



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA
TÉCNICA DE COMPLEMENTACIÓN
DEL GEN *pncA* EN *Mycobacterium
tuberculosis pncA-knockout*:
HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO
DE LA RELACIÓN ENTRE
MUTACIONES EN *pncA* Y
PARÁMETROS FENOTÍPICOS**

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

YUDITH CAUNA OROCOLLO

LIMA - PERÚ

2019

Asesor de tesis

PhD. Mirko Zimic Peralta

DEDICATORIA

Este estudio de investigación va dedicado principalmente a mis padres, Lourdes Orocollo Toque y Aquilino Cauna Ticona, porque son mi motivo, y por su infinito cariño, comprensión y confianza.

A mis hermanas Ruth Iraides, Luz Clarita y a mi tía Sonia por su apoyo fraternal, y por los momentos de alegría.

... y a mi abuelita Rosa, por su ternura y muy buenos deseos.

¡Los quiero muchísimo!

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, porque desde mis primeros pasos como estudiante, me apoyaron incondicionalmente, siempre enseñándome que con perseverancia y mucho esfuerzo se pueden lograr metas que parecen inalcanzables.

Agradezco inmensamente a los doctores Mirko Zimic, Patricia Sheen, Manuela Verástegui y Roxana Medina porque me abrieron las puertas para lograr este objetivo, y por sus grandes consejos para ser mejor profesional y personalmente. Son mi patrón a seguir.

A los miembros del jurado por su apoyo, disposición y colaboración en el manuscrito de este trabajo de investigación.

Al programa de becas otorgado por el Centro Internacional Fogarty por haberme brindado la oportunidad de enriquecerme académica y laboralmente.

A Danitza Dávila, Edith Málaga y Nancy Chile porque me enseñaron diversas pautas académicas y, ante todo, porque siempre estuvieron en los momentos más difíciles, y desde mi llegada hicieron más amena mi estadía.

A Stefany Quiñones, Emily Toscano, Janina Campos, y Celinda Solano por su invaluable amistad, y a todo el grupo de Bioinformática y Biología Molecular por sus críticas constructivas.

¡Muchas gracias!

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

El presente estudio fue financiado a través de los fondos recibidos por los proyectos “Translational Research Development for Endemic Infectious Diseases of Amazonia” Grant number: 2D43TW007120-11A1, como parte de la beca Fogarty, y “Unravelling the resistance mechanism of pyrazinamide, the unique sterilizing drug against tuberculosis” WELLCOME Trust.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	5
2.1. Planteamiento del problema	5
2.2. Marco teórico	6
2.2.1. Biología de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2.2.2. Tuberculosis	6
2.2.3. Epidemiología de la Tuberculosis	7
2.2.4. Patología de la Tuberculosis	8
2.2.5. Tratamiento de la Tuberculosis	9
2.2.5.1. Pirazinamida (PZA)	10
2.2.5.2. Mecanismo de acción de PZA	10
2.2.6. Nicotinamidasa/Pirazinamidasa	12
2.2.7. Mecanismos de resistencia a PZA	13
2.2.8. Herramientas de modificación genética para <i>M. tuberculosis</i>	14
2.2.8.1. Vectores episomales o extracromosomales	14
2.2.8.2. Vectores integrativos	16
III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	18

5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos específicos	18
VI. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	19
6.1. Tipo de estudio	19
6.2. Diseño de estudio	19
6.3. Área de estudio	20
6.4. Material biológico	20
6.5. Procedimiento experimental	22
6.5.1. Complementación del gen <i>pncA</i> en <i>M. tuberculosis pncA-knockout</i>	22
6.5.1.1. Verificación del noqueo del gen <i>pncA</i> en <i>M. tuberculosis pncA-KO</i>	22
6.5.1.2. Clonamiento de los genes <i>pncA</i> wild type y mutantes	24
6.5.1.3. Transformación de <i>M. tuberculosis pncA-KO</i> con pNIT- <i>pncA</i> y pNIT- <i>eGFP</i>	26
6.5.2. Verificación de la complementación del gen <i>pncA</i> en <i>M. tuberculosis pncA-KO</i>	27
6.5.2.1. Transformación de <i>E. coli</i> con sobrenadante de lisado de <i>M. tuberculosis pNIT-pncA</i>	27
6.5.2.2. Secuenciación del plásmido pNIT- <i>pncA</i> post-transformación de <i>M. tuberculosis pncA-KO</i>	27

6.5.2.3. Inmunodetección de PZAsa de <i>M. tuberculosis pncA</i> WT complementada	28
6.5.2.4. Verificación de la estabilidad intracelular de pNIT- <i>pncA</i> en cepas <i>pncA</i> complementadas	30
6.5.3. Medición de parámetros fenotípicos de las cepas <i>pncA</i> complementadas y aislados clínicos	30
6.5.3.1. Cultivo de aislados clínicos	30
6.5.3.2. Secuenciación de genes <i>pncA</i> de aislados clínicos	31
6.5.3.3. Determinación de los niveles de expresión de los genes <i>pncA</i> de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> complementadas y de aislados clínicos	31
6.5.3.3.1. Extracción de ARN de <i>M. tuberculosis</i>	31
6.5.3.3.2. Retrotranscripción y PCR cuantitativo (RT-qPCR)	33
6.5.3.4. Medición de la cantidad de POA producido por las cepas de <i>M.</i> <i>tuberculosis pncA</i> complementadas y de aislados clínicos	35
6.5.3.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de PZA en cepas de <i>M. tuberculosis pncA</i> complementadas y de aislados clínicos	36
6.5.3.6. Análisis estadístico	37
VII. RESULTADOS	38
7.1. Complementación del gen <i>pncA</i> en <i>M. tuberculosis pncA-knockout</i>	38
7.1.1. Verificación de la ausencia de actividad PZAsa en <i>M. tuberculosis</i> <i>pncA-KO</i>	38
7.1.1.1. Prueba de Wayne convencional	38
7.1.1.2. Amplificación del gen <i>pncA</i>	38

7.1.1.3.	Obtención de plásmidos pNIT- <i>pncA</i>	41
7.1.1.4.	Obtención de <i>M. tuberculosis pncA</i> complementadas	43
7.2.	Verificación de la complementación del gen <i>pncA</i> en <i>M. tuberculosis</i>	
	<i>pncA-knockout</i>	46
7.2.1.	Transformación de <i>E. coli</i> con sobrenadante de lisado de <i>M. tuberculosis</i> pNIT- <i>pncA</i> y pNIT- <i>eGFP</i>	46
7.2.2.	Secuenciación de pNIT- <i>pncA</i> post-transformación de <i>M. tuberculosis pncA-knockout</i>	47
7.2.3.	Detección de POA producido por la cepa <i>pncA</i> WT complementada	47
7.2.4.	Medición de los niveles de expresión del gen <i>pncA</i> de H37Rv, <i>pncA-KO</i> y cepas pNIT- <i>pncA</i> y pNIT- <i>eGFP</i>	51
7.2.4.1.	Integridad de ARN total	51
7.2.4.2.	Eficiencia de amplificación de los genes <i>pncA</i> y 16S	52
7.2.5.	Inmunodetección de PZAsa	57
7.2.6.	Verificación de la estabilidad intracelular de pNIT- <i>pncA</i> en las cepas complementadas	58
7.3.	Medición de parámetros fenotípicos de las cepas <i>pncA</i> complementadas y aislados clínicos	58
7.3.1.	Determinación de los niveles de expresión de los genes <i>pncA</i> en <i>M. tuberculosis</i> complementadas y en aislados clínicos	58
7.3.2.	Medición de la cantidad de POA producido por las PZAsas de <i>M. tuberculosis pncA</i> complementadas y de aislados clínicos	62

7.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de PZA en <i>M. tuberculosis pncA</i> complementadas y en aislados clínicos	67
7.4. Relación entre mutaciones en el gen <i>pncA</i> y parámetros fenotípicos de las cepas complementadas y de los aislados clínicos	70
7.4.1. Asociación entre constante catalítica de PZAsas recombinantes y cantidad de POA producido por cepas complementadas	73
VIII. DISCUSIÓN	75
IX. CONCLUSIONES	83
X. RECOMENDACIONES	83
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas empleadas para el presente estudio y sus características.	21
Tabla 2. Eficiencia de transformación de cepas complementadas con genes <i>pncA</i> WT y mutantes.	45
Tabla 3. Cantidad de POA producido por las cepas H37Rv, <i>pncA</i> -KO y cepas <i>pNIT-pncA/eGFP</i> .	50
Tabla 4. Parámetros de las curvas estándar para la determinación de eficiencia de qPCR.	53
Tabla 5. Parámetros de niveles de expresión de los genes <i>pncA</i> y <i>16S</i>	56
Tabla 6. Parámetros de expresión de los genes <i>pncA</i> de aislados clínicos y de cepas complementadas.	61
Tabla 7. Cuantificación de POA producido por aislados clínicos y cepas complementadas con genes <i>pncA</i> WT y mutantes inducidas y no inducidas.	66
Tabla 8. Parámetros de susceptibilidad a PZA en aislados clínicos.	68
Tabla 9. Parámetros de susceptibilidad a PZA en cepas <i>pncA</i> complementadas no inducidas e inducidas	69
Tabla 10. Comparación entre parámetros fenotípicos de aislados clínicos y de cepas <i>pncA</i> complementadas.	72
Tabla 11. Correlación entre k_{cat} vs POA producido por cepas <i>pncA</i> complementadas y PZAsas recombinantes	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la patología de Tuberculosis.	9
Figura 2. Conversión de PZA a POA por la enzima PZAsa codificada en el gen <i>pncA</i> .	11
Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de acción de PZA en <i>M. tuberculosis</i> .	12
Figura 4. Mapa génico del plásmido episomal pNIT-1.	16
Figura 5. Prueba de Wayne convencional en medio sólido Dubos para cepas H37Rv, <i>pncA</i> -KO y pAIncA.	38
Figura 6. Corrida electroforética de ADN genómico de <i>M. tuberculosis pncA</i> -KO, H37Rv y pAIncA.	39
Figura 7. A. Corrida electroforética en gel de agarosa 0.8% de productos de amplificación de cepas H37Rv, <i>pncA</i> -KO, y pAIncA. B. Mapa de restricción para la generación de la cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>pncA</i> -KO	40
Figura 8. Corrida electroforética en gel de agarosa 2% de productos de amplificación de cepas H37Rv, <i>pncA</i> -KO, y pAIncA.	41
Figura 9. Corrida electroforética de productos de PCR amplificados con primers de clonamiento en gel de agarosa 0.8%.	42
Figura 10. Corrida electroforética de plásmido pNIT simple y doble digerido en gel de agarosa al 0.8%.	42
Figura 11. Corrida electroforética de plásmidos pNIT recombinantes en gel de agarosa al 0.8%.	43
Figura 12. Selección de colonias transformantes mediante cultivo en medio sólido 7H10 con antibióticos de selección (kanamicina e higromicina).	44

Figura 13. Colonias aisladas para conteo y cálculo de eficiencia de transformación.	45
Figura 14. Verificación de presencia de plásmidos pNIT recombinantes en sobrenadante de lisado de cepas de <i>M. tuberculosis</i> transformantes mediante transformación de <i>E. coli</i> Novablue.	46
Figura 15. Curva estándar de POA en buffer citrato pH 7.0.	48
Figura 16. Detección de POA producido por H37Rv y <i>pncA</i> -KO, cepa <i>pncA</i> WT complementada y cepa pNIT- <i>eGFP</i> mediante la prueba de Wayne en buffer citrato pH 7.0.	50
Figura 17. Corrida electroforética de ARN total extraído de <i>M. tuberculosis</i> cepas <i>pncA</i> complementadas y de aislados clínicos.	52
Figura 18. Curva estándar para cálculo de eficiencia de amplificación de <i>pncA</i> .	53
Figura 19. Curva estándar para cálculo de eficiencia de amplificación de 16S.	54
Figura 20. Inmunodetección de PZAsa por Western Blot.	57
Figura 25. Distribución de los niveles de expresión del gen <i>pncA</i> de los aislados clínicos y de las cepas complementadas en condiciones no inducida e inducida.	60
Figura 22. Detección de POA producido por cepas complementadas, H37Rv y <i>pncA</i> -KO mediante la prueba de Wayne en buffer citrato pH 7.0.	63
Figura 23. Prueba de Wayne en buffer citrato a pH 7.0 (A) y en medio sólido Dubos (B) para la detección de POA en aislados clínicos.	64
Figura 24. Distribución de los niveles de producción de POA de aislados clínicos y de cepas complementadas con genes <i>pncA</i> WT y mutantes.	65

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Flujograma de trabajo para la evaluación en cepas *M. tuberculosis* *pncA* KO transformadas con pNIT-*pncA* y pNIT-*eGFP* y en aislados clínicos. 20

LISTA DE ABREVIATURAS

TB: tuberculosis

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

H37Rv: *M. tuberculosis* cepa H37Rv

PZA: pirazinamida

POA: ácido pirazinoico (siglas en inglés)

HPOA: ácido pirazinoico protonado (siglas en inglés)

PZAsa: pirazinamidasa

pncA::hyg: delección en el gen *pncA* por inserción del cassette de higromicina

pncA-KO: cepa de *M. tuberculosis* H37Rv *pncA-knockout*

pAIncA: cepa de *M. tuberculosis pncA-knockout* complementada con gen *pncA*

WT por recombinación homóloga (*[pncA::hyg]::pAIncA*)

MDR: multidrogo-resistente

WT: cepa wild tipe (en español: tipo silvestre)

M. bovis: *Mycobacterium bovis*

M. smegmatis: *Mycobacterium smegmatis*

M. avium: *Mycobacterium avium*

E. coli: *Escherichia coli*

ATP: adenosina trifosfato

EE. UU.: Estados Unidos de América

pH: potencial de hidrógeno

RH: recombinación homóloga

PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa (siglas en inglés)

qPCR: Reacción en Cadena de Polimerasa cuantitativo

RT-qPCR: Retrotranscripción y qPCR

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

OADC: suplemento de Ácido Oleico, Dextrosa y Catalasa (siglas en inglés)

OD₆₀₀: densidad óptica a 600 nm (en inglés: optical density)

IVN: isovaleronitrilo

DMSO: dimetil sulfóxido

A_{260/280}: ratio de absorbancia a 260 nm y 280 nm

A_{260/230}: ratio de absorbancia a 260 nm y 280 nm

A₄₅₀: absorbancia a 450 nm

pNIT-1: sistema de expresión con promotor del gen nitrilasa

pNIT-*pncA*: plásmido pNIT recombinante con insertos de genes *pncA* WT o mutantes

D49N: designación de PZAsa con mutación puntual en el aminoácido D49 por N.

H51R: designación de PZAsa con mutación puntual en el aminoácido H51 por R.

G78C: designación de PZAsa con mutación puntual en el aminoácido G78 por C.

F94L: designación de PZAsa con mutación puntual en el aminoácido F94 por L.

RESUMEN

Mutaciones en el gen *pncA* son la mayor causa de resistencia a pirazinamida (PZA), pero existen mecanismos alternativos que también aportan resistencia. El objetivo del estudio fue estandarizar la técnica de complementación del gen *pncA* en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *pncA*-KO para evaluar el efecto de las mutaciones en el gen *pncA* sobre parámetros fenotípicos, en un escenario controlado por la variabilidad genética de los aislados clínicos de donde provienen los genes *pncA* mutantes.

Se generaron cepas complementadas con genes *pncA* WT y mutantes D49N, H51R, G78C y F94L a través del sistema de expresión pNIT-1 para evaluar la actividad PZAsa mediante la prueba de Wayne cuantitativa, nivel de expresión del gen *pncA* y susceptibilidad a PZA usando concentraciones graduales de PZA en condiciones no inducida e inducida.

El sistema de expresión pNIT-*pncA* restauró el fenotipo de la cepa *pncA*-KO y los plásmidos se mantuvieron estables intracelularmente durante el período de observación que duró 18 semanas. Los niveles de expresión basal resultaron constantes y similares al de la cepa H37Rv. La cepa *pncA* WT complementada mostró actividad PZAsa y Concentración Mínima Inhibitoria de PZA similar al de la cepa H37Rv. Sin embargo, las cepas *pncA* mutantes complementadas fueron resistentes a PZA en ambas condiciones y la sobreexpresión de los genes *pncA* mutantes permitió verificar la pérdida total o parcial de la actividad PZAsa.

Palabras clave: pNIT-*pncA*, complementación, mutación, expresión basal, sobreexpresión, actividad PZAsa, resistencia.

ABSTRACT

Mutations in the *pncA* gene are the major cause of resistance to pyrazinamide (PZA), but there are alternative mechanisms that also provide resistance. The objective of the study was to standardize the complementation technique of the *pncA* gene in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *pncA*-KO to evaluate the effect of *pncA* mutations on phenotypic parameters, in a scenario controlled by the genetic variability of the isolated clinical strains from which the *pncA* mutant genes come.

Strains supplemented with *pncA* WT and mutant genes D49N, H51R, G78C and F94L were generated through the pNIT-1 expression system to evaluate PZAsa activity by quantitative Wayne test, *pncA* gene expression level, and PZA susceptibility in the supplemented *pncA*-KO strain, using gradual PZA concentrations under different induction conditions.

The pNIT-*pncA* expression system restored the phenotype of the *pncA*-KO strain and the plasmids remained intracellularly stable during the 18-week observation period. Basal expression levels were constant and similar to that of strain H37Rv. The *pncA* WT supplemented strain showed PZAsa activity and Minimum Inhibitory Concentration of PZA similar to that of the H37Rv strain. However, the strains supplemented with mutant *pncA* were resistant to PZA in both conditions and the overexpression of the mutant *pncA* genes made it possible to verify the total or partial loss of PZAsa activity.

Key words: pNIT-*pncA*, mutation, complementation, basal expression, overexpression, PZAsa activity, resistance.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de tuberculosis (TB) es transmitida por la inhalación de gotículas resuspendidas en el ambiente, expulsadas por pacientes con TB, los cuales contienen a bacilos de *Mycobacterium tuberculosis*. (1). Los pacientes con TB pueden tener la enfermedad activa o infección latente (2), y, para contrarrestar esta enfermedad, el tratamiento consiste en una serie de drogas antituberculosas, entre ellas pirazinamida (PZA), siendo la única droga con alta efectividad contra micobacterias en estado de latencia y que es capaz de reducir el periodo de tratamiento de 12 a 6 meses (3–5). PZA es análoga estructuralmente a nicotinamida, el cual es un metabolito precursor de la vía de salvataje nicotinamida adenina dinucleótido, por ello, esta droga es hidrolizada por la enzima nicotinamidasa/pirazinamidasa de *M. tuberculosis*.

El mecanismo de acción de PZA se inicia cuando ésta ingresa al interior celular de *M. tuberculosis* por difusión pasiva, donde es hidrolizada a ácido pirazinoico (POA), forma activa de la droga, por la enzima nicotinamidasa/pirazinamidasa (PZAsa) codificada por el gen *pncA* de *M. tuberculosis*. POA sale al medio extracelular por transporte activo, donde el pH es ácido, y es protonado. POA en su forma protonada (HPOA) ingresa al interior celular en su forma protonada a través de un gradiente de potencial, donde se liberan los protones ocasionando un nivel de acidificación celular y alteración de la membrana, resultando letal para la bacteria (6,7).

El mecanismo de resistencia a PZA en *M. tuberculosis* no es conocido completamente. Sin embargo, se reconoce que la principal causa de resistencia a

PZA se debe a la alteración funcional de la enzima PZAsa ocasionada por mutaciones en la región codante así como en el promotor del gen *pncA* (8,9).

En diversos estudios se identificaron una serie de mutaciones puntuales en el gen *pncA* de aislados clínicos que tuvieron como consecuencia la disfunción enzimática de PZAsa y se observó que estos aislados tuvieron niveles variados de resistencia a PZA, y niveles variados de expresión de *pncA* (10–16). De manera específica, se han encontrado que factores como la eficiencia catalítica de PZAsa, tasa de eflujo de POA, la cual se modifica por la velocidad de hidrólisis de PZA, y el nivel de expresión de *pncA* influyen sobre el nivel de resistencia a PZA.

En uno de los estudios realizados por el grupo de investigación de Sheen (2009) generaron PZAsas mutantes obtenidas de aislados clínicos y las expresaron en *E. coli*, con lo cual se demostró que la eficiencia catalítica de estas PZAsas es correlacionada de manera significativa con el nivel de resistencia a PZA. Sin embargo, en dicho estudio se observó que sólo el 30% de la variabilidad de los niveles de resistencia a PZA fue explicado por la función enzimática de PZAsa (15). Este resultado respalda lo que actualmente se sospecha, sobre la existencia de múltiples blancos y mecanismos de acción/resistencia a PZA en *M. tuberculosis*, los cuales no se conocen hasta el momento. Actualmente, nuestro grupo viene investigando en potenciales proteínas asociadas a la resistencia a PZA, entre los cuales se incluyen bombas de eflujo, proteínas transportadoras de metales y metalochaperonas.

Además de los factores anteriormente mencionados, otros estudios reportaron mutaciones en genes codificadores de bombas de eflujo y proteínas transportadoras

de metales de aislados clínicos que han sido asociados con la resistencia a PZA (17,18), señalando que la variabilidad genética, no sólo en *pncA*, probablemente influya sobre los niveles variados de resistencia a PZA en los aislados clínicos. Consistentemente, Sheen *et al.* reportaron aislados clínicos que tuvieron genes *pncA* sin mutaciones pero que fueron resistentes a PZA (9), lo cual sugiere que evidentemente existen otros factores, distintos de las mutaciones en *pncA*, que afectan la susceptibilidad.

Los estudios anteriormente mencionados evaluaron la relación entre mutaciones en *pncA* y nivel de resistencia a PZA a partir de aislados clínicos de pacientes con TB, pero, para determinar el efecto directo de las mutaciones en el gen *pncA* sobre el nivel de resistencia a PZA se requiere de un ambiente celular que permita controlar la variabilidad genética de los aislados clínicos que podría estar potencialmente asociada de manera indirecta con la resistencia a PZA.

En el presente estudio, el ambiente genéticamente controlado corresponde a la cepa H37Rv que tiene el gen *pncA* noqueado (*pncA*-KO), en la cual se realizó la complementación de genes *pncA* wild type y mutantes mediante el sistema de expresión pNIT. Este sistema es un vector episomal multicopia, el cual posee un circuito regulatorio positivo que permite la expresión basal y sobreexpresión del gen de interés. Además, este vector no incorpora el gen de interés en el genoma micobacteriano por lo que no se realizan modificaciones en el genoma (19). Por otro lado, cabe mencionar que existen vectores integrativos que sí incorporan el gen de interés en el genoma de la bacteria mediante intercambio alélico y mutagénesis dirigida, sin embargo, a diferencia de los vectores episomales, estos no permiten la sobreexpresión del gen (20,21). Uno de los beneficios más importantes de un vector

episomal, como pNIT, es que facilita los estudios estructurales y bioquímicos de proteínas micobacterianas producidas en su mismo hospedero (19).

El sistema pNIT permitió evaluar el efecto de las mutaciones en el gen *pncA* que involucran al sitio de coordinación con metales (D49N y H51R), cercano (F94L) y distante (G78C) a este y al sitio activo sobre la susceptibilidad a PZA en la cepa H37Rv *pncA*-KO, controlando, así, la variabilidad genética de otros genes que podrían contribuir con la resistencia a PZA. Adicionalmente, los parámetros fenotípicos determinados de las cepas *pncA* complementadas fueron comparados con los parámetros de los aislados clínicos, en los cuales se identificaron las mutaciones en *pncA* anteriormente mencionadas.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Planteamiento del problema

La prevalencia de resistencia a PZA es muy elevada (66%) en pacientes multi-drogoresistentes (MDR) (1). Aproximadamente, el 75% de los casos de resistencia a PZA se deben a mutaciones en el gen *pncA* que dan como resultado el mal funcionamiento de la enzima PZAsa (12).

