante y secar el pellet.
- Resuspender el DNA en 100 μl de TE.

Anexo 3: Escalas de Mc. Farland

Sol A.	BaCl ₂	1.75g
	H ₂ O _d	100ml
Sol B.	H ₂ SO ₄	1ml
	H ₂ O _d	99ml

- La escala Mc. Farland se elabora tras mezclar diferentes volúmenes de las soluciones A y B. Por ejemplo:
 - Se recomienda agregar suavemente la solución A por las paredes del tubo y agitar durante 3 a 5 min. Almacenar a Temperatura ambiente hasta por tres meses, protegido de la luz. Mezclar antes de usar.
 - Preparar la escala con los mismos tubos que se utilizarán en los ensayos. Usar tubos diferentes es factor de inexactitud.

Estándar Mc. Farland	Sol A.	Sol B.
0.5	0.5ml	99.5 ml
1	1 ml	99 ml
2	2 ml	98 ml
3	3 ml	97 ml

Anexo 4: Preparación de suspensiones de Micobacterias

- Tomar una o dos asadas de un cultivo sólido de *M. tuberculosis* con no más de 4 semanas de incubación, e inocular en un tubo de vidrio o plástico con 5 o 7 perlas de vidrio y 100 µl de la solución Tween 10%
- Disgregar con ayuda del asa de siembra y luego del vortex durante 2 min.
 - Vortexear por 30 segundos resulta ser suficiente la mayoría de las veces.
 - Dejar reposar por al menos 5 min para evitar la liberación de aerosoles.
- Agregar 3 ml de SST. Homogeneizar con ayuda del vortex durante 20 segundos adicionales. Dejar reposar por 15 min.
 - El reposo es importante para sedimentar los restos de cordones y conglomerados de micobacterias. El objetivo es tener micobacterias individuales en suspensión.
- Transferir el sobrenadante a un tubo de vidrio con 4 ml de SST y sin perlas. Ajustar la turbidez a Mc.Farland haciendo uso de SST como diluyente.
 - Recomendable agregar de a pocos la suspensión de micobacterias del paso anterior ya que diluir una suspensión más cargada es operativamente más complicado.
 - La escala visual funciona bien. Sin embargo, es recomendable utilizar un densitómetro: Otorga exactitud y reproducibilidad a los resultados interensayo.

Anexo 5: Estadística del Crecimiento Bacteriano

Los datos de crecimiento bacteriano expresado en unidades de densidad óptica a una longitud de onda de 600nm (OD600) por unidad de tiempo se ajustaron a un modelo de regresión exponencial. Para la elaboración del modelo, se tomaron en cuenta los datos de crecimiento a partir del día 4. Para cada grupo de bacterias se calculó el coeficiente de regresión (R^2) y la función exponencial $y = a \cdot e^{bx}$. Donde:

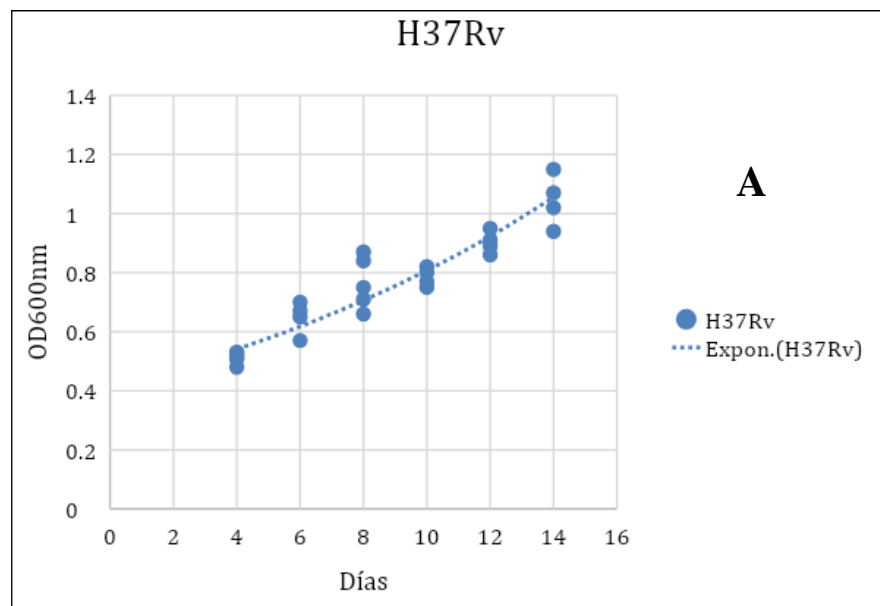
y = OD600 medida en un determinado tiempo

a = OD600 medida en el tiempo cero (x=4)

e = Contante (2.71828)

b = Tasa de crecimiento bacteriano por unidad de tiempo

x = Tiempo medido en días



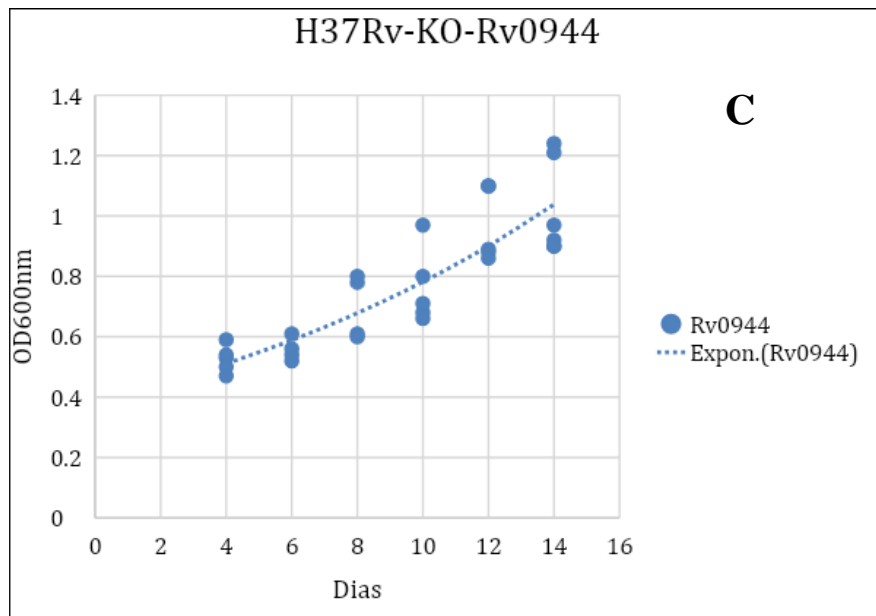
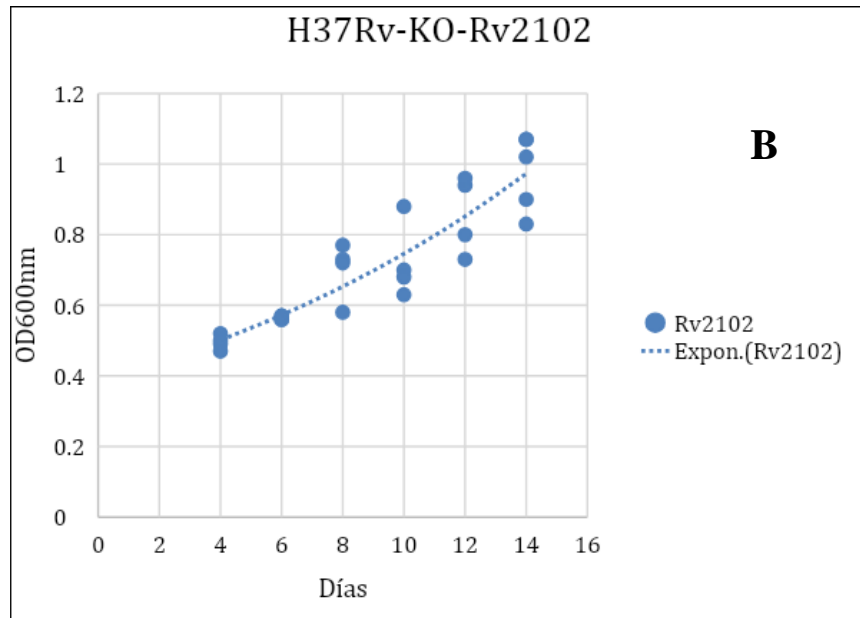


Figura S1: Gráfico de dispersión de crecimiento bacteriano (OD600) Vs. Tiempo. A. Crecimiento Bacteriano de la cepa H37Rv wild type. B. Crecimiento Bacteriano de la cepa H37Rv-KO-Rv2102. C. Crecimiento Bacteriano de la cepa H37Rv-KO-Rv0944. Para cada grupo, los datos de

densidad óptica por el tiempo fueron ajustados a un modelo de regresión exponencial (R^2). Se muestran en los gráficos la función exponencial $y = a \cdot e^{bx}$ para cada grupo de bacterias.