Se ha reportado que diversos aislados clínicos con mutaciones en el gen *pncA* mostraron actividad PZAsa parcial, por lo que se sospecha de una inapropiada tasa de expulsión de POA (un mecanismo alternativo atribuido a la alteración de las bombas de eflujo), u otros mecanismos que también podrían conferir resistencia a PZA (17,22). Asimismo, se reportaron diferentes niveles de resistencia a PZA y niveles de expresión variables del gen *pncA* (15).

Es claro entonces que para entender el efecto de las mutaciones en el gen *pncA* sobre la resistencia a PZA, es necesario tener un escenario controlado donde se pueda evaluar el efecto de las mutaciones en el gen *pncA* sin ningún otro factor de variabilidad genética y donde se mantenga niveles de expresión constantes. Para lograrlo, en este estudio se propuso el uso de un sistema de expresión que permita la complementación de genes *pncA* mutantes en una cepa H37Rv (cepa referencial) *pncA-knockout* para determinar la actividad PZAsa y susceptibilidad a PZA.

2.2.Marco teórico

2.2.1. Biología de *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis es un bacilo de lento crecimiento en condiciones *in vitro* (2 a 3 semanas). Se caracteriza por la estructura de su pared celular, que funciona como una barrera virulenta e impermeable a drogas (23), y es una bacteria aeróbica (24).

El tamaño de su genoma es de 4' 411 529 de pares de bases, con 4000 genes que tienen un alto contenido de guanina y citocina (25).

M. tuberculosis es la única especie del género *Mycobacterium* que es susceptible a PZA (55). En otras especies de *Mycobacterium*, *M. kansasii*, *M. canettii*, *M. smegmatis* y *M. bovis*, se presume la presencia de otros mecanismos que les confieren resistencia innata a PZA, como, mutaciones en posibles blancos de POA, sistema de eflujo deficiente, y mutaciones en el mismo gen *pncA* (27–29). Adicionalmente, se postula que la impermeabilidad relativa de la membrana celular podría ser un factor determinante en la susceptibilidad a PZA (29,30).

2.2.2. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad extremadamente compleja que afecta primariamente a los pulmones promoviendo la formación de granulomas ya que *M. tuberculosis* tiene la capacidad de evadir la respuesta inmunológica del hospedero (31), principalmente a los mecanismos antimicrobianos del macrófago (32).

La enfermedad se clasifica en dos estados:

1. Estado activo, donde el paciente tiene la enfermedad activa, con síntomas, y en las muestras de esputo se pueden observar microscópicamente a las micobacterias viables (31).
2. Estado latente, donde los síntomas no se presentan y las micobacterias permanecen en estado de dormancia que reducen su actividad metabólica y otros mecanismos (31).

2.2.3. Epidemiología de la Tuberculosis

En nuestro país y en países subdesarrollados, los pacientes con TB-MDR supera el 60% de los casos (33). En 2015, *M. tuberculosis* ocasionó cerca de 1.8 millones de casos mortales a nivel mundial y 10.4 millones de casos incidentes con TB, equivalente a 142 casos de 100 000 personas y 550 mil casos de TB-MDR (34). En 2016 se reportó la disminución de mortandad e incidencia en casos de TB en EE.UU. comparados al año 2015 (35). Sin embargo, la enfermedad aún se encuentra sujeta a vigilancia epidemiológica a nivel global (1).

En Perú, la TB es la quinta causa de mortalidad (36), que afecta predominantemente al estrato social en estado de pobreza (37). Así como en otros países, las tasas de incidencia y prevalencia de TB han sido reducidas lentamente, reportándose que en el año 2015 se dieron 87.6 y 3.7 por cada 100 mil habitantes de casos nuevos y tasa de mortalidad, respectivamente, de los cuales el 80% se reportaron en la región de Lima (33).

2.2.4. Patología de la Tuberculosis

M. tuberculosis ocasiona una enfermedad inflamatoria crónica la cual se caracteriza por el desarrollo de lesiones granulomatosas compuestas por una población celular inmune heterogénea, donde los principales protagonistas son los macrófagos.

La infección inicia por la inhalación de gotículas expulsadas (estornudo) por pacientes con TB activa. Luego, las bacterias se instalan en el tejido pulmonar para conseguir su propagación.

Normalmente, los macrófagos, derivados de los monocitos, son células fagocíticas que internalizan a microorganismos patogénicos dentro de fagosomas y estos se fusionan con las lisosomas propiciando la formación de fagolisosomas, y en efecto, la destrucción de las micobacterias (38). Sin embargo, *M. tuberculosis* evade dicha fusión y otros mecanismos de defensa de la célula hospedera para sobrevivir y/o multiplicarse dentro de las mismas (Figura 01).

M. tuberculosis tiene la capacidad de adaptarse a una amplia variedad de cambios ambientales (ej. pH ácido y condiciones anaeróbicas dadas por la inflamación local), así como al escaso acceso de nutrientes, y frente a la exposición de antibióticos (39). No obstante, estos cambios pueden inducir efectos mutagénicos en su genoma e inactivar la cadena de transporte de electrones, confiriendo resistencia a drogas (40,41).

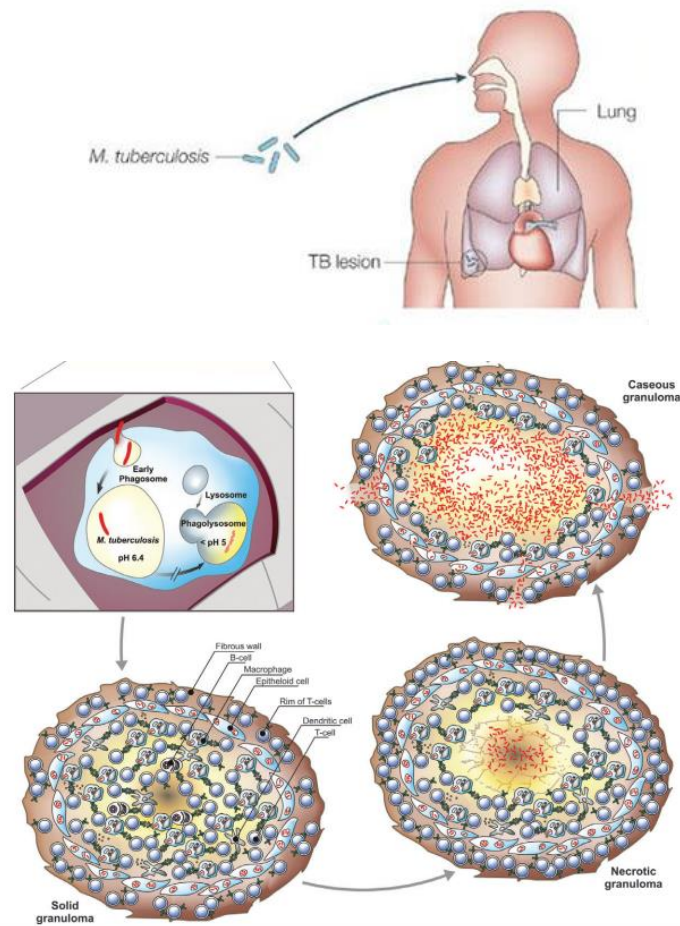


Figura 1. Representación esquemática de la patología de Tuberculosis. Fuente: Gengenbacher & Kaufmann (2).

2.2.5. Tratamiento de la Tuberculosis

Los pacientes con TB pueden tener la enfermedad activa, o infección latente, o en el mejor de los casos, ser erradicada por el sistema inmunológico (2). Muchas veces no ocurre lo último, y para contrarrestar esta enfermedad, el tratamiento consiste en una serie de drogas antituberculosas, entre ellas pirazinamida (PZA) (3).

2.2.5.1. Pirazinamida (PZA)

PZA es una droga que posee actividad esterilizante, pues tiene la capacidad de eliminar poblaciones de *M. tuberculosis* en fase de latencia o semidormancia que residen en un ambiente ácido (efecto de la inflamación activa en el hospedero) (3,42); además, hasta la actualidad, esta droga no puede ser reemplazada sin comprometer la eficacia del tratamiento, pues acorta el periodo de tratamiento de 12 a 6 meses junto a rifampicina e isoniazida (3).

PZA es una droga de primera y segunda línea para el tratamiento de pacientes con tuberculosis drogo resistentes; la dosis de administración de PZA oscila entre 30 y 40 mg/kg, altas dosis de PZA causan hepatotoxicidad (>40 mg/kg) (3).

La administración de PZA es intensiva durante los dos primeros meses del tratamiento, posterior a ello, ya no resulta beneficiosa, presumiblemente porque el ambiente de las lesiones se alcaliniza (3,32).

2.2.5.2. Mecanismo de acción de PZA

PZA actúa a pH ácido *in vivo*, favorecida por el ambiente ácido a causa de la inflamación, y también *in vitro* (3). Se ha observado también que PZA incrementa su actividad cuando la actividad metabólica de *M. tuberculosis* es reducida (3).

La superficie celular de *M. tuberculosis* es de naturaleza hidrofóbica, siendo una barrera de permeabilidad. Sin embargo, algunas drogas

como Isoniazida y PZA ingresan a la bacteria por difusión pasiva (30). PZA es convertido a ácido pirazinoico (POA, forma activa de PZA) y amonio catalizado por PZAsa, la cual es codificada por el gen *pncA* de *M. tuberculosis* (Figura 02) (3). POA es liberado al medio extracelular, donde el pH es ácido, y este retorna al interior de la célula en su forma protonada (HPOA), dando lugar a la acidificación del citoplasma de la bacteria, y consiguiente, disfunción a nivel celular (Figura 03) (6,7).

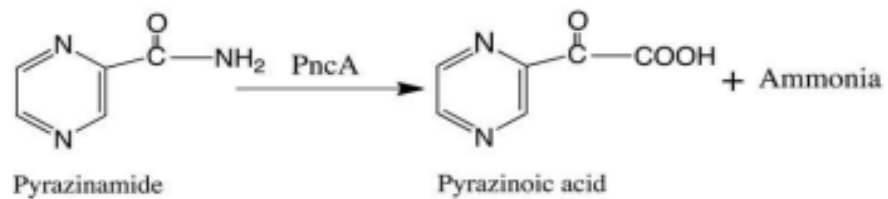


Figura 2. Conversión de PZA a POA por la enzima PZAsa codificada en el gen *pncA*. Fuente: Zhang *et al.* (4).

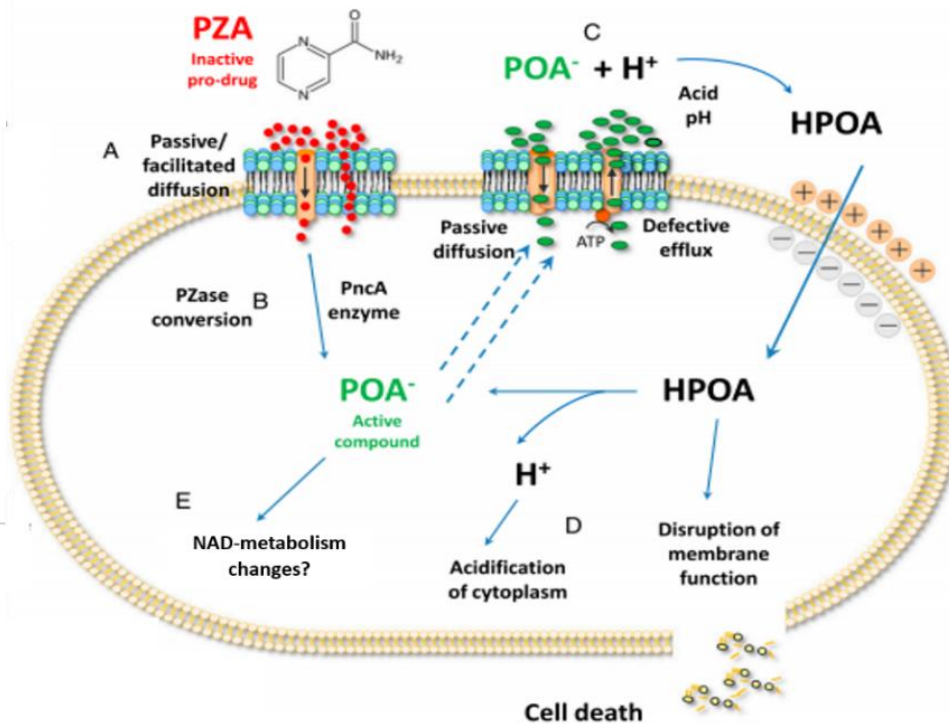


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de acción de PZA en *M. tuberculosis*. Fuente: Miotto *et al.* (27).

Por otro lado, cabe mencionar que *M. tuberculosis* posee un mecanismo de eflujo selectivo ineficiente en comparación a la de *M. smegmatis* y *M. bovis*, permitiendo que POA sea acumulado intracelularmente en *M. tuberculosis*, aportando susceptibilidad a PZA (43,44).

2.2.6. Nicotinamidasas/Pirazinamidasas

La enzima nicotinamidasas/pirazinamidasas (PZAsa) es importante para la vía de salvataje de producción de nicotina adenina dinucleótido (NAD) ya que ésta cataliza la deaminación de nicotinamida en nicotinato (45). PZAsa es un monómero que cuenta con sitios de coordinación a Mg²⁺ y Fe²⁺, y difiere en los residuos de aminoácidos del sitio activo comparado

con las PZAsas de otras especies (15,46,47). Los residuos de aminoácidos del sitio activo de PZAsa que interactúan con el sustrato son Asp8, Lys96 y Cys138, y del sitio de coordinación con los metales mencionados anteriormente, His51, His71 y Asp49 (11). Tales sitios son esenciales para la actividad catalítica de PZAsa.

2.2.7. Mecanismos de resistencia a PZA

El principal mecanismo de resistencia a PZA se debe a mutaciones en el gen *pncA* (8,9). Sin embargo, se han observado aislados clínicos de pacientes con TB resistentes a PZA sin mutaciones en el gen *pncA*, y con mutaciones en otros genes (15,30).

Diversos estudios han observado que las mutaciones siguen un patrón conservado en casos de TB-MDR a nivel global (16,48–50), es decir, que las mutaciones son localizadas en las mismas regiones de la secuencia de aminoácidos de PZAsa, generalmente en los sitios activo y de coordinación con metales, cerca y lejos de estos, que ocasionan la pérdida total o parcial de la actividad enzimática (10,11) y niveles variados de resistencia a PZA (12–14).

Como se describió anteriormente, estos estudios evidencian la existencia de diversidad genética en el gen *pncA* debido a mutaciones adaptativas por presión selectiva (51) o por deficiencia en la reparación de errores en el genoma bacteriano (52).

Entre los mecanismos alternativos que comprometen la susceptibilidad a PZA se encuentran las mutaciones identificadas en genes de bombas de

eflujo (*Rv0194*, *MppL11*, *MmpL3*, *MgtE*, *Rv0987*, *MmpL10*, y otros) y proteínas transportadoras de metales (*NicT*, *CtpI*, *CtpE*) (17).

2.2.8. Herramientas de modificación genética para *M. tuberculosis*

Las herramientas de manipulación genética hicieron posible la síntesis de vectores para *M. tuberculosis*, con la finalidad de entender el funcionamiento de diversas proteínas que resultan esenciales para la adquisición de virulencia y resistencia a drogas (53,54).

En los años 90, la posibilidad de conseguir mutaciones sitio-específicas eran al azar, hasta que se logró realizar modificaciones genómicas estables con técnicas de intercambio alélico y mutagénesis dirigida mediante vectores integrativos (20,21). Actualmente, también se tienen sistemas vectoriales extracromosomales para micobacterias (20,55–58). En algunas ocasiones hubo limitaciones por diversos factores como la eficiencia de transformación para introducir ADN foráneo o la disposición de sistemas vectoriales apropiados para micobacterias (59,60). Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado sistemas vectoriales para micobacterias con diversos fines (20,55–58).

El uso de vectores permite la introducción de genes de interés en *M. tuberculosis* para realizar manipulaciones genéticas y generar librerías de cepas mutantes (61,62). Para lograr la obtención de transformantes de *M. tuberculosis*, el proceso de electroporación resulta más eficiente (61,62).

2.2.8.1. Vectores episomales o extracromosomales

Los vectores extracromosomales para micobacterias generalmente contienen un origen de replicación para

Mycobacterium sp. y otro para *E. coli*, lo cual facilita la manipulación del ADN antes de ser transferido a la micobacteria, y genes de resistencia a aminoglucósidos (ej. kanamicina, estreptomycinina e higromicina) (20,55). Existen vectores episomales de copia baja, 3 a 5 copias por célula (low-copy plasmid, en inglés) y multicopia (>5 copias por célula) (high-copy plasmid, en inglés) para especies de *M. tuberculosis* (57,62).

Para el uso de estos vectores, se debe tener en cuenta que el número de copias del plásmido puede afectar la cantidad de producto de un determinado gen y su estabilidad (57). Por otro lado, algunos vectores episomales (ej. pNIT-1, Figura 04) generan una expresión basal o constitutiva de los genes insertados en el vector sin la necesidad de emplear un inductor determinado, asimismo, mediante estos vectores se puede lograr la sobreexpresión del gen insertado (19), lo cual permite realizar estudios estructurales y/o bioquímicos de las proteínas codificadas por los genes sobreexpresados (63).

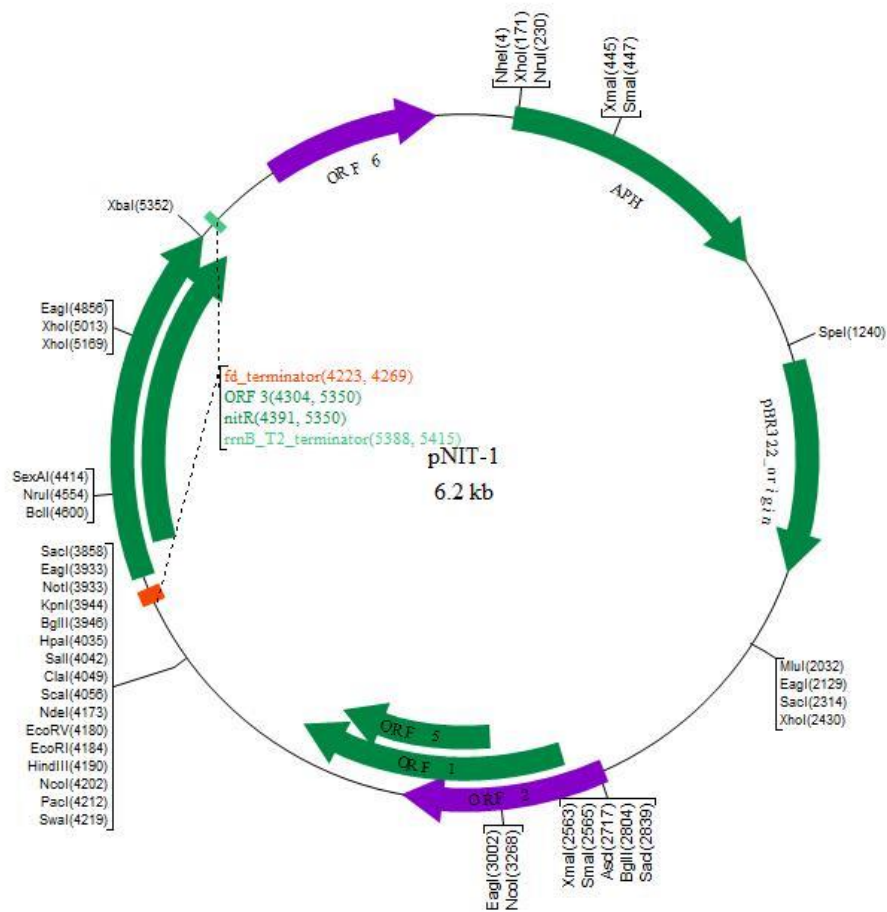


Figura 4. Mapa génico del plásmido episomal pNIT-1. Fuente: Pandey *et al.* (19).

2.2.8.2. Vectores integrativos

Los vectores integrativos se incorporan al genoma micobacteriano sin comprometer la funcionalidad o expresión de otros genes (21). Estos vectores contienen un gen de integrasa para incorporarse en el genoma de *M. tuberculosis*, un ori E, y gen de resistencia (ej. kanamicina) (20,55).

Lee *et al.* (21) identificaron el gen *integrasa* (*int* gene) del micobacteriófago L5, y construyeron plásmidos, derivados de vectores de *E. coli*, que fueron introducidos eficientemente en

M. smegmatis y *M. tuberculosis*. Posteriormente, Andreu *et al.* (58) observaron que el sitio attB del gen *int* sobrelapa con el gen tRNA Gly de *M. smegmatis*, de *M. bovis*, BCG y de *M. tuberculosis*, demostrando que la integración del vector en el genoma no altera la secuencia del gen tRNA en *Mycobacterium* sp. Generalmente, este tipo de vectores son empleados para las técnicas de intercambio alélico y mutagénesis dirigida (20,21).

III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Hasta el momento, todos los estudios que han demostrado la relación entre mutaciones en el gen *pncA* y el nivel de resistencia a PZA se han desarrollado a partir de aislados clínicos de pacientes con TB, los cuales tienen el gen *pncA* mutado, observándose, en ciertos casos, resultados discordantes en la relación entre la actividad PZAsa y la susceptibilidad a PZA (64–66).

La limitación de trabajar con distintas cepas de *M. tuberculosis* comprende la falta de control de la variabilidad de otros genes (distintos de *pncA*) que potencialmente afectarían directa o indirectamente a la susceptibilidad a PZA. Por otro lado, los niveles variados de resistencia a PZA, actividad PZAsa y de expresión de los genes *pncA*, debido a distintas mutaciones en el gen *pncA* y a otros posibles mecanismos alternativos en aislados clínicos de pacientes con TB, conllevan a realizar un estudio donde se debe evaluar el efecto específico de las mutaciones en el gen *pncA* sobre la resistencia a PZA en un “ambiente controlado que mantiene un mismo genotipo en todos los ensayos”.

En este estudio, se hará el uso de vectores de expresión, los cuales restaurarán el gen *pncA* WT y con mutaciones D49N, H51R, G78C y F94L, en una cepa de

referencia H37Rv *knockout* en el gen *pncA*, controlando, de esta manera, la variabilidad genética.

IV. HIPÓTESIS

Debido a la evidencia de que el mecanismo de resistencia a PZA en *M. tuberculosis* estaría asociado a múltiples blancos y rutas metabólicas, se considera que un procedimiento libre de sesgos para evaluar el efecto específico de las mutaciones en el gen *pncA* sobre la susceptibilidad a PZA, es necesario controlar la variabilidad genética en *M. tuberculosis*.

Por ello, se tiene como hipótesis que la complementación de genes *pncA* mutantes en una cepa *M. tuberculosis* H37Rv *pncA*-KO, mediante el sistema de expresión pNIT, reproduce un escenario similar a nivel genómico comparado a la cepa H37Rv. De esta manera, la complementación de una cepa *M. tuberculosis* H37Rv *pncA*-KO con genes *pncA* mutantes permitirá evaluar el efecto específico de las mutaciones en *pncA*, controlando la variabilidad genética de la bacteria.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Complementar genes *pncA* mutantes y wild type en *M. tuberculosis pncA-knockout* mediante el sistema de expresión pNIT, para evaluar el efecto de las mutaciones en el gen *pncA* sobre la susceptibilidad a PZA, controlando la variabilidad genética de los aislados clínicos.

5.2. Objetivos específicos

- Complementar a *M. tuberculosis pncA-KO* con genes *pncA* WT y mutantes D49N, H51R, G78C y F94L.

- Verificar la complementación de genes *pncA* en *M. tuberculosis pncA-KO*.
- Verificar que la expresión de genes *pncA* en *M. tuberculosis pncA-KO* mediante el sistema de expresión pNIT, tenga un nivel equivalente al de la cepa H37Rv, manteniendo uniformidad de expresión.
- Estimar y comparar los parámetros fenotípicos (nivel de expresión de *pncA*, cantidad de POA producido y concentración mínima inhibitoria de PZA) en *M. tuberculosis pncA-KO* complementadas con genes *pncA* mutantes y en sus correspondientes aislados clínicos.

VI. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

6.1. Tipo de estudio

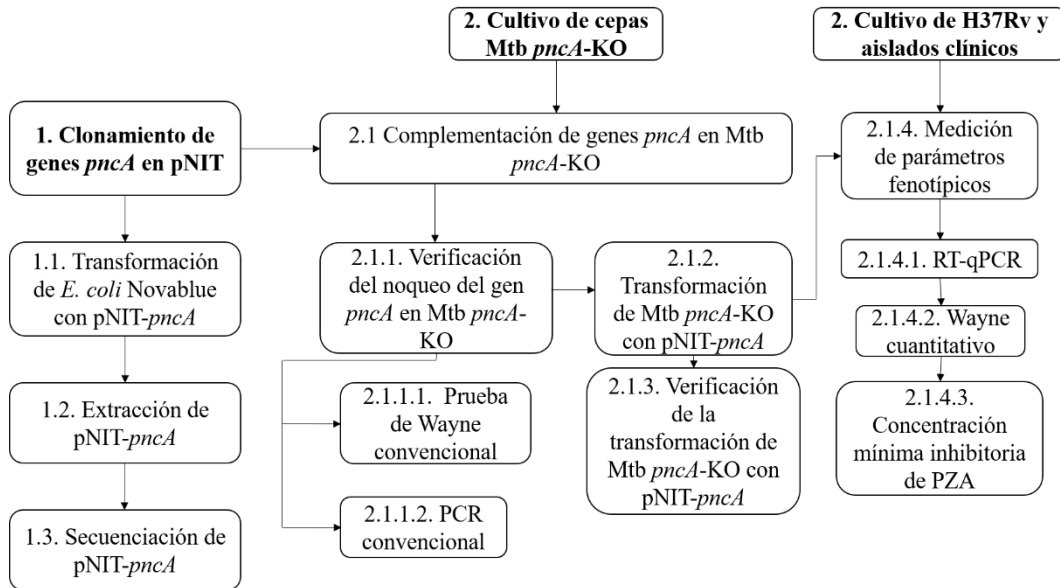
Este estudio fue de tipo exploratorio-correlacional y de enfoque analítico-experimental.

6.2. Diseño de estudio

Para la generación de cepas complementadas, primero se clonaron los genes *pncA* WT y mutantes (H51R, D49N, G78C y F94L). Luego, los plásmidos pNIT-*pncA* fueron introducidos en la cepa de *M. tuberculosis pncA-KO*. Obtenidas las cepas complementadas, se midieron sus parámetros fenotípicos (cantidad de POA producido, CMI de PZA, y nivel de expresión de los genes *pncA*) (Esquema 1).

El cultivo de los aislados clínicos, en los cuales se identificaron las mutaciones en los genes *pncA*, anteriormente mencionados, y de las cepas H37Rv y pAIncA se realizó en paralelo con el clonamiento de los genes *pncA*, para luego realizar

la medición de los parámetros fenotípicos con la finalidad de comparar con los parámetros de las cepas complementadas (Esquema 1).



Esquema 1. Flujograma de trabajo para la evaluación en cepas *M. tuberculosis pncA-KO* transformadas con pNIT-*pncA* y en aislados clínicos.

6.3. Área de estudio

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Tuberculosis con nivel de bioseguridad III y en el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

6.4. Material biológico

Se empleó la cepa *M. tuberculosis* H37Rv *pncA-knockout* (*pncA-KO*), la cual tiene noqueado el gen *pncA* por inserción con cassette de higromicina (*pncA::hyg*) (53). Esta cepa fue donada por los investigadores Helena Boshoff y sus colaboradores (University of the Witwatersrand Medical School, Johannesburg, South Africa).

El plásmido pNIT-1 fue sintetizado por los investigadores Pandey A. K. y colaboradores (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01655, USA). Este plásmido fue empleado para generar cepas *pncA* complementadas.

El Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia dispone de un banco de ADN genómico extraído de aislados clínicos de pacientes con tuberculosis. De este, se seleccionaron genomas en las cuales anteriormente se identificaron mutaciones en los residuos aminoacídicos del sitio de unión a metales (D49N y H51R), cerca al sitio activo y de unión a metales (F94L), y una distante a estos sitios (G78C) en el gen *pncA* (67). Por supuesto, también se empleó el gen *pncA* wild type (WT) de la cepa H37Rv para utilizarlo como referencia de la actividad PZAsa funcional. El laboratorio también cuenta con un banco de aislados clínicos de pacientes con TB, descritos en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas empleadas para el presente estudio y sus características.

CEPAS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
Control positivo de aislados clínicos		
H37Rv	wild type	Laboratorio BBM LID
Control negativo de aislados clínicos y para complementación		
<i>pncA</i> -KO	<i>pncA</i> :: <i>hyg</i>	Boshoff <i>et al.</i> (53)
Control de cepa <i>pncA</i>-KO		
pAIncA	[<i>pncA</i> :: <i>hyg</i>]::pAIncA complementadapor con <i>pncA</i> WT por RH)	(<i>pncA</i> -KO Boshoff <i>et al.</i> (53)
Aislados clínicos		
CSV10399	F94L (mutación puntual cerca al sitio de coordinación con metales y al sitio catalítico de PZAsa), mutaciones en varios candidatos a bombas de eflujo y otros genes	Sheen <i>et al.</i> (15,17)

CSV4644	H51R (mutación puntual en sitio de coordinación con metales de PZAsa), mutaciones en algunos candidatos a bombas de eflujo y otros genes	Sheen <i>et al.</i> (15,17)
CSV5769	G78C (mutación puntual lejos del sitio de coordinación con metales y del sitio catalítico de PZAsa), mutaciones en algunos candidatos a bombas de eflujo y otros genes	Sheen <i>et al.</i> (15,17)
MDRDM1098	D49N (mutación puntual en sitio de coordinación con metales de PZAsa), mutaciones en algunos candidatos a bombas de eflujo y otros genes	Sheen <i>et al.</i> (15,17)
Cepa <i>pncA</i>-KO transformada con pNIT-<i>pncA</i>		
pNIT- <i>pncA</i> WT	<i>pncA</i> ::hyg(<i>pncA</i> wild type), sin mutaciones en otros genes	este trabajo
pNIT-D49N	<i>pncA</i> ::hyg(D49N), sin mutaciones en otros genes	este trabajo
pNIT-G78C	<i>pncA</i> ::hyg(G78C), sin mutaciones en otros genes	este trabajo
pNIT-H51R	<i>pncA</i> ::hyg(H51R), sin mutaciones en otros genes	este trabajo
pNIT-F94L	<i>pncA</i> ::hyg(F94L), sin mutaciones en otros genes	este trabajo
pNIT-eGFP	<i>pncA</i> ::hyg(eGFP), sin mutaciones en otros genes	este trabajo

6.5. Procedimiento experimental

6.5.1. Complementación del gen *pncA* en *M. tuberculosis pncA-knockout*

6.5.1.1. Verificación del noqueo del gen *pncA* en *M. tuberculosis pncA-KO*

Ya que la cepa *pncA*-KO fue donada por Boshoff *et al.*, se verificó la ausencia de actividad de PZAsa y se realizó PCR para observar si los productos obtenidos son comparables con los de la cepa H37Rv.

Para ello, se realizó el cultivo de cepas H37Rv (naturalmente susceptible a PZA), cepa pAIncA (cepa *pncA* complementada por RH (53)) y la cepa *pncA*-KO (altamente resistente a PZA) en medio de cultivo sólido 7H10

enriquecido durante 3 semanas a 37°C. El protocolo de preparación de medio sólido 7H10 enriquecido se encuentra en el Anexo 03.

Posteriormente, se realizó la prueba de Wayne convencional, descrita previamente (68). La prueba de Wayne es una prueba colorimétrica basada en la presencia de una banda color naranja rojizo, indicador de la actividad PZAsa, sobre el medio Dubos después de la reacción de POA y sulfato de amonio ferroso (69). De las cepas anteriormente cultivadas, se tomaron dos asadas del cultivo y se inocularon sobre la superficie del medio sólido Dubos (protocolo en Anexo 04), incubándolas a 37°C durante 5 días. Luego, se agregó 1 mL de 1% de sulfato de amonio ferroso, y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Para cada cepa, se realizó por duplicado, y como blanco, no se inoculó cepa.

Adicionalmente, se realizó la amplificación de los genes *pncA* con oligonucleótidos P1 5' GTCGGTCATGTTTCGCGATCG 3' y P6 5' GCTTTGCGGCGAGCGCTCCA 3', que amplifican 650 pb (45 pb upstream y downstream del gen *pncA*) empleando 2X Phusion High Fidelity PCR master mix (Thermo Fisher), de acuerdo al protocolo establecido. El ciclaje de temperaturas fueron 98°C por 10 segundos, 30 ciclos de 98°C por 1 segundo, 65.5°C por 5 segundos y 72°C por 15 segundos, finalizando la amplificación a 72°C por 1 minuto. También se realizó PCR con los oligonucleótidos Fw 5' CGAGAACGGCACGCCACTG 3' y Rv 5' CCGTCTGGCGCACACAATG 3', que flanquean dentro del gen *pncA* y

amplifican 100 pb, empleando 2X Phusion High Fidelity PCR master mix (Thermo Fisher).

6.5.1.2. Clonamiento de los genes *pncA* wild type y mutantes

Se realizó la amplificación de los genes *pncA* wild type y mutantes usando oligonucleótidos con sitios de restricción para las enzimas *HindIII* y *NdeI* (5' CGGCATATGCGGGCGTTGATCATCG 3' y 5' CGCAAGCTTTCAGGAGCTGCAAACCAACTC 3'). Para la PCR, se empleó 2X Phusion High Fidelity PCR master mix (Thermo Fisher), en base al protocolo establecido. El ciclaje de temperaturas fue 98°C por 10 segundos, 30 ciclos de 98°C por 1 segundo, 72°C por 5 segundos y 72°C por 15 segundos, finalizando la amplificación a 72°C por 1 minuto. Por cada gen, se realizaron 2 reacciones de 50 µL para la purificación de los productos de PCR empleando el kit High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche) de acuerdo al protocolo establecido, y la posterior doble digestión con las enzimas *NdeI* y *HindIII* (New England Biolabs), considerando el protocolo establecido, y nuevamente se purificaron los amplicones digeridos.

Para el clonamiento de los genes *pncA* WT y mutantes, se empleó el plásmido pNIT-eGFP. Este plásmido posee un promotor inducible del gen *nitA* upstream al sitio de multiclonaje, también posee el promotor y gen *nitR*, gen de resistencia a kanamicina (*aph*), origen de replicación en *E. coli* (ori E) y origen de replicación en *Mycobacterium* sp. (ori M) (Figura 04) (19). Previamente, este vector tuvo como inserto en el sitio de

multiclonaje el gen reportero de la proteína verde fluorescente eGFP, siendo pNIT-eGFP (19).

El plásmido fue doble digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* para retirar el gen eGFP. A la vez, se realizó la desfosforilación de las regiones 5' del plásmido (protocolo en Anexo 01). Luego, el plásmido pNIT doble digerido fue purificado a partir de gel con el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo al protocolo establecido.

La inserción del gen *pncA*, wild type o mutantes se realizó empleando la enzima T4 ADN ligasa (New England Biomedicals) en un volumen de 20 μ L por reacción. Las proporciones de inserto:vector fueron de 3:1 y 5:1. La ligación se realizó a 16°C por 16 horas.

La reacción de ligación fue utilizada para la transformación de las células competentes *E. coli* Novablue (Novagen) mediante shock térmico, y se seleccionaron las colonias transformantes mediante el cultivo en medio sólido LB con kanamicina (40 μ g/mL) (protocolo en Anexo 02).

Para verificar la inserción de los genes *pncA* en el plásmido, los constructos fueron doble digeridos y secuenciados empleando los oligonucleótidos pNIT promoter 5' ATAGTACTGCGAACTCCCTTATGCG 3' y pNIT terminator 5' TAAGGGAGTTCGCCTTAAGCTCC 3'. Adicionalmente, el plásmido pNIT-eGFP fue utilizado posteriormente para introducirlo a la cepa *pncA*-KO, y utilizarlo como control negativo de las cepas *pncA* complementadas.

Finalmente, se realizó la purificación de los plásmidos recombinantes a partir de 50 mL de cultivo de *E. coli* Novablue transformante usando el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche) de acuerdo al protocolo establecido.

6.5.1.3. Transformación de *M. tuberculosis pncA*-KO con pNIT-*pncA* y pNIT-*eGFP*

La cepa *pncA*-KO fue resembrada en medio líquido 7H9 pH 6.7 enriquecido con 50 µg/mL de higromicina, a 37°C en agitación constante (100 rpm) hasta llegar a la fase logarítmica ($OD_{600}=0.5-0.7$). Luego, se realizó la transformación de *M. tuberculosis pncA*-KO con los plásmidos pNIT-*pncA* y pNIT-*eGFP* mediante el método de electroporación descrito por Goude & Parish (52) (mayor detalle en Anexo 05).

Antes de cosechar las bacterias, 24 horas antes se agregó 10 mL de glicina 2M para mejorar la eficiencia de transformación. La preparación de células competentes se realizó mediante lavados con glicerol al 10% precalentado a 37°C y centrifugación a 3000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, y fue resuspendida en 1 mL de glicerol al 10%.

Las células competentes fueron transformadas con 3.5 µg del constructo recombinante (pNIT-*pncA*) en 200 µL de la suspensión de células. Esta solución fue transferida a una cubeta de electroporación de 0.2 cm y sometida a un pulso de 2.5 kV, 25 µF (BTX) con la resistencia pulso-controlador a 1000 Ohms. Inmediatamente, se recuperó la suspensión celular en medio 7H9 enriquecido, y se incubaron a 37°C por 16 horas en agitación. Finalmente, las células fueron cosechadas y sembradas en medio

7H10 enriquecido más 50 µg/mL de higromicina y 20 µg/mL de kanamicina, dejándolas incubar a 37°C durante 3 semanas.

6.5.2. Verificación de la complementación del gen *pncA* en *M. tuberculosis pncA-KO*

6.5.2.1. Transformación de *E. coli* con sobrenadante de lisado de *M. tuberculosis pNIT-pncA*

Para verificar la transformación en *M. tuberculosis pncA-KO*, se realizó la extracción de los plásmidos a partir de dicha cepa. Para ello, las cepas transformadas fueron lisadas empleando el equipo Fast Prep (MP Biomedicals), previa inactivación a 80°C por 20 minutos. Luego se obtuvo el sobrenadante y este fue empleado para transformar a *E. coli* Novablue. Las células competentes de *E. coli* Novablue (protocolo descrito en Anexo 02) fueron descongeladas en hielo y se agregó 20 uL del sobrenadante. Se homogenizó ligeramente y se dejó en hielo por 30 minutos, luego se transformaron las células por shock térmico, sometiéndolas a 42°C por 45 segundos y luego, por 2 minutos en hielo. Las células transformantes fueron seleccionadas cultivándolas en medio LB con kanamicina (40 µg/mL) y tetraciclina (10 µg/mL) (mayor detalle en Anexo 06).

6.5.2.2. Secuenciación del plásmido pNIT-*pncA* post-transformación de *M. tuberculosis pncA-KO*

Se verificó que los insertos (genes *pncA*) y el promotor nitrilasa no tuvieran mutaciones ajenas a los que se mencionaron anteriormente. Para ello, se inoculó una colonia transformante de *E. coli* Novablue en 5 mL de medio LB con kanamicina (40 µg/mL) y tetraciclina (10 µg/mL). Luego, se

purificaron los plásmidos de las células *E. coli* Novablue transformadas usando el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche, Sigma Aldrich), y fueron secuenciados por Macrogen Inc. empleando los oligonucleótidos promoter pNIT 5' ATAGTACTGCGAACTCCCTTATGCG 3' y terminator pNIT 5' TAAGGGAGTTCGCCTTAAGCTCC 3'.

6.5.2.3. Inmunodetección de PZAsa de *M. tuberculosis pncA* WT complementada

La obtención de proteínas totales a partir de *M. tuberculosis pncA* WT complementada, se realizó mediante el método descrito previamente (53), implementando algunas modificaciones. Se inocularon dos asadas de cultivo con *M. tuberculosis pncA* WT complementada en 500 mL de medio 7H9 enriquecido, y se incubó a 37°C en agitación constante hasta obtener un $OD_{600} = 0.8$.

La inducción de la sobreexpresión de *pncA* se realizó agregando 30 uM de IVN, como control de expresión basal, se agregó DMSO. Las células fueron cosechadas a 5000 x g por 10 minutos, y lavadas con buffer TE (Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM, DTT 1mM) por una vez. El pellet celular fue resuspendido en 10 mL de buffer TE.

La suspensión celular fue separada en 10 tubos de 1.5 mL contenido con beads de 0.1 mm, y fueron sometidas a lisis mecánica con el homogenizador Fast Prep a una velocidad de 6.0 m/s durante 1 minuto por 6 veces, entre cada ciclo, los tubos fueron puestos en hielo por 5 minutos. La fase superior de todos los tubos fueron transferidas en un tubo de 15

mL y se agregaron inhibidores de proteasas (leupepetin y pepstatin, 1 ug/mL). Las proteínas solubles fueron recuperadas por centrifugación a 13000 x g por 20 minutos a 4°C, y se recuperaron los sobrenadantes.

Para concentrar las proteínas, estas fueron precipitadas con 5 volúmenes de alcohol absoluto frío, y se reservó por 2 horas a -70°C. Finalmente, se centrifugó a 17000 x g durante 1 hora a 4°C, y el pellet fue resuspendido en buffer TE.

Se cuantificó la concentración de proteínas totales obtenidas mediante el método Bradford (Biorad) teniendo como curva estándar diferentes concentraciones de suero de albúmina bovina (70). Las proteínas fueron corridas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) (40 ug de proteínas por pozo). Los geles fueron ubicados sobre las membranas de transferencia (Biorad) y se realizó la transferencia de proteínas a 2 A durante 30 minutos a 4°C.

Luego se detectó la enzima PZAsa usando un anticuerpo policlonal anti-PZAsa generado en conejos inmunizados, el cual se encontró disponible gracias a estudios previos realizados en el laboratorio de BBM-LID. El inmunocomplejo PZAsa-anticuerpo anti-PZAsa fue detectado por el anticuerpo policlonal anti-conejo generado en cabra conjugado con la enzima HRP (*horse radish peroxidase*) (Abcam). La reacción se reveló con la catálisis de H₂O₂ por la enzima HRP y la posterior oxidación del compuesto diaminobenzidina (Dako) (mayor detalle en Anexo 07).

Como control positivo de inmunodetección, se empleó PZAsa recombinante producida en *E. coli*, proporcionada por el LBBM-LID. El protocolo para obtener PZAsas recombinantes fue realizada por Sheen *et al.* y se encuentra en el Anexo 15.

6.5.2.4. Verificación de la estabilidad intracelular de pNIT-*pncA* en cepas *pncA* complementadas

Las cepas complementadas fueron cultivadas en 3mL de medio 7H9 enriquecido sin el antibiótico de selección (kanamicina), se incubaron por 3 semanas a 37°C, correspondiendo a la primera población. Luego, se realizaron pasajes de 50 µL de los cultivos en 3 mL de medio 7H9 enriquecido sin el antibiótico de selección, y nuevamente se dejó incubando por 3 semanas a 37°C. Esto se realizó hasta obtener 6 poblaciones. De cada población, se comprobó la actividad PZAsa mediante la prueba de Wayne convencional. Para ello, se cosecharon 2 mL de los cultivos mediante centrifugación a 6000 x g por 10 minutos. El pellet celular fue resuspendido en 100 uL de medio 7H9 enriquecido. La suspensión fue transferida a los tubos con medio Dubos, y se incubaron a 37°C por 3 días. Finalmente se reveló la producción de POA agregando 1 mL de sulfato de amonio ferroso al 1%.

6.5.3. Medición de parámetros fenotípicos de las cepas *pncA* complementadas y aislados clínicos

6.5.3.1. Cultivo de aislados clínicos

Los aislados clínicos con genes *pncA* con mutaciones puntuales (mencionadas en el ítem 6.4.) fueron reactivados en medio de cultivo

sólido 7H10 enriquecido durante 3 semanas a 37°C. Para la medición de POA producido, concentración mínima inhibitoria de PZA y niveles de expresión no fue necesario realizar la inducción de la expresión de los genes *pncA*, por ello algunos pasos de los protocolos fueron omitidos.

Las cepas H37Rv y *pncA*-KO fueron empleadas como control positivo y negativo, respectivamente, para la evaluación de la actividad PZAasa y susceptibilidad a PZA de los aislados clínicos.

6.5.3.2. Secuenciación de genes *pncA* de aislados clínicos

Los genomas de los aislados clínicos y de las cepas control fueron extraídos por el método de extracción de ADN genómico de *M. tuberculosis*, descrito previamente (71). Luego, los genes *pncA* de los aislados clínicos y cepa H37Rv fueron amplificados con los oligonucleótidos de secuenciación P1 5' GTCGGTCATGTTTCGCGATCG 3' y P6 5' GCTTTGCGGCGAGCGCTCCA 3' empleando 2X Phusion High Fidelity PCR master mix (Thermo Fisher) y posteriormente secuenciados por MacroGen Inc.

6.5.3.3. Determinación de los niveles de expresión de los genes *pncA* de las cepas de *M. tuberculosis* complementadas y de aislados clínicos

6.5.3.3.1. Extracción de ARN de *M. tuberculosis*

Las cepas complementadas y los aislados clínicos fueron cultivados en 5 mL de medio 7H9 pH 6.7 enriquecido hasta obtener un OD₆₀₀=1.0. En el cultivo de las cepas complementadas, se agregó IVN 30 µM para inducir la expresión de los genes *pncA*, y también se evaluaron los

niveles de expresión basal de dichos genes. Se incubó por 24 horas a 37°C en agitación constante.

Las células fueron cosechadas a 3000 x g por 20 minutos a 17°C, y lavadas con buffer TE pH 8.0. El pellet celular fue resuspendido en 800 uL de Trizol (Sigma Aldrich) contenido en un tubo tapa rosca con beads de 0.1 mm. Las células fueron lisadas a 6.5 m/s durante 30 segundos por dos ciclos en el equipo Fast Prep (MP Biomedicals); entre cada ciclo los tubos se colocaron en hielo para evitar la degradación del ARN.

Las muestras fueron centrifugadas para obtener la fase soluble, y luego se agregó 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente con ayuda del vórtex durante 15 segundos y se incubó por 5 minutos en hielo para permitir la disociación nucleoproteica y las proteínas y materia orgánica celular. Se transfirió la fase superior a un tubo de microcentrífuga, previa centrifugación a 12000 x g por 15 minutos a 4°C.

Finalmente, el ARN se precipitó con etanol absoluto por 30 minutos a -20°C. Se centrifugó y el pellet fue lavado 2 veces con etanol al 75%, y resuspendido en agua DEPC (mayor detalle en Anexo 09). La cuantificación de ARN se realizó empleando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

6.5.3.3.2. Retrotranscripción y PCR cuantitativo (RT-qPCR)

El ARN extraído (5000 ng/μL aproximadamente, de cada cepa) fue tratado con DNase I (1 U) (Thermo Fisher Scientific) en una reacción de 20 uL durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se inactivó la ADNasa a 75°C por 5 minutos.