Las funciones de regresión exponencial de cada grupo bacteriano se transformaron a una regresión lineal mediante la aplicación del logaritmo natural a la ecuación. Donde la tasa de crecimiento, es decir “b”, ahora corresponde a la pendiente de la ecuación lineal.

$$y = a \cdot e^{bx}$$

$$\ln y = bx + \ln a$$

$\ln y$ = Logaritmo natural (OD600 medida en un determinado tiempo)

$\ln a$ = Logaritmo natural (OD600_{x=4})

b = Tasa de crecimiento bacteriano por unidad de tiempo

x = Tiempo en días

1. Descripción de variables

Variable dependiente = $\ln(\text{OD600})$

- Tipo de variable: Cuantitativa, continua
- Escala de medición: Intervalo

Variable independiente 1 = Tiempo en días

- Tipo de variable: Cuantitativa, discreta

- Escala de medición: De razón

Variable independiente 2 = Tipo de cepa (Wild type y KO)

- Tipo de variable: Cualitativa, dicotómica
- Escala de medición: Nominal

Se categorizo de la siguiente manera:

$$\text{Cepa Wild type} = 0$$

$$\text{Cepa KO} = 1$$

2. Construcción de la regresión lineal múltiple

Para insertar a la ecuación la variable tipo de cepa, se creó una regresión lineal múltiple, insertando a la ecuación el término de interacción “R”

$$R = d * x$$

Donde:

R= Término de interacción entre d, t

x= Tiempo en días

d= Tipo de cepa (Cepa wild type=0, Cepa KO= 1)

Por lo tanto:

$$y = bx + a$$

$$y = bx + \alpha (d * x) + a$$

$$y = (b + \alpha * d) x + a$$

Donde:

$\ln y$ = Logaritmo natural (OD600 medida en un determinado tiempo)

x = Tiempo en días

b = Tasa de crecimiento bacteriano por unidad de tiempo (pendiente)

α = Factor de cambio de la pendiente, al comparar la cepa WT con la cepa KO

d = Tipo de cepa (Cepa wild type=0, Cepa KO= 1)

$\ln a$ = Logaritmo natural (OD600_{x=4})

$$d = 0 \text{ (Cepa wild type)} \rightarrow \text{pendiente} = b$$

$$d = 1 \text{ (Cepa KO)} \rightarrow \text{pendiente} = b + \alpha$$

3. Formulación de Hipótesis estadística

Hipótesis Nula (H₀):

α "alfa" es igual a cero

Hipótesis Alternativa (H_a):

α "alfa" es diferente de cero

4. Nivel de significancia: $\alpha=0.05$

5. Prueba Estadística: Prueba T

La prueba busca evaluar la significancia de "alfa". Si "alfa" no es significativamente diferente de cero (P-value >0.05), entonces no hay diferencia detectada entre las dos tasas de crecimiento (entre la cepa KO y

la cepa WT). Si “alfa” es significativamente distinto de cero, entonces se puede afirmar que existe una diferencia significativa entre las tasas de crecimiento entre la cepa KO y la cepa WT

6. Resultados

6.1. Regresión múltiple construida a partir de los datos de crecimiento bacteriano entre la cepa wild type H37Rv y la cepa H37Rv-KO-Rv0944

```
. regress Ln t dt
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	56
Model	3.27855297	2	1.63927649	F(2, 53)	=	140.68
Residual	.617570502	53	.011652274	Prob > F	=	0.0000
Total	3.89612347	55	.070838609	R-squared	=	0.8415
				Adj R-squared	=	0.8355
				Root MSE	=	.10795

Ln	Coefficient	Std. err.	t	P> t	[95% conf. interval]
t	.0704744	.0045451	15.51	0.000	.061358 .0795908
dt	-.0029886	.003022	-0.99	0.327	-.00905 .0030728
_cons	-.919137	.0395422	-23.24	0.000	-.9984485 -.8398255

La variación en la tasa de crecimiento bacteriano entre la cepa wild type y la cepa H37Rv-KO Rv0944 es por -0.0029886, siendo “alfa” no significativa (p=0.327). Por lo tanto, la tasa de crecimiento bacteriano entre la cepa H37Rv WT y la cepa H37Rv-KO Rv0944 es la misma.

6.2. Regresión múltiple construida a partir de los datos de crecimiento bacteriano entre la cepa wild type H37Rv y la cepa H37Rv-KO-Rv2102