La RT-qPCR se realizó en dos pasos. El primer mix consistió en los oligonucleótidos RTR específicos para *pncA* y *16S* (*pncA* RTR 5' ACCCTGGTGGCCAAG 3' y 16S RTR 5' CCCAGTAATTCC 3'), y el ARN tratado (900 ng). Se incubó a 65°C por 5 minutos, y 4°C por 2 minutos. Después se agregó el segundo mix (dNTPs, MgCl₂, buffer 10X, inhibidor de RNasa, y retrotranscriptasa) (Taqman Reverse Transcription kit, Thermo Fisher), y se incubó a 37°C por 30 minutos, 95°C por 5 minutos. Como control de presencia de ADN genómico, en el máster mix se omitió el inhibidor de RNasa y retrotranscriptasa (protocolo en Anexo 10).

Finalmente, se realizó la amplificación de los cDNA *pncA* y *16S* empleando el máster mix SYBR Green (Takara) y los oligonucleótidos *pncA* Fw 5' CGAGAACGGCAGCCACTG 3', *pncA* Rv 5' CCGTCTGGCGCACACAATG 3', 16S Fw 5' TTCTCTCGGATTGACGGTAGGT 3' y 16S Rv 5' CGCTCGCACCCCTACGTATTAC 3' (protocolo detallado en Anexo 11).

Para obtener la eficiencia de reacción, se realizaron 5 diluciones de cDNA *pncA* y *16S* (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000). La determinación de los niveles de expresión se realizó utilizando diluciones de cDNA 1:10. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

La cuantificación relativa de la expresión de los genes *pncA* se realizó aplicando el método Livak, el cual consiste en el uso de genes housekeeping, de expresión constitutiva y sin efecto por el tratamiento, para normalizar la cantidad de ARN usado para la retrotranscripción, y además, el método asume que la eficiencia de amplificación de los genes target (ej. *pncA*) y housekeeping (ej. *16S*) deben ser similares (72,73). Por ello Livak y Schmittgen (72) plantearon la siguiente ecuación:

$$N_{\text{target q}} / N_{\text{target cb}} = (2)^{-(Ct_{\text{target q}} - Ct_{\text{housekeeping q}}) / (Ct_{\text{target cb}} - Ct_{\text{housekeeping cb}})}$$

Donde:

N_{target} : cantidad normalizada de target

q: muestra problema (ej. Cepa complementada inducida o aislado clínico)

cb: muestra calibradora (ej. Cepa complementada no inducida o cepa referencial H37Rv)

Esta ecuación fue simplificada considerando Ct target – Ct housekeeping como ΔCT y $(Ct\ target\ q - Ct\ housekeeping\ q) / (Ct\ target\ cb - Ct\ housekeeping\ cb)$ como $\Delta\Delta CT$ con lo que se obtuvo:

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

En este estudio, el gen 16S se consideró como el gen housekeeping, por presentar expresión constitutiva sin variación frente a la inducción de la sobreexpresión de los genes *pncA*. Para determinar los cambios de expresión (Fold Change), se realizó la cuantificación relativa mediante el método de Livak o conocido como el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (72), donde las cepas no inducidas fueron consideradas como el grupo control, calibrador o de referencia de las correspondientes cepas complementadas, y la cepa H37Rv, para el grupo de los aislados clínicos.

6.5.3.4. Medición de la cantidad de POA producido por las cepas de *M. tuberculosis pncA* complementadas y de aislados clínicos

Para la detección de POA producido por las cepas de *M. tuberculosis* complementadas con los genes *pncA* WT y mutantes y de aislados clínicos se utilizó la prueba de Wayne en buffer citrato pH 7.0, descrito previamente (74).

Se resuspendieron 2 a 3 asadas de cultivo de las cepas complementadas y de los aislados clínicos, no mayor de 15 días de cultivo, en buffer citrato (protocolo en Anexo 07). Las células fueron disgregadas con beads de 2.5 mm, por agitación con vórtex. De la suspensión celular anterior, se

transfirieron volúmenes de 20 uL en 3 mL de buffer citrato pH 7.0 hasta obtener una turbidez similar a la escala 4 de McFarland.

Para la inducción de la expresión de los genes *pncA* en las cepas complementadas se empleó isovaleronitrilo (IVN) a diferentes concentraciones (1, 10, 30, 60 y 100 μ M diluidas en DMSO); asimismo, se determinó la producción de POA a nivel basal, empleando sólo el solvente (DMSO). Se dejó inducir la expresión por 24 horas de incubación a 37°C.

A la suspensión anterior se agregó PZA (concentración final: 400 μ g/mL, equivalente a 32.5 mM), y la incubación continuó por 3 días. Las células fueron cosechadas a 13000 rpm por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y fueron inactivadas a 90°C por 20 minutos. Nuevamente se centrifugaron los sobrenadantes para retirar el precipitado. La presencia de POA se realizó agregando sulfato de amonio ferroso al 10%, y se midió a una longitud de onda de 450 nm.

6.5.3.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de PZA en cepas de *M. tuberculosis pncA* complementadas y de aislados clínicos

Se inoculó una asada de cultivo de las cepas complementadas y de los aislados clínicos en 5 mL de medio 7H9 pH 6.7 enriquecido y se incubó hasta obtener un $OD_{600}=0.9-1.0$ a 37°C en agitación constante.

Los cultivos fueron diluidos 10 veces con medio 7H9 pH 6.7 enriquecido, y se transfirió 50 μ L a 3 mL de medio 7H9 pH 6.0 enriquecido con 80,

100, 300 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PZA. Para las cepas complementadas, se tuvo dos grupos: cepas inducidas, a las que se agregó IVN 30 μM , y control, que se les agregó DMSO. Se incubó durante 3 semanas a 37°C y se midió la densidad celular por espectrofotometría (OD_{600}). Valores menores a 0.1 se consideraron como la concentración mínima inhibitoria de PZA (CMI PZA) (mayor detalle en Anexo 08).

6.5.3.6. Análisis estadístico

La comparación de las cantidades de POA producido por las cepas pNIT-*pncA* en condiciones no inducidas e inducidas y de los aislados clínicos y los niveles de expresión de los genes *pncA* y *16S* se evaluaron mediante las pruebas no paramétricas de Dunn y Kruskal Wallis, respectivamente.

El efecto de las concentraciones de inductor empleadas para la sobreexpresión de los genes *pncA* en cada cepa complementada fue estimada por la prueba de regresión lineal.

La correlación de la susceptibilidad a pirazinamida y de las mutaciones en el gen *pncA* de las cepas complementadas y de los aislados clínicos fue determinada por la correlación de Spearman.

Todas las pruebas estadísticas se efectuaron bajo un nivel de significancia de 0.05 (5%). El análisis estadístico fue desarrollado empleando el programa Stata v15.

VII. RESULTADOS

7.1. Complementación del gen *pncA* en *M. tuberculosis pncA-knockout*

7.1.1. Verificación de la ausencia de actividad PZAsa en *M. tuberculosis pncA-KO*

7.1.1.1. Prueba de Wayne convencional

Se realizó la prueba de Wayne convencional para verificar la actividad nula de PZAsa en la cepa *pncA-KO*. Las cepas H37Rv y pAIncA (cepa *pncA-KO* complementada con *pncA* WT por recombinación homóloga sitio-específica (RH), las dos últimas donadas por Boshoff *et al.*) tuvieron actividad PZAsa, no así para la cepa *pncA-KO* (Figura 05), indicando que la actividad PZAsa fue nula.

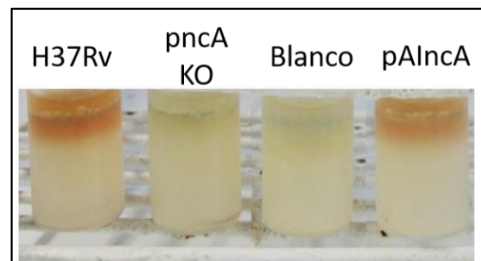


Figura 5. Prueba de Wayne convencional en medio sólido Dubos para cepas H37Rv, *pncA-KO* y pAIncA).

7.1.1.2. Amplificación del gen *pncA*

Adicionalmente, se extrajo el ADN genómico de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv, *pncA-KO* y pAIncA (Figura 06), los cuales tienen un peso molecular de 4.4 Mb (25), para amplificar los genes *pncA* con oligonucleótidos P1-P6, los cuales amplifican 45 pb upstream y downstream del gen *pncA*, y con oligonucleótidos que amplifican 100 pb del gen *pncA*.

La cepa pAIncA fue empleada únicamente para este ítem, con la finalidad de comparar los productos de amplificación obtenidos.

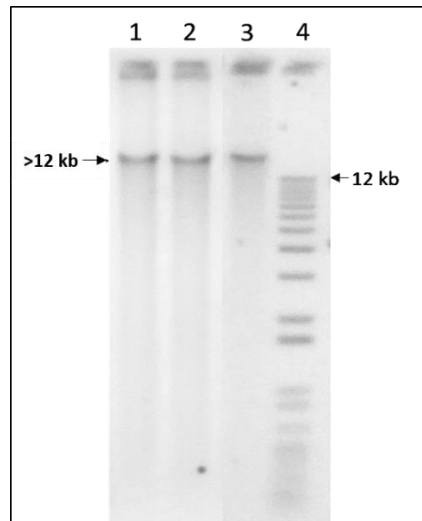


Figura 6. Corrida electroforética en gel de agarosa al 0.8% de ADN genómico de *M. tuberculosis pncA*-KO, H37Rv y pAIncA, carriles 1, 2 y 3 respectivamente, y carril 4: marcador 1 kb Plus (Invitrogen).

De la amplificación de *pncA* de la cepa H37Rv con los oligonucleótidos P1-P6 se obtuvo un fragmento de 650 pb aproximadamente (Figura 07. A). Para las cepas *pncA*-KO y pAIncA se pudieron observar fragmentos de distintos tamaños moleculares (fragmentos correspondientes a secuencias cortas de los vectores empleados para la introducción del gen *pncA* en el genoma de la cepa *pncA*-KO mediante recombinación homóloga, realizado por Boshoff *et al.* (56) (Figura 07. B), con la diferencia que para la cepa pAIncA se observó un fragmento adicional de 950 pb aproximadamente (en círculo celeste, Figura 07. A). Se puede asumir que este fragmento adicional corresponde al gen *pncA* introducido en el genoma de la cepa *pncA*-KO.

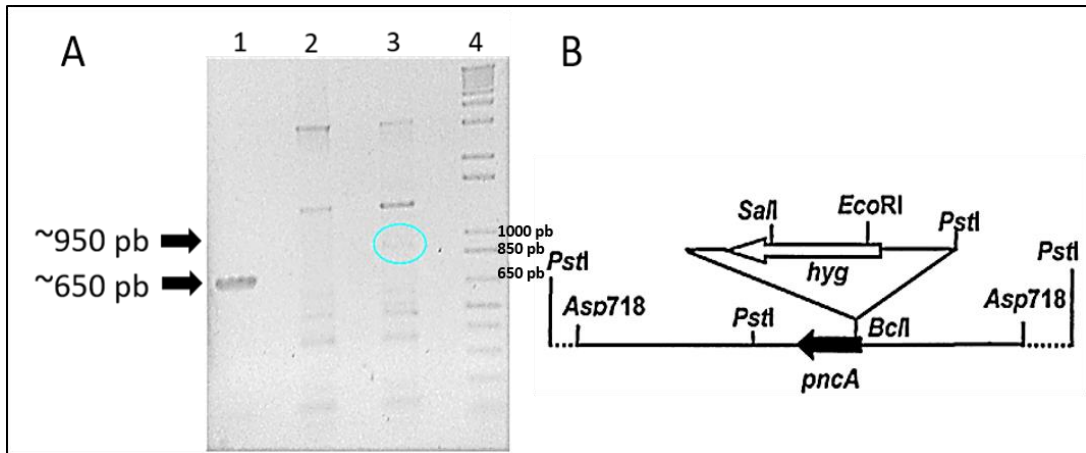


Figura 7. A. Corrida electroforética en gel de agarosa 0.8% de productos de amplificación de cepas H37Rv (carril 1), *pncA*-KO (carril 2), y pAIncA (carril 3) con oligonucleótidos P1 y P6. Carril 4: marcador 1 kb Plus. B. Mapa de restricción para la generación de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv *pncA*-KO (Fuente Boshoff *et al.* (53)).

Para las cepas H37Rv y pAIncA se pudieron observar fragmentos de 100 pb a diferencia de la cepa *pncA*-KO (Figura 08)., afirmando la interrupción de la secuencia de nucleótidos del gen *pncA* por la inserción de un cassette de higromicina en la cepa *pncA*-KO (Figura 07. B).

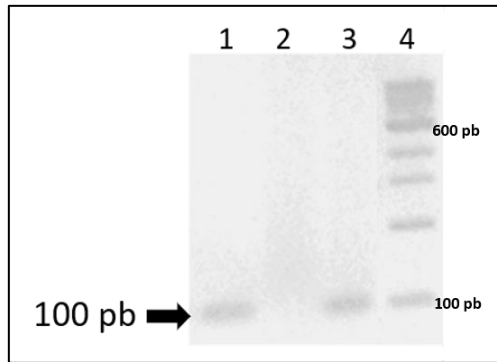


Figura 8. Corrida electroforética en gel de agarosa 2% de productos de amplificación del gen *pncA* de las cepas H37Rv (carril 1), *pncA*-KO (carril 2), y pAIncA (carril 3). Carril 4: marcador 100 pb (Invitrogen).

7.1.1.3. Obtención de plásmidos pNIT-*pncA*

Los genes *pncA* fueron amplificados con oligonucleótidos de clonamiento a partir del ADN genómico de los aislados clínicos en los que se identificaron las mutaciones puntuales en el gen *pncA*. El tamaño fue de 576 pb (Figura 09). Luego de la ligación, se verificó la inserción de los genes *pncA* mediante doble digestión con las enzimas *NdeI* y *HindIII*, obteniendo fragmentos de 567 pb (inserto) (Figura 09) y de 6247 pb (plásmido pNIT lineal) (Figura 10). Finalmente, se obtuvieron los plásmidos recombinantes pNIT-*pncA*, todos del mismo tamaño molecular (Figura 11).

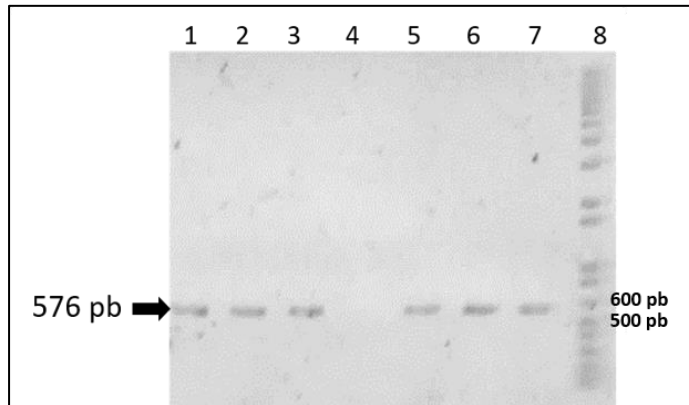


Figura 9. Corrida electroforética de productos de PCR amplificados con oligonucleótidos de clonamiento en gel de agarosa 0.8%. Carriles 1, 2, 3, 5, 6 y 7 genes *pncA* sin mutación (WT) y con mutaciones puntuales. Carril 5: control negativo. Carril 8: marcador 1 kb plus (Invitrogen).

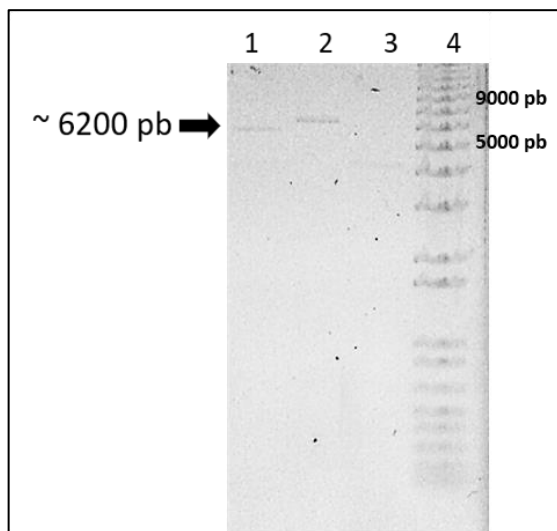


Figura 10. Corrida electroforética de plásmido pNIT simple (con la enzima *HindIII*) y doble digerido (con ambas enzimas *NdeI* y *HindIII*) en gel de agarosa al 0.8%. Tamaño de plásmido linealizado fue 6200 pb aproximadamente, y tamaño del inserto (gen *pncA*), 567 pb. Carril 1: pNIT-*pncA* doble digerido, carril 2: plásmido pNIT-*pncA* simple digerido, carril 3: plásmido pNIT-*pncA* no digerido (forma superenrollada), y carril 4: marcador 1 kb plus (Invitrogen).

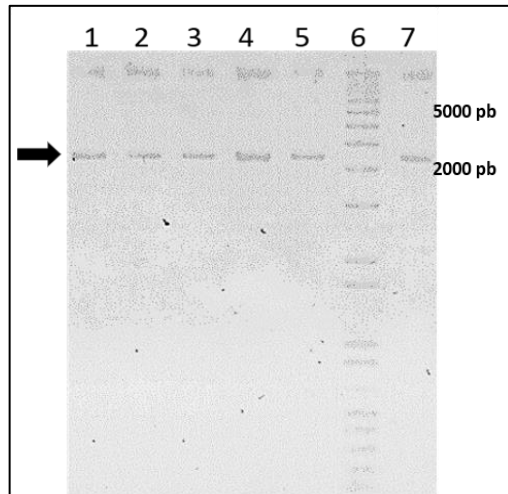


Figura 11. Corrida electroforética de plásmidos pNIT recombinantes en gel de agarosa al 0.8%. Carriles 1 al 5: plásmidos pNIT-*pncA* recombinantes, carril 6: marcador 1 kb plus (Invitrogen), carril 7: plásmido pNIT-*eGFP*.

7.1.1.4. Obtención de *M. tuberculosis pncA* complementadas

La cepa *pncA*-KO fue complementada con los genes *pncA* WT y mutantes D49N, H51R, G78C y F94L mediante el vector pNIT-1. El gen *eGFP* (proteína verde fluorescente, *green fluorescent protein*) se empleó como control negativo de las cepas *pncA* complementadas para la medición de los niveles de expresión de *pncA* y de parámetros fenotípicos.

Las células transformadas con los plásmidos recombinantes crecieron en medio selectivo con kanamicina (20 µg/mL), pues el gen que confiere resistencia a kanamicina (*aph*) se encuentra en el vector pNIT, más higromicina (50 µg/mL), ya que la cepa *pncA*-KO contiene un cassette de resistencia de higromicina (Figura 12).

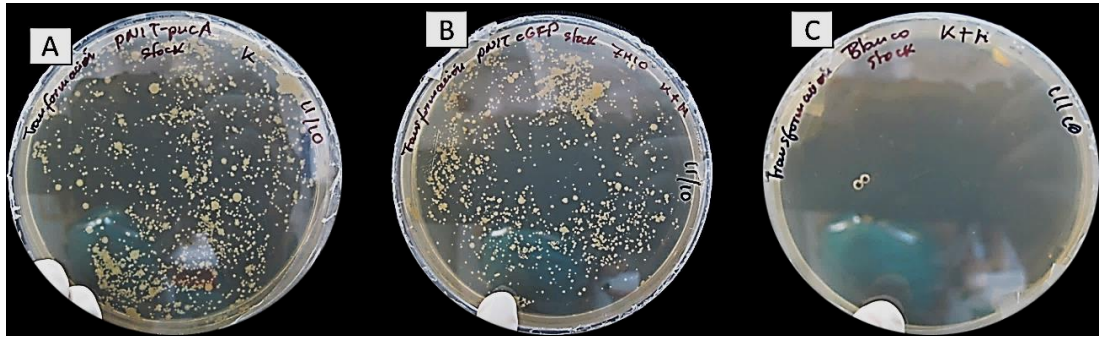


Figura 12. Selección de colonias transformantes mediante cultivo en medio sólido 7H10 con antibióticos de selección (kanamicina e higromicina).

Para el cálculo de la eficiencia de transformación, se redujo la cantidad de células mediante una dilución de 1:10 de la suspensión inicial (Figura 13).

Las colonias fueron contabilizadas y se realizó la siguiente operación:

1° Cálculo del número total de UFC

$$(A)(B)(C) = (D)(X)$$

Donde:

A: volumen total en caldo de pre-selección (10000 μ L)

B: N° de UFC en placa

C: factor de dilución (10)

D: volumen cultivado en placa (30 μ L)

X: N° total de UFC en 10000 μ L de medio 7H9 enriquecido

2° Cálculo de eficiencia de transformación

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{X}{[ADNp]}$$

Donde:

[ADNp]: cantidad de ADN plasmídico utilizado para la transformación, que fue 3.5 ug.

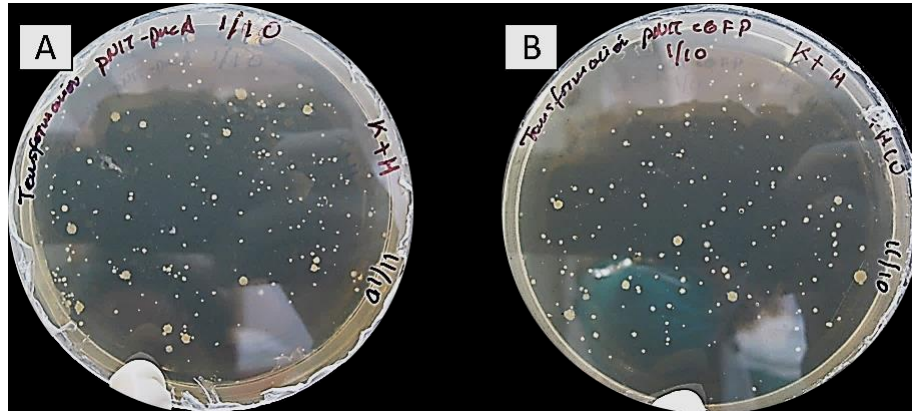


Figura 13. Colonias aisladas para conteo y cálculo de eficiencia de transformación. A: colonias aisladas de cepa pNIT-*pncA*, y B: colonias aisladas de cepa pNIT-*eGFP*.

La eficiencia de transformación de las cepas transformadas con pNIT-*pncA* WT, D49N, F94L, y H51R fueron similares, entre 2×10^4 UFC/ μ g ADN, y para la cepa transformada con pNIT-G78C fue 4.1×10^4 UFC/ μ g ADN (Tabla 2).

Tabla 2. Eficiencia de transformación de cepas complementadas con genes *pncA* WT y mutantes.

Cepa complementada	Número de colonias	Eficiencia de transformación (UFC/ μ g ADN)
pNIT- <i>pncA</i> WT	21	2×10^4
pNIT-D49N	23	2.2×10^4
pNIT-F94L	28	2.7×10^4
pNIT-H51R	27	2.8×10^4
pNIT-G78C	43	4.1×10^4

7.2. Verificación de la complementación del gen *pncA* en *M. tuberculosis pncA-knockout*

7.2.1. Transformación de *E. coli* con sobrenadante de lisado de *M. tuberculosis* pNIT-*pncA* y pNIT-*eGFP*

La introducción de plásmidos recombinantes en *M. tuberculosis pncA-KO* se verificó lisando las células para liberar los plásmidos y utilizarlas para transformar a *E. coli* Novablue. No se observaron colonias de las células *E. coli* transformadas con sobrenadante del lisado de la cepa *pncA-KO* no transformada (Figura 14, A). En cambio, se observaron colonias de *E. coli* Novablue transformadas con los sobrenadantes de las cepas *pncA-KO* transformadas (Figura 14, B y C), indicando la presencia de plásmidos pNIT-*pncA* y pNIT-*eGFP* en los sobrenadantes de las cepas transformadas.

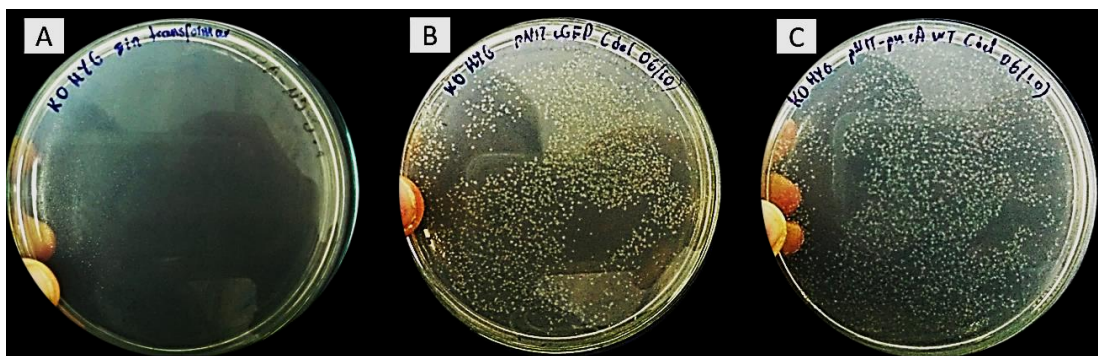


Figura 14. Verificación de presencia de plásmidos pNIT recombinantes en sobrenadante de lisado de cepas de *M. tuberculosis* transformantes mediante transformación de *E. coli* Novablue. A: *E. coli* Novablue transformada con sobrenadante de cepa *pncA-KO*, B: *E. coli* Novablue transformada con sobrenadante de cepa pNIT-*eGFP*, y C: *E. coli* Novablue transformada con sobrenadante de cepa pNIT-*pncA*.

7.2.2. Secuenciación de pNIT-*pncA* post-transformación de *M. tuberculosis pncA-knockout*

Los genes *pncA* WT y mutantes (D49N, H51R, G78C, y F94L) insertados en el vector pNIT no mostraron mutaciones externas y la secuencia de aminoácidos codificadas por los genes *pncA* mutantes mostraron las mutaciones identificadas en los aislados clínicos, anteriormente reportadas por Sheen *et al.* (67) (Anexo 13. 2). El promotor nitrilasa también fue secuenciado para todos los plásmidos recombinantes, observándose que tampoco hubo mutaciones externas debido al proceso de clonamiento (Anexo 12.1).

7.2.3. Detección de POA producido por la cepa *pncA* WT complementada

Para determinar la concentración de ácido pirazinoico (POA), se realizó una curva estándar. Para ello, se determinaron los valores de absorbancia de un rango de concentraciones conocidas de POA (0.4, 2, 4, 8 y 12 mM) a 450 nm (Figura 15). El coeficiente de determinación (R^2) de la curva estándar fue 0.9965, el cual resulta aceptable para la predicción de las concentraciones de POA producidos por las cepas complementadas y los aislados clínicos.

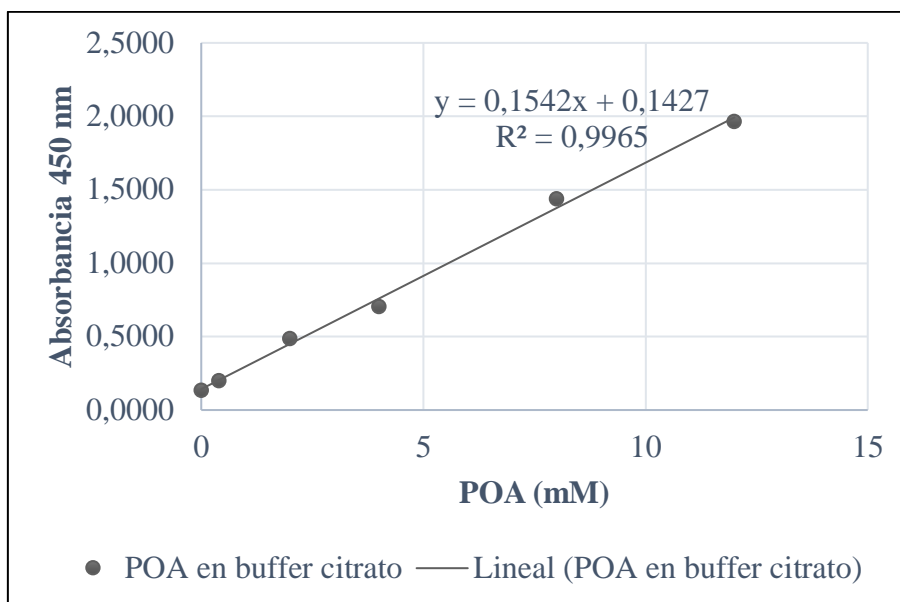


Figura 15. Curva estándar de POA en buffer citrato pH 7.0.

Para calcular la concentración de POA producido, primero se determinó el factor de corrección usando el valor de absorbancia del blanco (Ecuación A) para restar la absorbancia del buffer citrato de los sobrenadantes correspondientes a las cepas complementadas inducidas y no inducidas y de los aislados clínicos (Ecuación B).

Ecuación A

$$FC_{blanco} = \frac{Abs_{450}blanco - m}{b}$$

Ecuación B

$$[POA] = \left(\frac{Abs_{450}CP - m}{b} \right) - FC_{blanco}$$

Donde:

[POA]: concentración de POA (mM)

Abs_{450Mtb} : absorbancia de POA producido por cepa complementada o aislado clínico determinada a 450 nm

$Abs_{450blanco}$: absorbancia del blanco determinada a 450 nm

m: pendiente de la recta de calibrado (curva estándar)

b: ordenada al origen de la recta de calibrado (curva estándar)

$FCblanco$: Factor de corrección del blanco

La cepa complementada con *pncA* WT mostró actividad PZAsa basal, es decir, sin inducir la expresión del gen *pncA* (sin IVN), pues la cantidad de POA detectada fue 0.6 mM, siendo similar al de la cepa H37Rv (0.5 mM de POA), observándose un ligero incremento de intensidad de color para la cepa *pncA* WT complementada con respecto a la cepa H37Rv (Tabla 3, Figura 16). Cabe mencionar que la inducción con 1 μ M de IVN no mostró diferencia con la condición no inducida, lo que indicó que esta concentración no es suficiente para sobreexpresar el gen *pncA* WT. Sin embargo, en condiciones inducidas, empleando 10, 30, 60 y 100 μ M de IVN, se detectó mayor cantidad de POA en comparación a la no inducida, detectándose de 2 a 3 veces más (entre 2.4 a 3.3 mM) (Tabla 3), sin observarse diferencias en la intensidad de color (Figura 16).

Adicionalmente, se evaluó el efecto del inductor sobre las cepas H37Rv y *pncA*-KO, y se verificó que no tuvo ningún efecto (Figura 16).

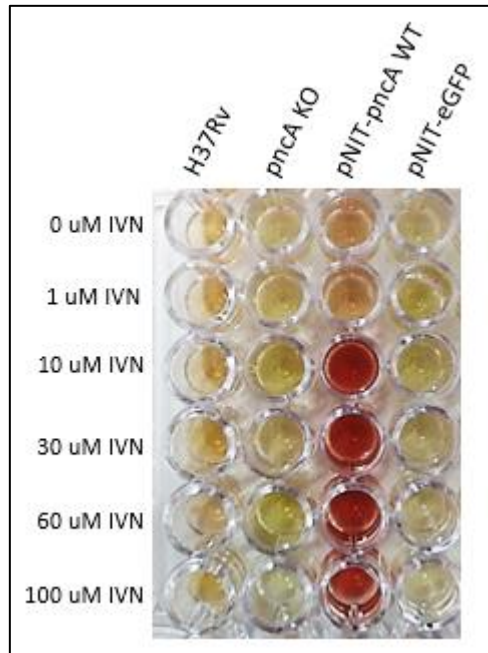


Figura 16. Detección de POA producido por H37Rv y *pncA*-KO, cepa *pncA* WT complementada y cepa pNIT-*eGFP* mediante la prueba de Wayne en buffer citrato pH 7.0.

Tabla 3. Cantidad de POA producido por las cepas H37Rv, *pncA*-KO y cepas pNIT-*pncA* y pNIT-*eGFP*.

Cepa	POA (mM)	Cepa	POA (mM)					
			0 μ M IVN	1 μ M IVN	10 μ M IVN	30 μ M IVN	60 μ M IVN	100 μ M IVN
H37Rv	0.5	pNIT- <i>pncA</i> WT	0.6	0.6	3.2	2.9	2.4	3.3
<i>pncA</i> -KO	0	pNIT- <i>eGFP</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

7.2.4. Medición de los niveles de expresión del gen *pncA* de H37Rv, *pncA*-KO y cepas pNIT-*pncA* y pNIT-*eGFP*

7.2.4.1. Integridad de ARN total

La extracción de ARN total de las cepas complementadas como de los aislados clínicos se realizó mediante el método trizol-cloroformo y precipitación con etanol. Las concentraciones de ARN obtenidos oscilaron entre 1200 a 1500 ng/ μ L (12 a 15 ug de ARN total en 10 uL) a partir de 5 mL de cultivo celular con un OD₆₀₀ = 1.0, y se obtuvieron ratios de A_{260/280} entre 1.85 y 2.0, y de A_{260/230} entre 1.9 y 2.0. En la figura 17 se observan las bandas de las subunidades mayor y menor del ARN ribosomal, 23S y 16S, respectivamente, indicando que el ARN obtenido no estuvo degradado.

Luego del tratamiento con DNAsa I, se obtuvo ~235 ng/ μ L (~ 4.7 ug) de ARN. Finalmente, durante la retrotranscripción se generaron entre 700 a 900 ng/ μ L de cDNA, cuantificado cualitativamente por intensidad de color comparado con diferentes concentraciones de Lambda DNA (Thermo Fisher).

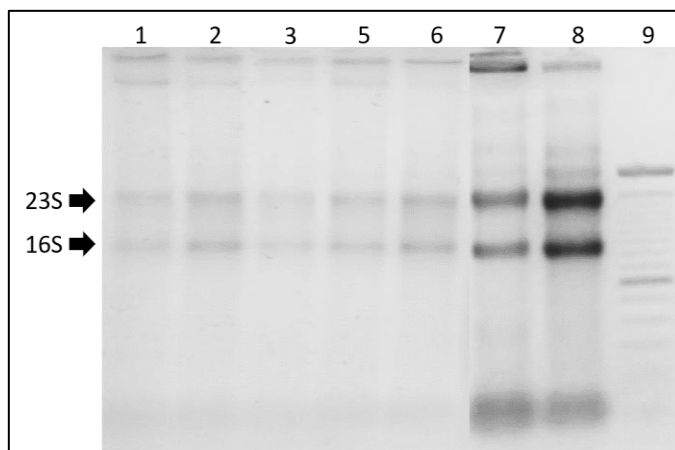


Figura 17. Corrida electroforética de ARN total extraído de *M. tuberculosis pncA* complementadas y de aislados clínicos. Carriles 1 al 6: 1 µg de ARN; carril 7: 2 µg de ARN; carril 8: 3 µg de ARN; carril 9: marcador 100 pb (Invitrogen). Las bandas señaladas 23S y 16S corresponden a las subunidades mayor y menor del ARN ribosomal.

7.2.4.2. Eficiencia de amplificación de los genes *pncA* y 16S

Para verificar la eficiencia de amplificación de los genes *pncA* y 16S se emplearon oligonucleótidos específicos y cDNA de la cepa *pncA* WT inducida (preparada en diluciones seriadas de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000; 1:100000) para la PCR en tiempo real iniciando con 160 ng/µL de cDNA (Tabla 4).

La eficiencia de amplificación para *pncA* fue 113% o 2.26 y el coeficiente de determinación (R^2) fue 0.9961 (Figura 18). Asimismo, la eficiencia de amplificación con los oligonucleótidos 16S fue 95% o 1.9 y el coeficiente de correlación, 0.9941 (Figura 19).

Tabla 4. Parámetros de las curvas estándar para la determinación de eficiencia de qPCR.

Concentración cDNA (ng/μL)	Factor de dilución	Log10	<i>pncA</i>			<i>16S</i>		
			Cq	Copias/μL	σ	Cq	Copias/μL	σ
160	10	1	13.1	124755.7	0.05	4.8	132958.7	0.21
16	100	2	16.4	8316.9	0.12	8.8	8844.0	0.02
1.6	1000	3	19.4	762.4	0.09	12.5	764.6	0.23
0.16	10000	4	21.6	127.6	0.37	15.8	81.7	0.00
0.016	100000	5	24.7	10.2	0.07	18.5	13.8	0.03

La concentración inicial de cDNA obtenida en la retrotranscripción fue 1600 ng, y para la qPCR se realizaron diluciones de cDNA a partir de 160 ng, ya que concentraciones mayores a esta inhibieron la reacción. La PCR en tiempo real para cuantificación de los niveles de expresión de los genes *pncA* y *16S* de las cepas complementadas y de los aislados clínicos se realizó empleando diluciones de 1:10 de cDNA.

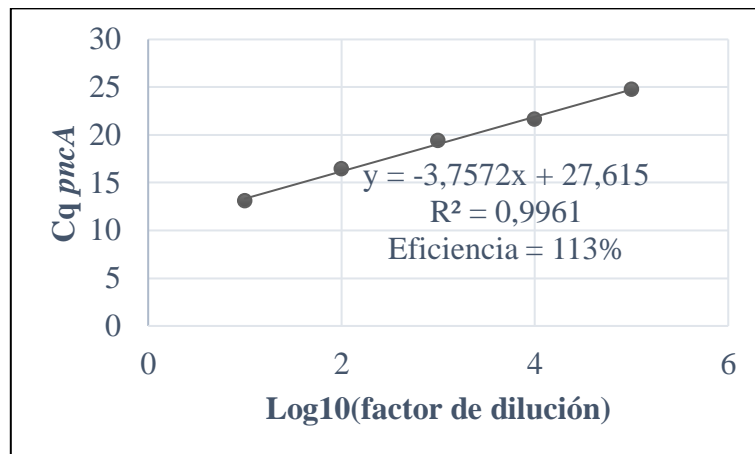


Figura 18. Curva estándar para cálculo de eficiencia de amplificación de *pncA*.

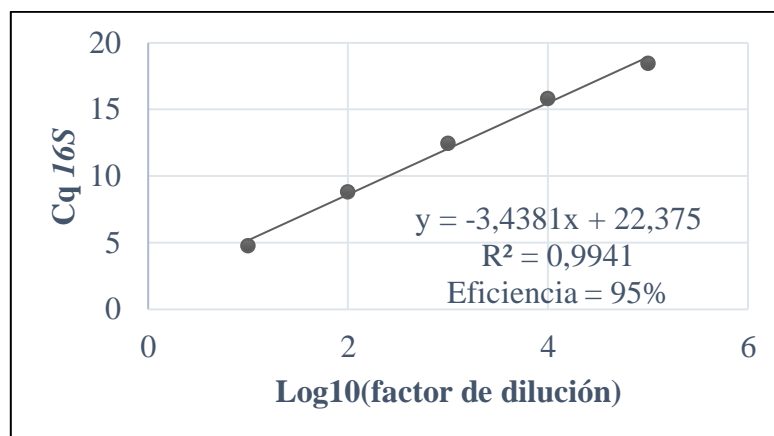


Figura 19. Curva estándar para cálculo de eficiencia de amplificación de 16S.

Previamente, se observó que la cepa *pncA* WT complementada no inducida mostró una producción de POA similar a la cepa H37Rv; por lo contrario, al inducir la expresión con 30 μ M de IVN, se detectó mayor cantidad de POA en comparación a la no inducida, sugiriendo la sobreexpresión del gen *pncA* WT. Por ello, el nivel de expresión del gen *pncA* en las cepa *pncA* WT complementada se determinó en condiciones no inducida e inducida (sólo con 30 μ M de IVN, ya que no se observó diferencia en la producción de POA con el uso de mayores concentraciones de IVN) para observar la diferencia de los niveles de expresión.

El método Livak asume que los genes housekeeping son constantemente expresados sin ser afectados por el tratamiento (en este estudio, inducción con IVN en cepas complementadas), y que la eficiencia de amplificación de los genes target (*pncA*) y housekeeping (16S) deben ser similares (72,73). Estos criterios se cumplieron para la cuantificación relativa de expresión del

gen *pncA* en cepas complementadas como en aislados clínicos mediante el método Livak.

Para normalizar los valores Ct del gen *pncA*, se empleó el gen housekeeping 16S, establecido como tal en diferentes estudios (75,76), el cual mostró valores Ct entre 7.06 y 7.67 (Tabla 5, Anexo 15.C), sugiriendo que el inductor tuvo efecto únicamente sobre el promotor del sistema de expresión pNIT, y su detección fue anticipada a la de los amplicones *pncA*. Adicionalmente, las reacciones sin transcriptasa reversa (control de retrotranscripción) resultaron entre 26.35 a 26.89, observándose una diferencia de valores Ct de 6 con respecto a la cepa H37Rv (Anexo 15.A).

Se observó que la cepa *pncA* WT complementada no inducida mostró un nivel de expresión similar al de la cepa H37Rv ($Ct_{H37Rv} = Ct_{pNIT-pncA}$, Fold Change = 1) (Tabla 5), indicando que el sistema de expresión pNIT permite obtener niveles de expresión basales del gen *pncA* en las cepas complementadas; en cambio, al inducir la expresión del gen *pncA* WT con 30 μ M de IVN, se detectaron 9 veces más el cambio del nivel de expresión de *pncA* en relación a la no inducida.

Las cepas consideradas como control negativo de expresión del gen *pncA*, cepas *pncA*-KO y pNIT-*eGFP*, de las cuales no se observó producción de POA, mostraron valores Ct superiores al de la cepa H37Rv (22.13 y 22.74, respectivamente) (Tabla 5, Anexo 15.A). El nivel de expresión del gen *pncA* de la cepa *pncA*-KO resultó inferior al de la cepa H37Rv (Fold Change = 0.3) (Tabla 5), y de la cepa pNIT-*eGFP* en condiciones no inducida e

inducida fueron 1 y 1.1, indicando la ausencia de mRNAs del gen *pncA* en dicha cepa.

A diferencia de las cepas *pncA* complementadas mediante el sistema pNIT, se conoce que la expresión de los genes *pncA* en las cepas control (H37Rv y *pncA*-KO) se da por su propio promotor, además, se verificó que el inductor no tuvo ningún efecto sobre la producción de POA por la cepa H37Rv, por ello, no fue necesario determinar los niveles de expresión de *pncA* para ambas cepas en presencia de inductor.

Tabla 5. Parámetros de niveles de expresión de los genes *pncA* y 16S

Gen	Cepa	Expresión basal		Expresión inducida	
		Ct	Fold change	Ct	Fold change
<i>pncA</i>	H37Rv	20.63	1.0	nd	Nd
<i>16S</i>		7.67		nd	
<i>pncA</i>	<i>pncA</i> -KO	22.13	0.3	nd	Nd
<i>16S</i>		7.06		nd	
<i>pncA</i>	pNIT- <i>pncA</i> WT	20.60	1.0	17.55	9.1
<i>16S</i>		7.10		7.24	
<i>pncA</i>	pNIT- <i>eGFP</i>	22.74	1.0	22.81	1.1
<i>16S</i>		7.31		7.47	

Los cambios de los niveles de expresión (Fold Change) fueron determinados empleando el método Livak (72). La expresión del gen *pncA* de la cepa H37Rv fue considerada como control de referencia o de calibración (Fold Change = 1) para la determinación de los cambios de los niveles de expresión del gen *pncA* (Fold Change) de la cepa *pncA*-KO. Para las cepas complementadas, hubo dos tratamientos, una sin inducir y otra inducida con 30 μ M de IVN. El grupo sin inducir se consideró como control de calibración, donde los valores Fold Change fueron iguales a 1). La qPCR para la cepa H37Rv y *pncA*-KO en condición inducida no

fue necesaria, pues se observó que el inductor no tuvo efecto sobre estas cepas (nd: no determinado).

7.2.5. Inmunodetección de PZAsa

La enzima PZAsa producida por la cepa *pncA* WT complementada en condiciones no inducida e inducida fue detectada mediante Western Blot, donde se observó la diferencia de intensidad de las bandas (Figura 15, carriles 1 y 2), corroborando que la inducción de la sobreexpresión y la expresión basal del gen *pncA* fueron directamente proporcional a los niveles de expresión, mencionados anteriormente.

En la figura 20 se observa una banda con mayor intensidad de color. Este representa a la PZAsa recombinante producida en *E. coli* (Figura 21, carril 3), empleada como control positivo de inmunodetección. También se observó la detección inespecífica de otras proteínas. El peso molecular de las PZAsas fue de 22 kDa.

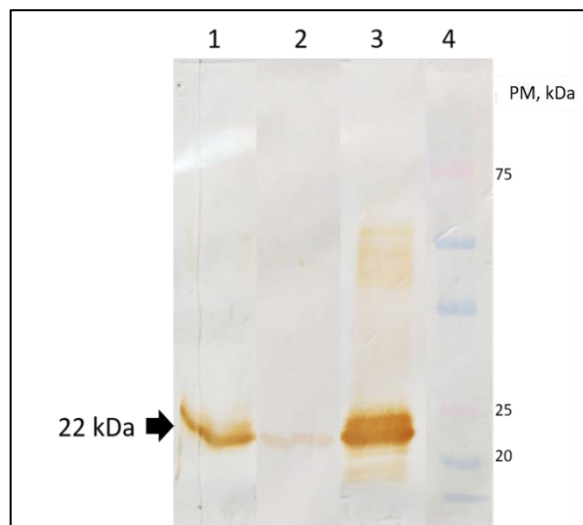


Figura 20. Inmunodetección de PZAsa por Western Blot. Carril 1: PZAsa de *M. tuberculosis pncA* WT complementada en condición inducida (30 uM IVN), carril

2: PZAsa de *M. tuberculosis pncA* WT complementada en condición no inducida, carril 3: PZAsa recombinante producida en *E. coli*, carril 4: marcador dual color (Biorad).

7.2.6. Verificación de la estabilidad intracelular de pNIT-*pncA* en las cepas complementadas

Adicionalmente, se corroboró la estabilidad de los plásmidos pNIT-*pncA* dentro de la cepa *pncA*-KO. Para ello se realizaron pasajes de las cepas complementadas en medio 7H9 enriquecido sin el antibiótico de selección (kanamicina), para después comprobar la actividad PZAsa mediante la prueba de Wayne convencional.

Se lograron realizar 6 poblaciones, en las cuales se observaron que tanto el plásmido pNIT-*pncA* como la actividad PZAsa se mantuvieron en el tiempo, a pesar de que los pasajes se realizaron sin antibiótico de selección (Anexo 14).

7.3. Medición de parámetros fenotípicos de las cepas *pncA* complementadas y aislados clínicos

7.3.1. Determinación de los niveles de expresión de los genes *pncA* en *M. tuberculosis* complementadas y en aislados clínicos

Anteriormente, se mencionó que el nivel de expresión del gen *pncA* WT en la cepa complementada en condición no inducida es igual al de la cepa H37Rv, y en condición inducida supera hasta 9 veces el nivel de expresión de *pncA*.

Todas las cepas *pncA* complementadas tuvieron un nivel de expresión basal constante, obteniéndose valores Ct entre 20.32 a 20.69, Fold Change = 1 (Tabla 6, Anexo 15.A). Sin embargo, se observaron diferencias en los valores Ct y, por tanto, en los niveles de expresión de los genes *pncA* mutantes de los aislados clínicos CSV4644 y MDRDM1098, que tuvieron un nivel de expresión de 0.4, siendo similares al de la cepa *pncA*-KO; pero de los aislados CSV5769 y CSV10399, fueron similares al de la cepa H37Rv (Tabla 6). Esto no se observó en las cepas *pncA* complementadas no inducidas, pues los valores Ct de los genes *pncA* WT y mutantes no fueron variables.