```
. regress lnod1 t1 dt
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	53
Model	3.1753246	2	1.5876623	F(2, 50)	=	125.23
Residual	.633886197	50	.012677724	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.8336
				Adj R-squared	=	0.8269
Total	3.80921079	52	.073254054	Root MSE	=	.1126

lnod1	Coefficient	Std. err.	t	P> t	[95% conf. interval]
t1	.0723203	.0048444	14.93	0.000	.06259 .0820507
dt	-.0052603	.0032237	-1.63	0.109	-.0117353 .0012147
_cons	-.9375964	.0424312	-22.10	0.000	-1.022822 -.8523709

La variación en la tasa de crecimiento bacteriano entre la cepa wild type y la cepa H37Rv-KO Rv2102 es por -0.0052603, siendo “alfa” no significativa (p=0.109). Por lo tanto, la tasa de crecimiento bacteriano entre la cepa H37Rv WT y la cepa H37Rv-KO Rv2102 es la misma.

Anexo 6: Estadística de la tasa de eflujo de POA

Se creó una ecuación lineal múltiple donde la cantidad de POA producido por la bacteria, va a depender del tiempo de incubación con la droga PZA y el tipo de cepa utilizada.

1. Descripción de Variables

Variable dependiente= Producción de POA (mM)

- Tipo de variable: Cuantitativa, continua
- Escala de medición: De razón

Variable independiente 1 = Tiempo de incubación con la droga PZA (días)

- Tipo de variable: Cuantitativa, discreta
- Escala de medición: De razón

Variable independiente 2 = Tipo de cepa (Wild type y KO)

- Tipo de variable: Cualitativa, dicotómica
- Escala de medición: Nominal

Se categorizo de la siguiente manera:

Cepa Wild type = 0

Cepa KO = 1

La producción de POA en la cepa de referencia wild type (H37Rv) va a depender de la siguiente ecuación:

$$Y = m * t + b$$

Donde:

Y = mM POA producido

t = Tiempo de incubación con PZA

m = Tasa de cambio del eflujo de POA por unidad de tiempo (pendiente)

b = Intercepción con el eje Y (mM POA producido en el tiempo cero)

2. Construcción de la regresión lineal múltiple

Se creó el término de interacción “ R ” para introducir la segunda variable independiente en la ecuación “ d ”.

$$R = d * t$$

Donde:

R = Término de interacción entre d , t

t = Tiempo de incubación con PZA

d = Tipo de cepa (Cepa wild type=0, Cepa KO= 1)

Por lo tanto:

$$Y = mt + \alpha R + b$$

$$Y = mt + \alpha (d * t) + b$$

$$Y = (m + \alpha * d) t + b$$

Donde:

Y = mM POA producido

t = Tiempo de incubación con PZA

m = Tasa de eflujo de POA por unidad de tiempo (pendiente)

α = Factor de cambio de la pendiente, al comparar la cepa WT con la cepa KO

d = Tipo de cepa (Cepa wild type=0, Cepa KO= 1)

b = Intercepto con el eje Y

$$d = 0 \text{ (Cepa wild type)} \rightarrow \text{pendiente} = m$$

$$d = 1 \text{ (Cepa KO)} \rightarrow \text{pendiente} = m + \alpha$$

3. Formulación de Hipótesis estadística

Hipótesis Nula (H₀):

α "alfa" es igual a cero

Hipótesis Alternativa (H_a):

α "alfa" es diferente de cero

4. Nivel de significancia: $\alpha=0.05$

5. Prueba Estadística: Prueba T

La prueba busca evaluar la significancia de "alfa". Si alfa no es significativamente diferente de cero (P-value >0.05), entonces no hay diferencia detectada entre las dos tasa de eflujo de POA (entre la cepa KO y la cepa WT). Si alfa es significativamente distinto de cero, entonces se

puede afirmar que existe una diferencia significativa entre las tasas de eflujo de POA entre la cepa KO y la cepa WT