Los niveles de expresión post-inducción de los genes *pncA* en las cepas complementadas fueron superiores al de las cepas complementadas no inducidas, siendo altamente significativas ($P < 0.005$) (Figura 21); sin embargo, no resultaron similares en todas las cepas complementadas. Para las cepas complementadas con los genes *pncA* WT, y las mutantes D49N y F94L, los valores de Fold Change fueron cercanos (8.7 y 9.1, respectivamente), en cambio, para las cepas complementadas con los genes

pncA mutantes H51R y G78C fueron 14.2 y 15.4, respectivamente, mostrando diferentes patrones de amplificación (Anexo 15.B).

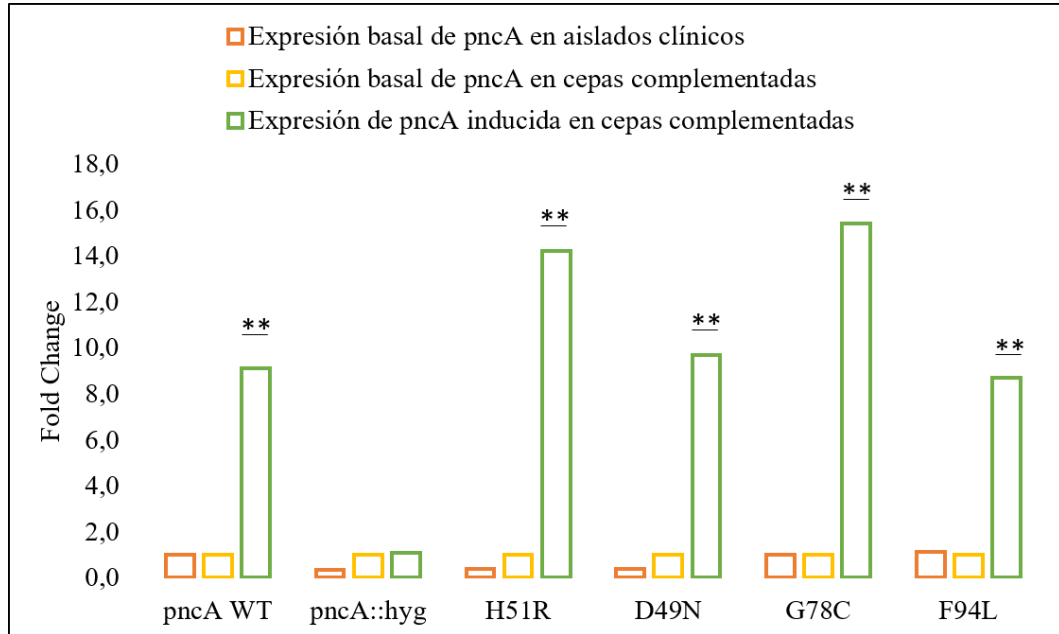


Figura 21. Distribución de los niveles de expresión del gen *pncA* de los aislados clínicos y de las cepas complementadas en condiciones no inducida e inducida. Las cepas H37Rv y *pncA*-KO fueron incluidas dentro del grupo de aislados clínicos, ya que son controles de dicho grupo. Los niveles de expresión del gen *pncA* de la cepa pNIT-*eGFP*, considerada como control negativo de las cepas *pncA* complementadas, se encuentra en el grupo *pncA*::*hyg*.

Tabla 6. Parámetros de expresión de los genes *pncA* de aislados clínicos y de cepas complementadas.

Gen	Aislados clínicos	Expresión basal				Cepas complementadas	Expresión basal (**)		Expresión inducida			
		Ct	Fold change	σ	CV		Ct	Fold change	Ct	Fold change	σ	CV
<i>pncA</i>	H37Rv(*)	20.63	1.0	0	0	pNIT-<i>pncA</i> WT	20.60	1.0	17.55	9.1	0.5	6
<i>16S</i>		7.67					7.10		7.24			
<i>pncA</i>	<i>pncA</i>-KO	22.13	0.3	0.1	39	pNIT-eGFP	22.74	1.0	22.81	1.1	0	2
<i>16S</i>		7.06					7.31		7.47			
<i>pncA</i>	CSV4644	22.33	0.4	0.2	43	pNIT-H51R	20.47	1.0	16.54	14.2	0.6	4
<i>16S</i>		7.52					7.52		7.41			
<i>pncA</i>	MDRDM1098	22.57	0.4	0.1	31	pNIT-D49N	20.45	1.0	17.18	9.7	1.8	18
<i>16S</i>		7.81					7.24		7.24			
<i>pncA</i>	CSV5769	20.78	1.0	0.3	31	pNIT-G78C	20.69	1.0	16.73	15.4	0.8	5
<i>16S</i>		7.48					7.26		7.24			
<i>pncA</i>	CSV10399	20.45	1.1	0.1	11	pNIT-F94L	20.32	1.0	17.27	8.7	1.6	18
<i>16S</i>		7.55					7.26		7.32			

(*) Los valores Ct y los niveles de expresión (Fold Change) de esta tabla representan el promedio de amplificaciones de cada gen por triplicado. La cepa H37Rv fue considerada como control referencial para calcular los cambios en los niveles de expresión de la cepa *pncA*-KO y de los aislados clínicos. (**) Cada una de las cepas complementadas no inducidas se consideraron como control (sin tratamiento) de las cepas complementadas inducidas.

7.3.2. Medición de la cantidad de POA producido por las PZAsas de *M. tuberculosis pncA* complementadas y de aislados clínicos

La prueba de Wayne en buffer citrato permitió estimar colorimétrica y cuantitativamente la cantidad de POA producido por los aislados clínicos y las cepas complementadas en condiciones no inducida e inducida con determinadas concentraciones de IVN.

Se confirmó que en la cepa *pncA* WT complementada se restauró la expresión basal del gen *pncA* y se codificó una PZAsa funcional que produjo cantidades similares de POA al de la cepa H37Rv, que, además, resultaron altamente significativas en comparación a las cepas complementadas con los genes *pncA* mutantes y aislados clínicos ($P < 0.005$) (Figura 24). Sin embargo, la inducción con IVN, a partir de 10 μM , promovió la sobreexpresión del gen *pncA*, y, por tanto, al incremento intracelular de la concentración de PZAsa. Debido a este efecto, se detectó hasta 3.3 mM de POA (Tabla 7), mostrando diferencias altamente significativas en relación a las demás cepas complementadas ($P < 0.005$), excepto con la cepa complementada con la mutante F94L (Figura 24).

Las cepas complementadas con los *pncA* mutantes G78C y F94L no mostraron actividad PZAsa basal, pero la inducción con 10, 30, 60 y 100 μM de IVN promovieron la producción de POA (Figura 22), obteniéndose 1.0 a 1.3 mM y 1.3 a 1.8 mM de POA, respectivamente (Tabla 7).

Cabe mencionar que las cepas complementadas con las mutantes G78C y F94L produjeron menor cantidad de POA post-inducción, a partir de 10 μ M, en relación a la cepa complementada con el gen *pncA* WT. Sin embargo, las mutantes D49N y H51R no produjeron POA a pesar de la presencia del inductor en altas concentraciones (Figura 22; Tabla 7).

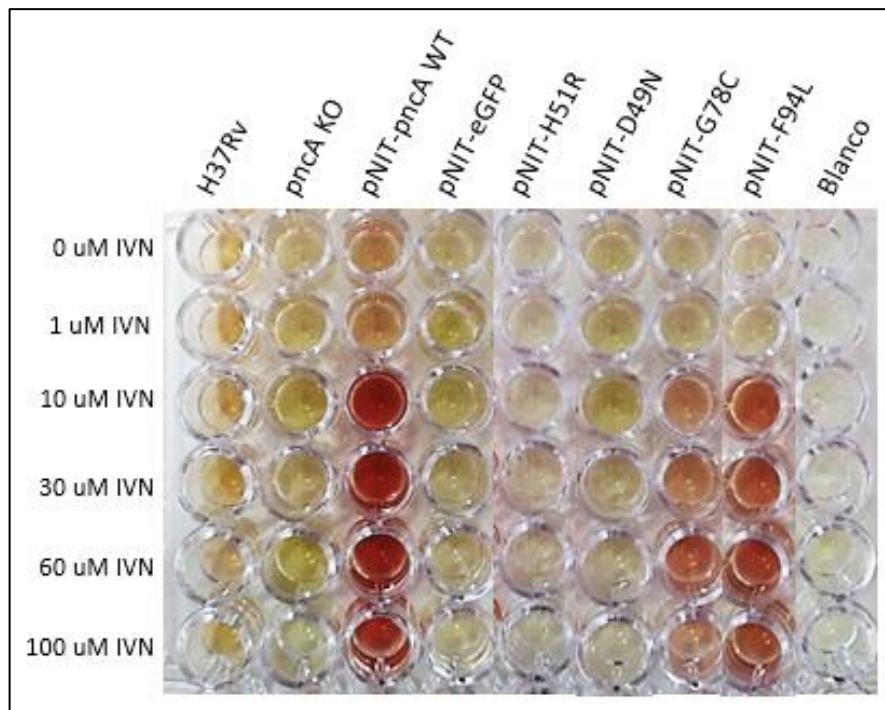


Figura 22. Detección de POA producido por cepas complementadas, H37Rv y *pncA*-KO mediante la prueba de Wayne en buffer citrato pH 7.0. La cepa H37Rv fue considerada como control positivo de actividad PZAsa de aislados clínicos, y se observó que el inductor no tuvo efecto sobre dicha cepa. La cepa *pncA*-KO fue considerada como control negativo de actividad PZAsa de aislados clínicos. La cepa pNIT-*pncA* WT y la cepa pNIT-*eGFP* fueron empleadas como control positivo y control negativo de actividad PZAsa de cepas complementadas, respectivamente.

La cepa *M. tuberculosis* H37Rv, considerada como control positivo, mostró mayor producción de POA (0.5 mM) en relación a los aislados clínicos, observándose una diferencia altamente significativa ($P < 0.005$) (Tabla 7, Figura 24). La cepa *pncA*-KO no mostró producción de POA, así como la cepa *pNIT-eGFP*.

Los aislados clínicos evaluados en este estudio (CSV4644, MDRDM1098, CSV5769 y CSV10399) no mostraron producción de POA cualitativa ni cuantitativamente (Tabla 7, Figura 23).

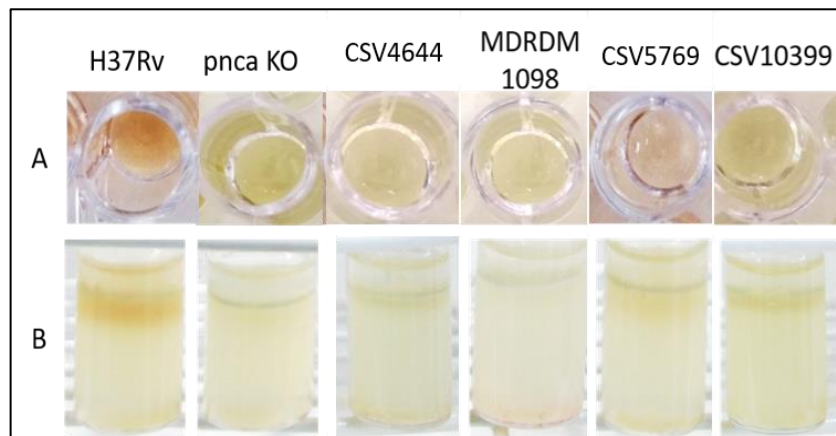


Figura 23. Prueba de Wayne en buffer citrato a pH 7.0 (A) y en medio sólido Dubos (B) para la detección de POA en aislados clínicos.

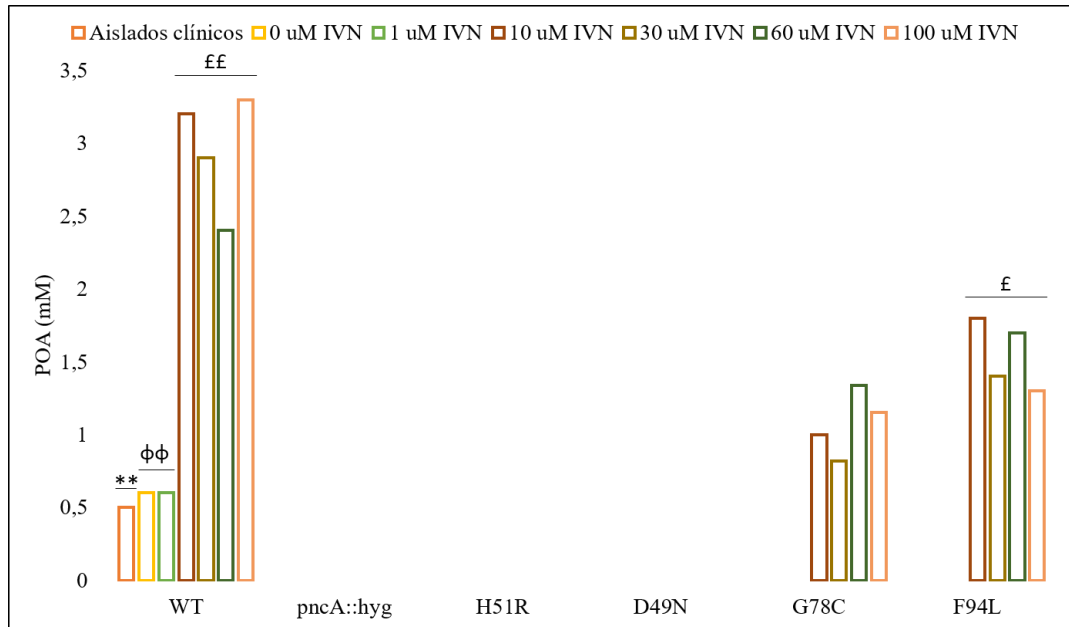


Figura 24. Distribución de los niveles de producción de POA de aislados clínicos y de cepas complementadas con genes *pncA* WT y mutantes. La significancia estadística de la cantidad de POA producido por la cepa H37Rv (barra con borde anaranjado, grupo *pncA* WT), fue simbolizada con ** (P<0.005), para la cepa *pncA* WT complementada no inducida, φφ, P<0.005. La significancia de las cantidades de POA producidos por las cepas complementada con *pncA* WT y F94L inducidas fueron simbolizadas con ££, P<0.005, y £, P<0.05, respectivamente, en relación a las cepas complementadas con las mutantes H51R, D49N, y G78C.

Tabla 7. Cuantificación de POA producido por aislados clínicos y cepas complementadas con genes *pncA* WT y mutantes inducidas y no inducidas.

Aislados clínicos	Mutación	POA (mM)	Cepas complementadas	POA (mM)						valor P	R ²
				0 μM IVN	1 μM IVN	10 μM IVN	30 μM IVN	60 μM IVN	100 μM IVN		
H37Rv	WT	0.5	pNIT-<i>pncA</i> WT	0.6	0.6	3.2	2.9	2.4	3.3	0.009	0.852
<i>pncA</i>-KO	<i>pncA</i>::<i>hyg</i>	0.0	pNIT-<i>eGFP</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	Nd	Nd
CSV4644	H51R	0.0	pNIT-H51R	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	Nd	Nd
MDRDM1098	D49N	0.0	pNIT-D49N	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	Nd	Nd
CSV5769	G78C	0.0	pNIT-G78C	0.0	0.0	1.0	0.8	1.3	1.2	0.108	0.515
CSV10399	F94L	0.0	pNIT-F94L	0.0	0.0	1.8	1.4	1.7	1.3	0.017	0.796

Las cepas complementadas fueron sometidas a diferentes concentraciones de IVN para evaluar su efecto sobre las PZAsas mediante la prueba de Wayne en buffer citrato pH 7.0. La cuantificación de POA producida por las cepas se realizó por duplicado, obteniéndose el promedio. La dependencia de las concentraciones de IVN sobre la actividad de cada PZAsa se evaluó mediante el modelo de regresión lineal, considerando la significancia estadística si $P < 0.05$. Los valores P y R^2 para las cepas pNIT-*eGFP*, D49N y H51R no fueron determinadas (Nd) ya que no hubo producción de POA (0 mM de POA)

7.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de PZA en *M. tuberculosis pncA* complementadas y en aislados clínicos

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de PZA en las cepas de *M. tuberculosis pncA* complementadas [*M. tuberculosis pncA::hyg(pNIT-pncA)*] fueron evaluadas a pH 6.0 en condiciones no inducida e inducida (únicamente con 30 μ M de IVN), y las concentraciones de PZA empleadas fueron 80, 100, 300 y 1000 μ g/mL. Se redujo el pH del medio ya que la forma activa de PZA, POA, actúa de manera letal sobre *M. tuberculosis* a pH ácido (77), pero no debe ser menor a 6.0 ya que el crecimiento uniforme de las cepas de *M. tuberculosis* puede ser inhibida (26,78). La CMI de PZA fue considerada si el OD₆₀₀ era <0.1 y si este se mantenía después de la medición (1 semana después).

Las cepas pNIT-*pncA* WT no inducida e inducida y H37Rv mostraron una reducción gradual del crecimiento bacteriano conforme se incrementaron las concentraciones de PZA en el medio de cultivo, donde la CMI fue 100 μ g/mL para la cepa *pncA* WT complementada en condición no inducida (OD₆₀₀ = 0.09), y 80 μ g/mL de PZA para las cepas *pncA* WT complementada en condición inducida y H37Rv (OD₆₀₀ = 0.08 y 0.09, respectivamente) (Tabla 8 y 9), mostrando diferencias significativas (P<0.005) con las demás cepas *pncA* complementadas y aislados clínicos.

Las cepas complementadas con genes *pncA* mutantes H51R, D49N y F94L, inducidas (con 30 μ M de IVN) así como no inducidas fueron altamente

resistentes a PZA (>1000 µg/mL) (OD₆₀₀ >0.1) (Tabla 9), excepto la cepa pNIT-G78C, ya que la CMI de PZA resultó 1000 µg/mL (OD₆₀₀ = 0.09), sin observarse diferencias significativas (Tabla 9). Los aislados clínicos CSV4644, MDRDM1098, CSV5769 y CSV10399, con mutaciones H51R, D49N, G78C y F94L, respectivamente, en el gen *pncA*, también resultaron altamente resistentes a PZA (>1000 g/mL) (OD₆₀₀ > 0.1) (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros de susceptibilidad a PZA en aislados clínicos.

Aislados clínicos	Mutación	OD₆₀₀	CMI PZA (µg/mL)	valor P	ρ
H37Rv	WT	0.09	80	0.00	-1
<i>pncA</i>-KO	<i>pncA</i>::<i>hyg</i>	0.33	>1000	0.19	-0.7
CSV4644	H51R	0.26	>1000	0.23	-0.5
MDRDM1098	D49N	0.25	>1000	0.62	0.3
CSV5769	G78C	0.57	>1000	0.32	-0.6
CSV10399	F94L	0.13	>1000	0.28	-0.6

Las diferencias estadísticas del crecimiento bacteriano de cada uno de los aislados clínicos expuestos a 80, 100, 300 y 1000 µg/mL de PZA se determinaron mediante la correlación de Spearman, si P<0.05. Los valores OD₆₀₀ representan las densidades celulares medidos en los cultivos donde fueron susceptibles a PZA (en este caso H37Rv), o los cultivos expuestos a 1000 µg/mL de PZA, sugiriendo alta resistencia a PZA.

Tabla 9. Parámetros de susceptibilidad a PZA en cepas *pncA* complementadas no inducidas e inducidas

Cepas complementadas	Condición no inducida				Condición inducida			
	OD ₆₀₀	CMI PZA (µg/mL)	valor P	ρ	OD ₆₀₀	CMI PZA (µg/mL)	valor P	ρ
pNIT-<i>pncA</i> WT	0.09	100	0	-1	0.08	80	0.04	-0.9
pNIT-eGFP	0.7	>1000	0.28	-0.6	0.42	>1000	0.28	-0.6
pNIT-H51R	0.59	>1000	0.5	0.4	0.48	>1000	0.19	-0.7
pNIT-D49N	0.5	>1000	0.87	0.1	0.66	>1000	0.1	-0.8
pNIT-G78C	0.09	1000	0.55	-0.359	0.09	1000	0.62	-0.3
pNIT-F94L	0.32	>1000	0.32	-0.564	0.24	>1000	0.62	-0.3

Las diferencias estadísticas del crecimiento bacteriano de cada una de las cepas complementadas inducidas y no inducidas expuestas a 80, 100, 300 y 1000 µg/mL de PZA se determinaron mediante la correlación de Spearman, si $P < 0.05$. Los valores OD₆₀₀ representan las densidades celulares medidos en los cultivos donde fueron susceptibles a PZA (en este caso H37Rv), o los cultivos expuestos a 1000 µg/mL de PZA, sugiriendo alta resistencia a PZA.

7.4. Relación entre mutaciones en el gen *pncA* y parámetros fenotípicos de las cepas complementadas y de los aislados clínicos

La cantidad de POA producido por los aislados clínicos resultaron iguales al de las cepas complementadas con los genes *pncA* mutantes en condiciones no inducidas (0 mM de POA). Sin embargo, en condiciones inducidas, las cepas complementadas con las mutantes G78C y F94L promovieron la producción de POA por el incremento intracelular de PZAsas (Tabla 10). Por ello, se puede mencionar que la sobreexpresión permite verificar si una mutación en el gen *pncA* resulta crítica o no.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de PZA en las cepas complementadas con las mutantes D49N, H51R y F94L fueron similares a sus correspondientes aislados clínicos (MDRDM1098, CSV4644 y CSV10399, respectivamente) (Tabla 10), indicando que la variación genética en los aislados clínicos no influyó en la resistencia a PZA, sino la mutación *per se*. De manera contraria, la CMI de PZA en la cepa complementada con la mutante G78C fue 1000 µg/mL, y para su correspondiente aislado clínico (CSV5769) fue >1000 ug/mL, sugiriendo que otros mecanismos alternativos influyen de cierta manera en la resistencia a PZA. Cabe señalar que la sobreexpresión de los genes *pncA* mutantes (G78C y F94L) no tuvo efecto sobre la determinación de susceptibilidad a PZA, sino se atribuye al efecto de la mutación *per se*.

Por último, se observó notoria diferencia en los niveles de expresión de los genes *pncA* de los aislados clínicos en comparación a las cepas complementadas

con *pncA* mutantes, pues para los aislados clínicos se observaron niveles variados de expresión de *pncA*, y para las cepas *pncA* complementadas en condiciones no inducidas, los niveles de expresión de *pncA* fueron constantes (Tabla 10), excluyendo un factor más que probablemente influye en la resistencia a PZA. Los niveles de expresión en las cepas complementadas en condiciones inducidas no fueron constantes, probablemente porque la cantidad de inductor no se distribuyó de manera homogénea en el cultivo, por lo que no logra ingresar en todas las células.

Tabla 10. Comparación entre parámetros fenotípicos de aislados clínicos y de cepas *pncA* complementadas.

Aislados clínicos	POA (mM)	CMI PZA (µg/mL)	Fold Change	Cepa complementada	POA (mM)		CMI de PZA (µg/mL)		Fold Change	
					0 uM IVN	30 uM IVN	0 uM IVN	30 uM IVN	0 uM IVN	30 uM IVN
H37Rv	0.5	80	1	pNIT-<i>pncA</i> WT	0.6	2.9	100	80	1	9.1
CSV4644	0.0	>1000	0.4	pNIT-H51R	0.0	0.0	>1000	>1000	1	14.2
MDRDM1098	0.0	>1000	0.4	pNIT-D49N	0.0	0.0	>1000	>1000	1	9.7
CSV5769	0.0	>1000	1	pNIT-G78C	0.0	0.8	1000	1000	1	15.4
CSV10399	0.0	>1000	1.1	pNIT-F94L	0.0	1.4	>1000	>1000	1	8.7

Los parámetros fenotípicos de las cepas complementadas, en condiciones no inducidas (0 µM IVN) e inducidas (30 µM IVN), fueron comparados con los parámetros de los aislados clínicos.