6. Resultados

6.1. Regresión múltiple construida a partir de los datos de la cepa wild type H37Rv y la cepa H37Rv-KO-Rv0944

```
. regress poa t dt
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	40
Model	201.793989	2	100.896995	F(2, 37)	=	250.73
Residual	14.8892844	37	.402413092	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.9313
				Adj R-squared	=	0.9276
Total	216.683274	39	5.55598138	Root MSE	=	.63436

poa	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
t	.6833108	.0329024	20.77	0.000	.6166442 .7499774
dt	-.0675	.0305207	-2.21	0.033	-.1293408 -.0056592
_cons	-.4242905	.1915897	-2.21	0.033	-.8124881 -.036093

La variación en la tasa de cambio en el eflujo de POA entre la cepa wild type y la cepa H37Rv-KO Rv0944 es por -0.0675, siendo esta significativa (p=0.033). Por lo tanto la velocidad de eflujo de POA de la cepa H37Rv WT es 0.0675 mM POA/min mayor que la correspondiente a la cepa H37Rv-KO-Rv0944.

6.2. Regresión múltiple construida a partir de los datos de la cepa wild type H37Rv y la cepa H37Rv-KO-Rv2102

```
. regress poa t dt
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	40
Model	177.529764	2	88.7648822	F(2, 37)	=	277.28
Residual	11.8445828	37	.32012386	Prob > F	=	0.0000
Total	189.374347	39	4.85575249	R-squared	=	0.9375
				Adj R-squared	=	0.9341
				Root MSE	=	.56579

poa	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
t	.6724018	.0293461	22.91	0.000	.6129409 .7318626
dt	-.1581481	.0272218	-5.81	0.000	-.2133048 -.1029915
_cons	-.3401351	.1708815	-1.99	0.054	-.6863739 .0061037

La variación en la tasa de cambio en el eflujo de POA entre la cepa Wild Type y la cepa H37Rv-KO Rv2102 es por -0.1581, siendo esta diferencia significativa ($p=0.000$). Por lo tanto la velocidad de eflujo de POA de la cepa H37Rv WT es 0.15 mM POA/min mayor que la correspondiente a la cepa H37Rv-KO-Rv2102.

Anexo 6: Esquema del constructo para la cepa recombinante H37Rv-KO-Rv0944

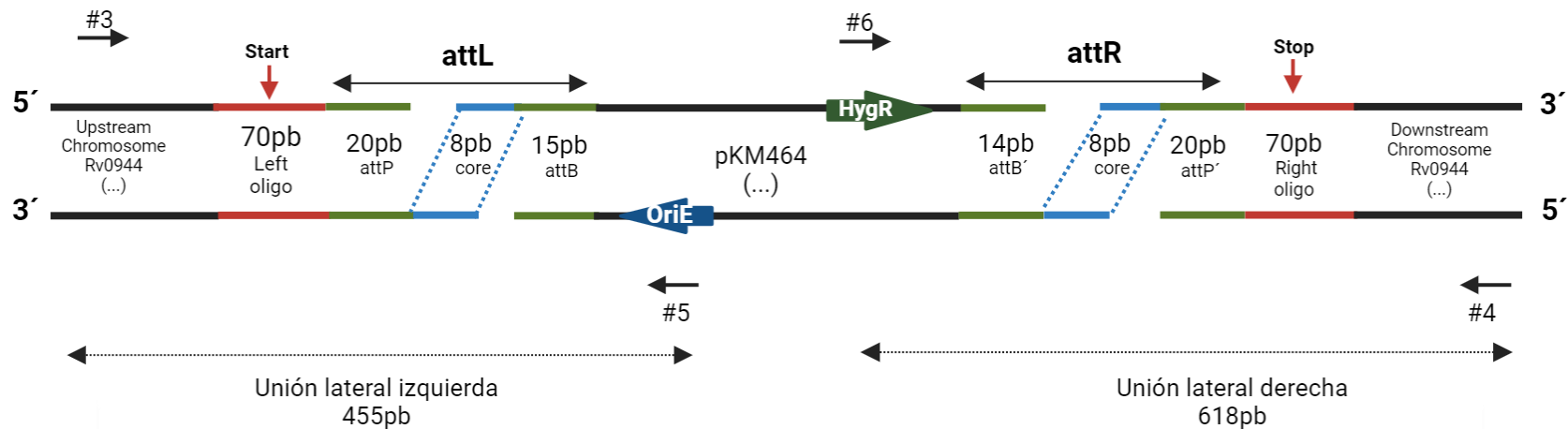


Figura S2: Constructo de la cepa recombinante H37Rv-KO-Rv0944. La figura muestra en detalle la estructura y dimensiones de las uniones laterales izquierda y derecha que se generaron como resultado de los eventos de recombinación. Estas uniones están compuestas por segmentos del cromosoma upstream/downstream, la secuencia del oligonucleótido izquierda/derecha, las secuencias attL/attR y parte de la secuencia del plásmido pKM464. Las secuencias del oligonucleótido izquierda y derecha van a contener los 10 primeros y últimos codones del gen Rv0944, incluyendo el codón de inicio y de parada, respectivamente (flechas rojas). La cepa recombinante H37Rv-KO-Rv0944 carece de todos los codones que forman la parte interna del gen Rv0944.

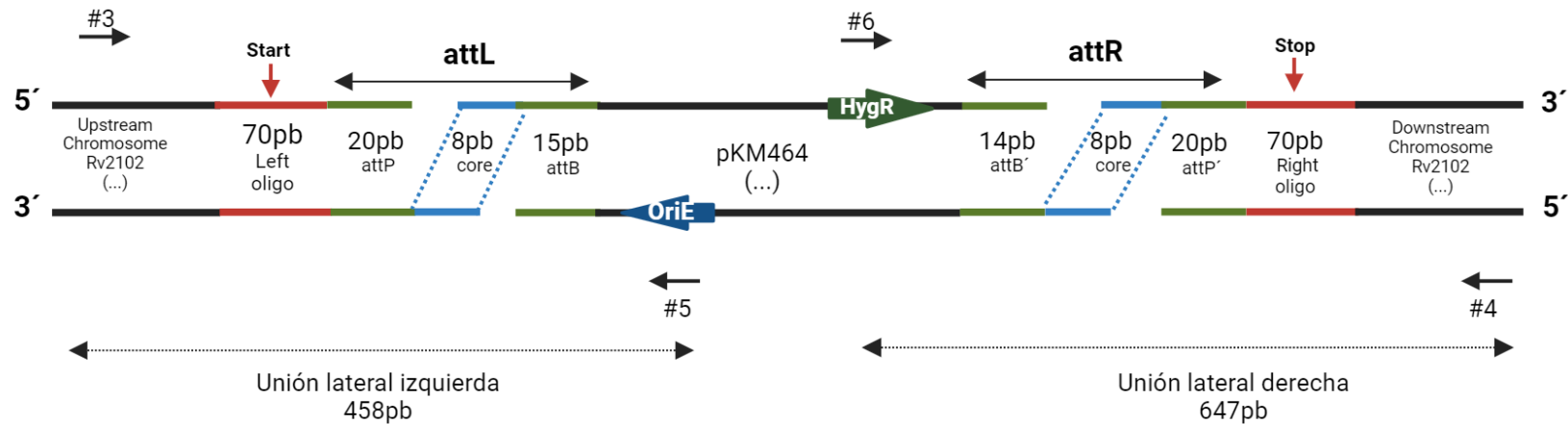


Figura S3: Constructo de la cepa recombinante H37Rv-KO-Rv2102. La figura muestra en detalle la estructura y dimensiones de las uniones laterales izquierda y derecha que se generaron como resultado de los eventos de recombinación. Estas uniones están compuestas por segmentos del cromosoma upstream/downstream, la secuencia del oligonucleótido izquierda/derecha, las secuencias attL/attR y parte de la secuencia del plásmido pKM464. Las secuencias del oligonucleótido izquierda y derecha van a contener los 10 primeros y últimos codones del gen Rv2102, incluyendo el codón de inicio y de parada, respectivamente (fechas rojas). La cepa recombinante H37Rv-KO-Rv2102 carece de todos los codones que forman la parte interna del gen Rv2102.