7.4.1. Asociación entre constante catalítica de PZAsas recombinantes y cantidad de POA producido por cepas complementadas

Para contrastar los resultados de la cantidad de POA producido por las cepas *pncA* complementadas obtenidos en este estudio con los de Sheen *et al.* (15), se recopilaron los valores de la constante catalítica (k_{cat}) y de actividad de las PZAsas recombinantes de las mutantes H51R, D49N, G78C y F94L, y se determinó la correlación de dichos parámetros.

La constante catalítica (k_{cat}) de las PZAsas recombinantes resultó significativamente asociada con la cantidad de POA producido por las cepas *pncA* complementadas en condición inducida ($P < 0.005$), siendo similar con la asociación entre k_{cat} y actividad enzimática de las PZAsas recombinantes (Tabla 11). Esta asociación sugiere que la inducción de la expresión de los genes *pncA* mutantes permitiría evaluar parámetros cinéticos en la misma célula (*in vivo*).

Por último, se determinó que no hubo asociación entre la cantidad de POA producido por las cepas *pncA* complementadas en condición no inducida con la constante catalítica de las PZAsas recombinantes ($P > 0.005$), por lo que la inducción es necesaria para evaluar parámetros cinéticos.

Tabla 11. Correlación entre k_{cat} vs POA producido por cepas *pncA* complementadas y PZAsas recombinantes

PZAsa	Cepas <i>pncA</i> complementadas		PZAsas recombinantes (*)	
	POA _{CNI} (mM)	POA _{CI} (mM)	Actividad PZAsa (umol POA min ⁻¹ mg ⁻¹ PZAsa)	k_{cat} (min ⁻¹)
PZAsa WT	0.6	2.9	38.4	1005.41
H51R	0.0	0.0	0.006	0.17
D49N	0.0	0.0	0.045	1.53
G78C	0.0	0.8	6.96	105.16
F94L	0.0	1.4	21.19	712.92
	ρ		valor P	
k_{cat}-POA_{CNI}	0.7071		0.1817	
k_{cat}-POA_{CI}	0.9747		0.0048	
k_{cat}-actividad de PZAsa recombinante	1.000		0.0000	

(*) Los valores de actividad PZAsa y k_{cat} mostrados en esta tabla fueron recopilados del estudio realizado por Sheen *et al.* (15). Las PZAsas recombinantes fueron producidas en *E. coli*, y se purificaron para medir parámetros enzimáticos. La correlación fue calculada por la prueba de Spearson. POA_{CNI}: cantidad de POA producido por cepas *pncA* complementadas en condición no inducida. POA_{CI}: cantidad de POA producido por cepas *pncA* complementadas en condición inducida.

VIII. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio donde se propuso y se logró obtener una herramienta para evaluar el efecto de las mutaciones en el gen *pncA* sobre parámetros fenotípicos en una cepa H37Rv *pncA*-KO, controlando la variabilidad genética.

El fenotipo de la cepa *pncA*-KO, inicialmente resistente a PZA, fue restaurado mediante la complementación con el gen *pncA* WT, donde se observó que la actividad PZAsa WT, nivel de expresión del gen *pncA* y susceptibilidad a PZA fueron similares al de la cepa H37Rv. Adicionalmente, los plásmidos pNIT-*pncA* se mantuvieron estables intracelularmente, proporcionando niveles de expresión basal constantes en todas las cepas complementadas (Figura 24). En cambio, el nivel de expresión de *pncA* de los aislados clínicos con mutaciones H51R y D49N fueron inferiores al de la cepa H37Rv. De manera importante, se observó que la sobreexpresión de los genes *pncA* mutantes G78C y F94L en las cepas complementadas permitió determinar que dichas mutaciones realmente confieren resistencia a PZA (Tabla 10).

Diversos investigadores hicieron posible el uso de herramientas de manipulación genética en *M. tuberculosis*, lo cual permitió estudiar mecanismos de resistencia a drogas, vías de señalización que promueven la patogenicidad y virulencia, mediante el uso de plásmidos y micobacteriófagos que permiten la transferencia de ADN foráneo al interior de la micobacteria (20,59,61). Para ello, existen vectores suicidas episomales e integrativos (21,61) que cumplen diferentes roles, como intercambio alélico, mutagénesis dirigida, y complementación de genes (61,79). Esta última estrategia involucra la capacidad de restaurar el fenotipo inicial de una cepa mutante (80)

En este estudio se empleó el vector episomal multicopia pNIT-1 (19), el cual no requiere recombinarse en el genoma bacteriano. pNIT es un sistema de expresión que permitió la expresión basal y sobreexpresión de los genes *pncA* en la cepa *pncA*-KO. A pesar de que no existen vectores extracromosomales de copia única para *M. tuberculosis*, y de que el uso de vectores de copia única son más adecuados para estudios de complementación (57), el vector pNIT permitió mantener un nivel de expresión estable de los genes *pncA*, además, permitió verificar si la sobreexpresión de los genes *pncA* mutantes compensaría la pérdida de actividad PZAsa .

Si bien los vectores integrativos, los cuales son de copia única y permiten la incorporación del gen de interés en el genoma mediante recombinación homóloga (81), los vectores episomales, como pNIT, que no se incorporan en el genoma bacteriano, estos no alteran los procesos de transcripción de otros genes, y, además, permiten sobreexpresar el gen de interés; no obstante, se discute la estabilidad de los plásmidos en el medio intracelular (82,83). En este estudio se confirmó la estabilidad de los plásmidos pNIT-*pncA* intracelularmente a través del tiempo (6 poblaciones, evaluadas durante 18 semanas), por lo que el uso de este sistema en *M. tuberculosis* permite evaluar diversos parámetros durante largos periodos incluso sin el antibiótico de selección.

pNIT es un sistema de expresión con el que se pueden emplear compuestos nitrilo como isovaleronitrilo (IVN) para inducir la expresión de un determinado gen (19). En este estudio, el uso de diferentes concentraciones del inductor IVN no permitió la regulación dosis-dependiente de la expresión de los genes *pncA* en la cepa complementada, pues no se observaron diferencias significativas en la cantidad de

POA detectado cuando las cepas complementadas fueron expuestas con 10, 30, 60 y 100 μM de IVN (Figura 16). Es probable que la presencia de un regulador positivo en pNIT podría explicar que el uso de 10 μM a más de IVN no genera dependencia, pues este regulador maximiza la sobreexpresión del gen de interés hasta con 5 μM de IVN (19). Adicionalmente, en el estudio donde se reporta la síntesis y aplicación del sistema pNIT, menciona que la expresión del gen de interés no se incrementó de manera dosis-dependiente empleando IVN (19).

Cabe mencionar que la inducción con 1 μM de IVN en las cepas complementadas no tuvo diferencia con la condición no inducida, y en ambas condiciones se observó actividad PZAsa basal, similar al de la cepa H37Rv, lo cual es conferido por la proteína reguladora codificada por el regulador positivo *nitR* del sistema pNIT, que controla al promotor *nitA*, por lo que favoreció la expresión de *pncA* (19).

En un estudio realizado por Sheen *et al.* (2009) evaluaron los parámetros cinéticos *in vitro* de PZAsas con mutaciones puntuales producidas en *E. coli.*, y determinaron que las mutantes G78C y F94L tuvieron menor actividad PZAsa en relación a la PZAsa wild type, y las mutaciones D49N y H51R ocasionaron actividad enzimática nula (15). Sin embargo, la evaluación de parámetros cinéticos *in vitro* omite factores como la concentración de metabolitos, modificaciones post-traduccionales, efectos termodinámicos, moléculas inhibitoras o activadoras (84), por lo que la herramienta generada en este estudio, que refleja condiciones *in vivo*, permitió evaluar el efecto de las mutaciones sobre la actividad enzimática de las PZAsas mutantes en el mismo hospedero.

En este estudio se determinó que las cepas complementadas con las mutantes G78C y F94L no inducidas, identificadas en los aislados clínicos CSV5769 y CSV10399, respectivamente, tuvieron el mismo patrón de color, mostrando 5 veces menor actividad PZAsa que el de la cepa H37Rv; sin embargo, cuando se sobreexpresaron dichas mutantes, se observó producción de POA (Figura 22). Con esto, se puede mencionar que con la sobreexpresión de genes *pncA* mutantes en una cepa H37Rv *pncA*-KO se puede corroborar si la PZAsa mutante se encuentra parcialmente funcional.

El incremento de POA intracelular, a causa de la sobreexpresión de *pncA*, impulsa el equilibrio de gradiente de concentración con el medio extracelular. esto podría explicar porqué las cepas complementadas con las mutantes G78C y F94L en condiciones no inducidas no produjeron POA, pero cuando se incrementó la concentración de las PZAsas mutantes se observó producción de POA, detectándose POA extracelular. Por otro lado, lo más lógico que supone la baja actividad de estas mutantes, observada en condiciones inducidas, es que dichas mutaciones probablemente afectan la unión eficiente del cofactor y del sustrato a los sitios de coordinación con metales y sitio activo, respectivamente, produciendo cambios conformacionales o alteraciones físico-químicas en la PZAsa (85). Adicionalmente, cabe señalar que los aminoácidos iniciales y los sustitutos de estas mutantes pertenecen a la familia de los no polares, por lo que las mutaciones ocurridas son sinónimas (86).

Por otro lado, las cepas complementadas con las mutantes D49N y H51R, y sus correspondientes aislados clínicos, no mostraron actividad en ninguna de las condiciones, del mismo modo, la sobreexpresión de dichas mutantes no compensó

la pérdida de funcionalidad enzimática, lo cual indicó que estas mutaciones afectan al 100% la actividad enzimática, ya que la sustitución de dichos aminoácidos se encuentran en el sitio de coordinación con metales (15). Estructuralmente, estas dos mutaciones cambian la carga electrostática del sitio de coordinación con metales, que repelen a los cationes divalentes (ej. Fe^{+2}), y esto afecta fuertemente eliminando la función enzimática (87).

La complementación del gen *pncA* WT en la cepa *pncA*-KO, influyó en el crecimiento de la cepa durante la exposición a PZA, pero los niveles de susceptibilidad en condiciones inducida y no inducida fueron ligeramente diferentes. La CMI de PZA en la cepa *pncA* WT complementada en condición inducida fue comparable con la cepa H37Rv (CMI = 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sin embargo, la cepa *pncA* WT complementada no inducida resultó susceptible con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PZA. Esto podría explicarse porque se observó que existe una ligera expresión del gen *pncA* noqueado en la cepa *pncA*-KO, sugiriendo que la PZAsa codificada a partir de los mRNA del gen *pncA* interrumpido por el cassette de higromicina podría crear cierta interferencia con la evaluación de susceptibilidad a PZA.

Las cepas complementadas con genes *pncA* mutantes H51R, D49N, G78C, y F94L en condiciones inducidas y no inducidas resultaron altamente resistentes a PZA, sugiriendo que a pesar de la sobreexpresión de los genes y de la actividad parcial de las mutantes G78C y F94L, estas generan alta resistencia a PZA. Si bien, la sobreexpresión de los genes *pncA* permitió verificar si la actividad PZAsa era nula o relativamente afectada, se puede mencionar que las mutantes evaluadas en este estudio son responsables de la adquisición de resistencia a PZA.

Los aislados clínicos y sus correspondientes cepas complementadas con mutantes D49N, H51R y F94L tuvieron un CMI >1000 µg/mL, sin embargo, se determinó que la cepa complementada con la mutante G78C fue susceptible con 1000 µg/mL, y el aislado clínico con dicha mutación tuvo una CMI >1000 µg/mL. Esta diferencia de CMI de PZA probablemente sea atribuida a la variabilidad genética identificada en el aislado clínico (17), del cual se clonó el gen *pncA* mutante en cuestión.

En este estudio se observó que los niveles de expresión de los genes *pncA* en los aislados clínicos mostraron valores similares e inferiores en comparación a la cepa referencial H37Rv. En el estudio realizado por Sheen *et al.* (9) mostraron que los niveles de expresión de los genes *pncA* mutantes de los aislados clínicos, empleados en este estudio, tuvieron valores entre 0.46 a 0.5, excepto para el aislado con mutación H51R, pues su nivel de expresión fue 8 veces más que el del gen *pncA* WT; cabe señalar que los promotores de dichas mutantes no tuvieron mutaciones, y se postula que mutaciones cerca a las regiones 3' y 5' de los transcritos pueden afectar la estabilidad de los ARNm, y por tanto los niveles de expresión del gen (9), lo cual podría suceder en los aislados clínicos.

Los aislados clínicos presentaron variabilidad en los niveles de expresión de *pncA* con respecto a las cepas *pncA* complementadas. Probablemente, la expresión diferencial de *pncA* en los aislados clínicos también se deba a la deficiencia de la regulación transcripcional (88), pues tanto para los aislados clínicos como para las cepas complementadas, los parámetros fenotípicos fueron determinados en la misma fase y condiciones de crecimiento.

Otro estudio menciona que una de las causas de resistencia a PZA son los niveles inferiores de expresión de *pncA* (22). Por otro lado, González *et al.* mencionan que la diversidad de linajes y el complejo de regulación transcripcional dificulta usar la expresión de genes como un marcador molecular de resistencia a drogas (88). El modelo de este estudio permitió obtener niveles de expresión basal constantes de los genes *pncA* WT y mutantes, gracias a su circuito regulador positivo y el promotor de nitrilasa que permiten su transcripción basal (19), controlando, de esta manera, la variabilidad observada en los aislados clínicos y obteniendo concentraciones similares de PZAsa en cada una de las cepas complementadas. Sin embargo, los niveles de expresión en condiciones inducidas no resultaron similares, probablemente porque el promotor *nit* respondió diferencialmente en las cepas complementadas (89), mas esto no interfirió en las cantidades de POA cuantificadas ni en la determinación de susceptibilidad a PZA, sino fue atribuida a la mutación *per se*.

Al comparar la cantidad de POA producido por las cepas *pncA* complementadas, en condiciones inducidas, con la actividad enzimática de las PZAsas recombinantes G78C, F94L, H51R y D49N producidas en *E. coli* (9,15), se puede mencionar que ambas respuestas fueron equivalentes, pues para ambos casos hubo correlación con la k_{cat} , con la diferencia de que la producción de POA por las cepas complementadas se realizó *in vivo* (en el hospedero nativo, cepa *pncA*-KO complementada).

Sin embargo, la cantidad de POA producido por las cepas complementadas en condiciones no inducidas no resultó comparable con la actividad de las PZAsas recombinantes, por lo que es necesaria la sobreexpresión para evaluar parámetros

cinéticos *in vivo*, como la tasa catalítica enzimática, controlando las condiciones fisiológicas de la célula (84).

Las variaciones en la tasa de eflujo de POA pueden depender de los niveles de actividad PZAsa, concentración de PZAsa intracelular, eficiencia de eflujo de POA, y de la concentración de bombas de eflujo (9,16). Se considera que para determinar la resistencia a PZA se deben considerar los parámetros de CMI, actividad PZAsa, niveles de expresión de *pncA*, y tasa de eflujo de POA (9). Con este estudio se puede mencionar que un sistema de expresión inducible también aportaría a la verificación de los parámetros anteriores.

IX. CONCLUSIONES

La complementación de la cepa *pncA*-KO con el gen *pncA* WT, mediante el sistema de expresión pNIT, permitió la restauración del fenotipo susceptible, mostrando parámetros similares al de la cepa H37Rv.

pNIT-*pncA* permitió la expresión basal y sobreexpresión de *pncA*, demostrándose la síntesis de PZAsa y su función activa. Asimismo, los plásmidos se mantuvieron estables intracelularmente durante el tiempo de evaluación.

Por último, el sistema pNIT-*pncA* permitió verificar que las mutaciones D49N, H51R, G78C y F94L en las cepas complementadas realmente confieren resistencia a PZA y que la actividad PZAsa de dichas mutantes no predice la susceptibilidad o resistencia a PZA.

X. RECOMENDACIONES

Medir el índice de crecimiento de las cepas complementadas con el fin de comparar con estudios previos.

Ampliar el rango de concentraciones de PZA para la determinación de CMI.

Evaluar otras PZAsas mutantes para determinar si también se asocian directamente con la resistencia a PZA.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Tuberculosis Report 2016 [Internet]. [citado 23 de julio de 2017]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/m/abstract/Js23098en/>
2. Gengenbacher M, Kaufmann SHE. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. FEMS Microbiol Rev. mayo de 2012;36(3):514-32.
3. Hatfull GF, Jr WRJ. Molecular Genetics of Mycobacteria. American Society for Microbiology Press; 2014. 1474 p.
4. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. Microbiol Spectr. 2013;2(4):1-12.
5. Mitchison DA. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. Tubercle. septiembre de 1985;66(3):219-25.
6. Almeida Da Silva PEA, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. J Antimicrob Chemother. julio de 2011;66(7):1417-30.
7. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, Christiansen G, Moreno-Román P, Gutiérrez AH, et al. Role of metal ions on the activity of Mycobacterium tuberculosis pyrazinamidase. Am J Trop Med Hyg. julio de 2012;87(1):153-61.
8. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. Respir Res. 2001;2(3):164-8.

9. Sheen P, Lozano K, Gilman RH, Valencia HJ, Loli S, Fuentes P, et al. *pncA* gene expression and prediction factors on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Edinb Scotl*. septiembre de 2013;93(5):515-22.
10. Vats C, Dhanjal JK, Goyal S, Gupta A, Bharadvaja N, Grover A. Mechanistic analysis elucidating the relationship between Lys96 mutation in *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase enzyme and pyrazinamide susceptibility. *BMC Genomics*. 21 de enero de 2015;16(Suppl 2):S14.
11. Petrella S, Gelus-Ziental N, Maudry A, Laurans C, Boudjelloul R, Sougakoff W. Crystal structure of the pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. *PLoS One*. 24 de enero de 2011;6(1):e15785.
12. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in *tubercle bacillus*. *Nat Med*. junio de 1996;2(6):662-7.
13. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, et al. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. marzo de 1997;41(3):540-3.
14. Rodrigues V de FS, Telles MA, Ribeiro MO, Cafrune PI, Rossetti MLR, Zaha A. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant

- Mycobacterium tuberculosis in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* enero de 2005;49(1):444-6.
15. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, López-Llano J, Fuentes P, Valencia E, et al. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Edinb Scotl.* marzo de 2009;89(2):109-13.
 16. 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 J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* marzo de 2010;10(2):346-9.
 17. Sheen P, Requena D, Gushiken E, Gilman RH, Antiparra R, Lucero B, et al. A multiple genome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* reveals specific novel genes and mutations associated with pyrazinamide resistance. *BMC Genomics.* 11 de octubre de 2017;18(1):769.
 18. Liu J, Shi W, Zhang S, Hao X, Maslov DA, Shur KV, et al. Mutations in Efflux Pump Rv1258c (Tap) Cause Resistance to Pyrazinamide, Isoniazid, and Streptomycin in *M. tuberculosis*. *Front Microbiol.* 2019;10:216.
 19. Pandey AK, Raman S, Proff R, Joshi S, Kang C-M, Rubin EJ, et al. Nitrile-inducible gene expression in mycobacteria. *Tuberc Edinb Scotl.* enero de 2009;89(1):12-6.

20. Lamrabet O, Drancourt M. Genetic engineering of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *Tuberc Edinb Scotl*. septiembre de 2012;92(5):365-76.
21. Lee MH, Pascopella L, Jacobs WR, Hatfull GF. Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guérin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 de abril de 1991;88(8):3111-5.
22. 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. *Tuberc Edinb Scotl*. enero de 2012;92(1):84-91.
23. Delogu G, Sali M, Fadda G. The Biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 16 de noviembre de 2013;5(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3867229/>
24. Saunders G, McFadden J. *Molecular Biology of Mycobacterium tuberculosis*. 2003;2:97-111.
25. 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*. 11 de junio de 1998;393(6685):537-44.
26. Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z. Role of Acid pH and Deficient Efflux of Pyrazinoic Acid in Unique Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide. *J Bacteriol*. 1 de abril de 1999;181(7):2044-9.

27. Miotto P, Cirillo DM, Migliori GB. Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Mechanisms Challenging Fluoroquinolones and Pyrazinamide Effectiveness. *Chest*. 1 de abril de 2015;147(4):1135-43.
28. Feuerriegel S, Köser CU, Richter E, Niemann S. *Mycobacterium canettii* is intrinsically resistant to both pyrazinamide and pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother*. junio de 2013;68(6):1439-40.
29. Sun Z, Scorpio A, Zhang Y. The *pncA* gene from naturally pyrazinamide-resistant *Mycobacterium avium* encodes pyrazinamidase and confers pyrazinamide susceptibility to resistant *M. tuberculosis* complex organisms. *Microbiology*. 1997;143(10):3367-73.
30. Raynaud C, Lanéelle M-A, Senaratne RH, Draper P, Lanéelle G, Daffé M. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology*. 1999;145(6):1359-67.
31. Boshoff HIM, Barry CE. Tuberculosis — metabolism and respiration in the absence of growth. *Nat Rev Microbiol*. enero de 2005;3(1):70-80.
32. Meena LS, Rajni null. Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS J*. junio de 2010;277(11):2416-27.
33. 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*. 30 de junio de 2017;34(2):299-310.

34. OMS | Informe mundial sobre la tuberculosis [Internet]. WHO. [citado 16 de diciembre de 2016]. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/es/
35. Schmit KM. Tuberculosis — United States, 2016. MMWR Morb Mortal Wkly Rep [Internet]. 2017 [citado 20 de agosto de 2017];66. Disponible en: <https://www.facebook.com/CDCMMWR>
36. Las 10 principales causas de defunción [Internet]. World Health Organization. [citado 17 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
37. Ministerio de Salud - MINSA P. Impacto económico de la tuberculosis en el Perú. 17 de septiembre de 2018;
38. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. Inmunología celular y molecular + Student Consult. Elsevier España; 2012. 2101 p.
39. Triccas JA, Gicquel B. Life on the inside: probing mycobacterium tuberculosis gene expression during infection. Immunol Cell Biol. agosto de 2000;78(4):311-7.
40. O'Sullivan DM, McHugh TD, Gillespie SH. Analysis of rpoB and pncA mutations in the published literature: an insight into the role of oxidative stress in Mycobacterium tuberculosis evolution? J Antimicrob Chemother. mayo de 2005;55(5):674-9.

41. Wade MM, Zhang Y. Anaerobic incubation conditions enhance pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol*. agosto de 2004;53(Pt 8):769-73.
42. Heifets L, Lindholm-Levy P. Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semidormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. *Am Rev Respir Dis*. mayo de 1992;145(5):1223-5.
43. Pires D, Valente E, Simões MF, Carmo N, Testa B, Constantino L, et al. Esters of Pyrazinoic Acid Are Active against Pyrazinamide-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Naturally Resistant Mycobacteria In Vitro and Ex Vivo within Macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*. diciembre de 2015;59(12):7693-9.
44. Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z. Role of Acid pH and Deficient Efflux of Pyrazinoic Acid in Unique Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide. *J Bacteriol*. abril de 1999;181(7):2044-9.
45. 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*. 11 de julio de 2008;283(28):19329-41.
46. Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE, et al. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 16 de septiembre de 2011;333(6049):1630-2.

47. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med.* junio de 1996;2(6):662-7.
48. Miyagi C, Yamane N, Yogesh B, Ano H, Takashima T. Genetic and phenotypic characterization of pyrazinamide-resistant mycobacterium tuberculosis complex isolates in Japan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* febrero de 2004;48(2):111-6.
49. Miotto P, Cabibbe AM, Feuerriegel S, Casali N, Drobniowski F, Rodionova Y, et al. Mycobacterium tuberculosis pyrazinamide resistance determinants: a multicenter study. *mBio.* 21 de octubre de 2014;5(5):e01819-01814.
50. Cheng S-J, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. *pncA* Mutations as a Major Mechanism of Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Spread of a Monoresistant Strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* marzo de 2000;44(3):528-32.
51. Brites D, Gagneux S. Old and New Selective Pressures on Mycobacterium Tuberculosis. *Infect Genet Evol.* junio de 2012;12(4):678-85.
52. Smith T, Wolff KA, Nguyen L. Molecular Biology of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;374:53-80.
53. 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):5479-85.

54. Smith I. Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. Clin Microbiol Rev. julio de 2003;16(3):463-96.
55. Mycobacterium Tuberculosis Protocols - Google Libros [Internet]. [citado 12 de enero de 2018]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=uGLFmjprNzUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
56. Boshoff HIM, Mizrahi V. Expression of Mycobacterium smegmatis Pyrazinamidase in Mycobacterium tuberculosis Confers Hypersensitivity to Pyrazinamide and Related Amides. J Bacteriol. octubre de 2000;182(19):5479-85.
57. Bachrach G, Colston MJ, Bercovier H, Bar-Nir D, Anderson C, Papavinasasundaram KG. A new single-copy mycobacterial plasmid, pMF1, from Mycobacterium fortuitum which is compatible with the pAL5000 replicon. Microbiol Read Engl. febrero de 2000;146 (Pt 2):297-303.
58. Andreu N, Zelmer A, Fletcher T, Elkington PT, Ward TH, Ripoll J, et al. Optimisation of bioluminescent reporters for use with mycobacteria. PloS One. 24 de mayo de 2010;5(5):e10777.
59. Parish T, Brown AC, editores. Mycobacteria Protocols [Internet]. 2.^a ed. Humana Press; 2009 [citado 14 de septiembre de 2018]. (Methods in Molecular Biology). Disponible en: [//www.springer.com/us/book/9781588298898](http://www.springer.com/us/book/9781588298898)

60. Garbe TR, Barathi J, Barnini S, Zhang Y, Abou-Zeid C, Tang D, et al. Transformation of mycobacterial species using hygromycin resistance as selectable marker. *Microbiol Read Engl.* enero de 1994;140 (Pt 1):133-8.

61. Hatfull GF, Jr WRJ. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. American Society for Microbiology Press; 2014. 1474 p.

62. Goude R, Parish T. Electroporation of Mycobacteria. En: *Mycobacteria Protocols* [Internet]. Humana Press, Totowa, NJ; 2009 [citado 23 de agosto de 2017]. p. 203-15. (Methods in Molecular Biology). Disponible en: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-207-6_13

63. Balbas P, Lorence A, editores. *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols* [Internet]. 2.^a ed. Humana Press; 2004 [citado 21 de enero de 2019]. (Methods in Molecular Biology). Disponible en: [//www.springer.com/us/book/9781588292629](http://www.springer.com/us/book/9781588292629)

64. Miller MA, Thibert L, Desjardins F, Siddiqi SH, Dascal A. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide: comparison of Bactec method with pyrazinamidase assay. *J Clin Microbiol.* 1 de septiembre de 1995;33(9):2468-70.

65. Cui Z, Wang J, Lu J, Huang X, Zheng R, Hu Z. Evaluation of Methods for Testing the Susceptibility of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates to Pyrazinamide. *J Clin Microbiol.* 1 de mayo de 2013;51(5):1374-80.

66. Sharma B, Pal N, Malhotra B, Vyas L, Rishi S. Comparison of MGIT 960 & pyrazinamidase activity assay for pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res.* julio de 2010;132:72-6.
67. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, López-Llano J, Fuentes P, Valencia E, et al. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Edinb Scotl.* marzo de 2009;89(2):109-13.
68. Trivedi SS, Desai SG. Pyrazinamidase activity of *Mycobacterium tuberculosis*—A test of sensitivity to pyrazinamide. *Tubercle.* 1 de septiembre de 1987;68(3):221-4.
69. Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* enero de 1974;109(1):147-51.
70. Simonian MH, Smith JA. Spectrophotometric and Colorimetric Determination of Protein Concentration. *Curr Protoc Mol Biol.* 2006;76(1):10.1.1-10.1A.9.
71. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* noviembre de 1991;29(11):2578-86.

72. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods San Diego Calif.* diciembre de 2001;25(4):402-8.
73. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath.* agosto de 2013;3(3):71-85.
74. Meinzen C, Proaño A, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Zimic M, et al. A quantitative adaptation of the Wayne test for pyrazinamide resistance. *Tuberc Edinb Scotl.* 2016;99:41-6.
75. Wu S, Howard ST, Lakey DL, Kipnis A, Samten B, Safi H, et al. The principal sigma factor sigA mediates enhanced growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *Mol Microbiol.* 2004;51(6):1551-62.
76. Nasr Esfahani B, Rezaei Yazdi H, Moghim S, Ghasemian Safaei H, Zarkesh Esfahani H. Rapid and accurate identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and common non-tuberculous mycobacteria by multiplex real-time PCR targeting different housekeeping genes. *Curr Microbiol.* noviembre de 2012;65(5):493-9.
77. Seiner DR, Hegde SS, Blanchard JS. Kinetics and Inhibition of Nicotinamidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry.* 9 de noviembre de 2010;49(44):9613-9.

78. Salfinger M, Reller LB, Demchuk B, Johnson ZT. Rapid radiometric method for pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol.* junio de 1989;140(4-5):301-9.
79. Pelicic V, Reyrat J-M, Gicquel B. Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol.* 1 de abril de 1998;28(3):413-20.
80. 1.4: Complementation and Recombination [Internet]. *Biology LibreTexts.* 2013 [citado 3 de noviembre de 2018]. Disponible en: [https://bio.libretexts.org/TextMaps/Genetics/Book%3A_Working_with_Molecular_Genetics_\(Hardison\)/Unit_I%3A_Genes%2C_Nucleic_Acids%2C_Genomes_and_Chromosomes/1%3A_Fundamental_Properties_of_Genes/1.4%3A_Complementation_and_Recombination](https://bio.libretexts.org/TextMaps/Genetics/Book%3A_Working_with_Molecular_Genetics_(Hardison)/Unit_I%3A_Genes%2C_Nucleic_Acids%2C_Genomes_and_Chromosomes/1%3A_Fundamental_Properties_of_Genes/1.4%3A_Complementation_and_Recombination)
81. Choudhary E, Thakur P, Pareek M, Agarwal N. Gene silencing by CRISPR interference in mycobacteria. *Nat Commun.* 25 de febrero de 2015;6:6267.
82. Brown AC, Parish T. Instability of the acetamide-inducible expression vector pJAM2 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Plasmid.* enero de 2006;55(1):81-6.
83. Pashley CA, Parish T, McAdam RA, Duncan K, Stoker NG. Gene Replacement in Mycobacteria by Using Incompatible Plasmids. *Appl Environ Microbiol.* enero de 2003;69(1):517-23.
84. Davidi D, Noor E, Liebermeister W, Bar-Even A, Flamholz A, Tumbler K, et al. Global characterization of in vivo enzyme catalytic rates and their

correspondence to in vitro kcat measurements. Proc Natl Acad Sci U S A. 22 de marzo de 2016;113(12):3401-6.

85. Peruvian and globally reported amino acid substitutions on the Mycobacterium tuberculosis pyrazinamidase suggest a conserved pattern of mutations a... - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 3 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19963078>
86. Lehninger : principios de bioquímica - David L. Nelson, Michael M. Cox - Google Libros [Internet]. [citado 3 de diciembre de 2018]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=QFaxoQEACAAJ&dq=lehninger&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjHpf_3jITfAhUE01kKHxsvDaYQ6AEIKzAA
87. Quiliano M, Gutierrez AH, Gilman RH, López C, Evangelista W, Sotelo J, et al. Structure-Activity relationship in mutated pyrazinamidases from Mycobacterium tuberculosis. Bioinformatics. 2011;6(9):335-9.
88. González-Escalante L, Peñuelas-Urquides K, Said-Fernández S, Silva-Ramírez B, Bermúdez de León M. Differential expression of putative drug resistance genes in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. FEMS Microbiol Lett [Internet]. 1 de diciembre de 2015 [citado 30 de enero de 2019];362(23). Disponible en: <https://academic.oup.com/femsle/article/362/23/fnv194/2467422>
89. Ratledge C, Dale JW. Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence. John Wiley & Sons; 2009. 421 p.

XII. ANEXOS

ANEXO 01: DIGESTIÓN Y DESFOSFORILACIÓN DEL

PLÁSMIDO pNIT-1

1. Reactivos

T4 DNA Ligase Buffer 10X 2.1 (New England Biolabs)

Enzimas de restricción NdeI y HindIII (New England Biolabs)

T4 DNA ligase (New England Biolabs)

rSAP (New England Biolabs)

agua libre de nucleasa

2. Equipos

Baño María

3. Procedimiento

- Preparar la reacción de digestión de la siguiente manera:

REACTIVOS	CONC. FINAL	VOL (μL)
T4 DNA Ligase Buffer 10X 2.1	1X	5
NdeI (20000 U)	20 U	1
HindIII (20000 U)	20 U	1
Plásmido	1-2 μg	3
Agua libre de nucleasas	-	39
rSAP	1 U	1
TOTAL		50

- Incubar a 37°C durante 1 hora
- Inactivar las enzimas a 65°C y 80°C para NdeI y HindIII, respectivamente, por 20 minutos.

ANEXO 02: TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

***E. coli* Novablue POR SHOCK TÉRMICO**

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES *E. coli* Novablue

1. Reactivos

CaCl 0.1 M

CaCl 0.1 M con glicerol al 15%

Medio sólido LB con Tetraciclina (10 µg/mL) en placas Petri.

NOTA: El genotipo de *E. coli* Novablue contiene el gen de resistencia a tetraciclina.

Medio líquido LB sin antibiótico

2. Equipos

Baño María

Espectrofotómetro

Incubadora shaker

Centrífuga refrigerada

Incubadora

3. Procedimiento

NOTA: durante la preparación de células competentes se debe mantener la cadena de frío.

- Sembrar *E. coli* Novablue en medio sólido LB por agotamiento. Dejar incubando a 37°C
- Sembrar una colonia aislada en 2 mL de caldo LB e incubar a 37°C en agitación constante (300 rpm) toda la noche.

- Transferir 1 mL del cultivo anterior a 50 mL de caldo LB, e incubar a 37°C en agitación constante hasta obtener un OD₆₀₀=0.35 a 0.45.
- Transferir el cultivo anterior en tubos de 50 mL, previamente enfriados. Incubar en hielo por 10 minutos.
- Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet con 20 mL de CaCl 0.1 M frío. Incubar 15 minutos en hielo.
- Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet con 1 mL de CaCl 0.1 M más glicerol al 15%.
- Alicuotar cada 50 µL en tubos de 1.5 mL previamente enfriados, y guardarlos a -70°C hasta su uso.

TRANSFORMACIÓN CON REACCIÓN DE LIGACIÓN EN *E. coli* Novablue

1. Reactivos

Medio líquido LB sin antibiótico

Medio sólido LB con kanamicina (40 µg/mL) y tetraciclina (10 µg/mL)

Etanol absoluto

2. Equipos

Baño María

Incubadora shaker

Centrífuga

Incubadora

Cabina de flujo

3. Procedimiento

- Descongelar las células competentes en hielo por 10 minutos.
- Para verificar la eficiencia de transformación, agregar 1 μL del plásmido purificado pNIT-eGFP; de las reacciones de ligación de pNIT-*pncA*, agregar 5 μL .
- Dejar en hielo por 30 minutos. Luego, colocar los tubos a 42°C por 45 segundos, retirar y dejar en hielo por 2 minutos.
- Agregar 1 mL de medio líquido LB en condiciones estériles, e incubar a 37°C por 1 hora en agitación constante.

Centrifugar a 6000 rpm por 1 minuto. NOTA: para la verificación de la eficiencia de transformación, no es necesario este paso.

- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con 100 μL de caldo LB
- Sembrar por extensión 80 μL de la suspensión anterior en medio sólido LB más kanamicina y tetraciclina. NOTA: para la verificación de la eficiencia de transformación, sembrar 50 μL .
- Incubar a 37°C por 30 horas.

ANEXO 03: PREPARACIÓN DE OADC Y MEDIO 7H9 Y 7H10 ENRIQUECIDO

Preparación de solución catalasa-dextrosa y ácido oleico (OADC en inglés)

1. Reactivos

Solución salina al 0.85% de NaCl (Sigma Aldrich)

Ácido oleico (Sigma Aldrich)

Catalasa (Sigma Aldrich)

Albúmina Bovina Sérica (BSA, siglas en inglés) (Sigma Aldrich)

Dextrosa (Sigma Aldrich)

2. Equipos

Cabina de flujo

Bomba de vacío

Sistema de filtración al vacío

Agitador magnético

Autoclave

3. Procedimiento

- Agregar 8.5 g de NaCl en 1 L de agua destilada y una pastilla magnética. Esterilizar por autoclavado (121°C por 15 minutos).
- Agregar 0.6 mL de ácido oleico, 0.03 g de catalasa, 50 g de BSA 20 g de dextrosa a la solución salina en condiciones estériles. Homogenizar con ayuda de un agitador magnético a temperatura ambiente toda la noche.
- Esterilizar por filtración utilizando papel filtro (3 veces), membranas de 0.45 μm (2 veces) y de 0.22 μm (2 veces) con ayuda de la bomba de vacío. NOTA: la filtración debe ser secuencial de acuerdo a la medida de los poros de la membrana para separar las partículas insolubles de la solución OADC.
- Alicuotar en tubos estériles de 50 mL, sellar la tapa con Parafilm, y poner a control en la incubadora a 37°C por 40 horas.

Preparación de medio 7H9 enriquecido

1. Reactivos

Medio de cultivo deshidratado 7H9 (BD Difco)

Glicerol (J.T. Beaker)

OADC

Tween 80 (Sigma Aldrich)

2. Equipos

Autoclave

3. Procedimiento

- Agregar 4.7 g de medio 7H9 deshidratado y 5 mL de glicerol en 900 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclavado.
- Agregar 100 mL de solución OADC y 5 mL de Tween 80 al 10%, previamente diluido en agua destilada y autoclavada.
- Alicuotar volúmenes requeridos en condiciones estériles.

Preparación de medio 7H10 enriquecido

1. Reactivos

Medio de cultivo deshidratado 7H10 (BD Difco)

OADC

Glicerol (J.T. Beaker)

2. Equipos

Autoclave

Cabina de flujo

3. Procedimiento

4. Procedimiento

- Agregar 19 g de medio 7H10 deshidratado y 5 mL de glicerol en 900 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclavado.

- Agregar 100 mL de solución OADC.
- Dispensar en placas Petri desechables en condiciones estériles.

ANEXO 04: PREPARACIÓN DE MEDIO PARA LA PRUEBA DE WAYNE CONVENCIONAL

1. Reactivos

Medio de cultivo Dubos deshidratado (BD Difco)

Pirazinamida (Sigma Aldrich)

Ácido pirúvico (Sigma Aldrich)

Agar deshidratado (BD Difco)

2. Procedimiento

- Mezclar 6.5 g de medio Dubos, 0.1 g de pirazinamida, 2 g de ácido pirúvico, y 15 g de agar en 1 L de agua destilada. Dejar disolviendo a 80°C sobre un agitador magnético.
- Dispensar 5 mL en tubos de vidrio (16 x 125 mm). Esterilizar por autoclavado.
- Almacenar a 4°C hasta su uso.

ANEXO 05: TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *M. tuberculosis pncA* KO CON PLÁSMIDOS pNIT-*pncA* y pNIT- eGFP

1. Reactivos

Medio líquido 7H9 enriquecido

Glicina 2M

Glicerol al 10%

Medio sólido 7H10 enriquecido

Kanamicina

Higromicina B

2. Equipos

Electroporador

Cabina de flujo

Centrífuga refrigerada

3. Procedimiento

Preparación de células competentes de *M. tuberculosis pncA-KO*

- Inocular una asada de una colonia de *M. tuberculosis pncA-KO* en 10 mL de caldo 7H9 enriquecido con 50ug/mL de higromicina. Vortexear e incubar a 37°C por 10 a 15 días.
- Inocular de 5 mL del cultivo inicial en 100 mL de caldo 7H9 enriquecido en un matraz de 250 mL (agregar los 100 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 (10 mL) de glicina 2M e incubar por 16 a 24 horas antes de cosechar las células.
- Cosechar las células por centrifugación a 3000 x g por 10 min a 17°C.
- Lavar las células con 10 mL de glicerol al 10% (**precalentado a 37°C**).
- Centrifugar a 3000 g por 10 min a 17°C.
- Lavar las células con 5 mL de glicerol al 10% (**precalentado a 37°C**).
- Resuspender las células en 5 mL de glicerol al 10%.
- 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 10 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 x g por 10 min
- Agregar 1000 uL de medio 7H9 enriquecido, homogenizar por pipeteo.
- Preparar diluciones de 1:10 y 1:100 para el conteo de colonias.
- Plaquear 30 uL de cada una de las diluciones en agar 7H10 enriquecido con kanamicina (20 μ g/mL) e higromicina B (50 μ g/mL).
- Incubar las placas a 37°C hasta que las colonias comiencen a ser visibles (aproximadamente 3 semanas).
- Contar los transformantes para calcular la eficiencia de transformación.

ANEXO 06: EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO EPISOMAL A

PARTIR DE CEPAS DE *M. tuberculosis* COMPLEMENTADAS

1. Reactivos

Buffer Tris EDTA pH 8.0

Medio sólido LB con kanamicina 40 μ g/mL y tetraciclina 10 μ g/mL

2. Equipos

Homogenizador Fast Prep (MP Biomedicals)

Calentador de bloque para tubos de 2 mL (Thermo Scientific)

3. Procedimiento

- Resuspender una asada de *M. tuberculosis* complementada en 500 μ L de buffer TE pH 8.0 contenido en un tubo tapa rosca con beads de 1.0 mm.
- Inactivar las bacterias a 80°C por 20 minutos.
- Lisar las células en el homogenizador Fast Prep a 4000 m/s durante 30 segundos, repetir 3 ciclos. NOTA: entre cada ciclo, inmediatamente colocar los tubos en hielo durante 5 minutos.
- Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir el sobrenadante en un tubo de 1.5 mL.
- Transformar a *E. coli* Novablue con 20 μ L del sobrenadante recuperado anteriormente.
- Sembrar en medio sólido LB con kanamicina más tetraciclina, e incubar a 37°C por 16 horas.

ANEXO 07: INMUNODETECCIÓN DE PZASA DE *M. tuberculosis*

1. Reactivos

PBS 10X (1,37 M de NaCl, 27 mM de KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄)

Anticuerpo anti PZAsa, generado en conejo (concentración?)

Anticuerpo anti conejo conjugado con HRP, generado en cabra (Abcam)

Leche descremada en polvo

2. Equipos

Equipo de transferencia (Biorad)

Agitador-incubadora rocker

3. Procedimiento

- Transferir las proteínas corridas mediante SDS-PAGE a las membranas de nitrocelulosa.
- Retirar los geles y realizar un bloqueo general de proteínas con leche al 5% (homogenizado en PBS 1X pH 7.4). Incubar a 37°C por 1 hora en movimiento constante.
- Lavar las membranas 3 veces por 3 minutos con PBS 1X pH 7.4 más Tween al 0.05%.
- Diluir el anticuerpo anti PZAsa, 1 en 1500 en leche al 5%. Incubar a 37°C por 1 hora en movimiento constante.
- Lavar las membranas 3 veces por 3 minutos con PBS 1X pH 7.4 más Tween al 0.05%.
- Diluir el anticuerpo anti conejo conjugado con HRP (Abcam), 1 en 2500 en leche al 5%. Incubar a 37°C por 1 hora en movimiento constante.
- Lavar las membranas 3 veces por 3 minutos con PBS 1X pH 7.4 más Tween al 0.05%.
- Revelar la formación del inmunocomplejo PZAsa-anti PZAsa-anti conejo HRP con diaminobenzidina (2.5 µL en 500 µL de PBS 1X pH 7.4) más H₂O₂ al 3% (1µL de H₂O₂ al 30% en 1 mL de PBS 1X pH 7.4).

ANEXO 08: PRUEBA DE WAYNE EN BUFFER CITRATO

1. Reactivos

Sulfato de amonio ferroso (J.T. Beaker)

Ácido cítrico (Sigma)

Citrato de sodio (Sigma)

Pirazinamida (Sigma)

2. Equipos

Incubadora shaker (Thermo Scientific)

Calentador de bloque para tubos de 2 mL (Thermo Scientific)

Vórtex

Microcentrífuga (Thermo Scientific)

3. Procedimiento

- Preparar 0.1 M de ácido cítrico y de citrato de sodio, luego mezclar ambos componentes hasta obtener un pH 7.0 (buffer citrato).
- Dispensar 3 mL de buffer citrato en tubos de 10 x 1.5 cm.
- Resuspender 2 asadas de cultivo en 700 μ L de buffer citrato contenido en un tubo con beads de 2.5 mm. Disgregar el cultivo con ayuda del vórtex.
- Agregar volúmenes de 20 μ L de la suspensión celular en 3 mL de buffer citrato hasta obtener una turbidez similar a la escala 4 de McFarland.
- Para las cepas complementadas, agregar inductor IVN (concentraciones finales de 1, 10, 30, 60 y 100 μ M), e incubar a 37°C por 24 horas en agitación constante (200 rpm).

- Agregar PZA (concentración final 400 µg/mL), e incubar por 72 horas a 37°C en agitación constante.
- Transferir 1 mL de la suspensión celular en un tubo de 1.5 mL e inactivar las células por 30 minutos a 90°C.
- Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos y recuperar el sobrenadante.
- Colocar 100 µL del sobrenadante en placas de 96 pozos y agregar 20 µL de sulfato de amonio ferroso al 10%.
- Realizar la lectura de absorbancia a 450 nm.

ANEXO 09: DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE PIRAZINAMIDA EN *M. tuberculosis*

1. Reactivos

Pirazinamida

Medio 7H9 enriquecido pH 6.0

Ácido cítrico 0.1 M

2. Equipos

Incubadora

Cabina de flujo

Vórtex

3. Procedimiento

- Preparar medio 7H9 enriquecido y reducir el pH a 6.0 con ácido cítrico 0.1 M.
- Alicuotar 3 mL de medio 7H9 enriquecido pH 6.0 sin y con PZA (concentraciones finales de 80, 100, 300 y 1000 µg/mL) en tubos de 12 cm por 1.5 cm.

- Agregar 2 asadas de cultivo en un tubo con beads de 2.5 mm contenido con 600 uL de medio 7H9.
- Transferir volúmenes de 20 μ L de la suspensión anterior en 2 mL de medio 7H9 pH 6.0 hasta obtener una turbidez similar a la escala 4 de McFarland.
- Diluir 10 veces la suspensión anterior con medio 7H9 pH 6.0 y mezclar por inversión.
- Transferir 50 μ L de la suspensión anterior en 3 mL de medio 7H9 pH 6.0, sin y con PZA (para cada cepa), e incubar a 37°C durante 2 a 3 semanas.

ANEXO 10: EXTRACCIÓN DE ARN DE *M. tuberculosis*

1. Reactivos

Trizol (Sigma Aldrich)

Buffer Tris-HCl (10 mM) EDTA (1 mM) pH 8.0

Cloroformo (MERCK)

Etanol absoluto (MERCK)

RNAseZAP (ThermoScientific)

Agua destilada tratada con DEPC

2. Equipos

Homogenizador Fast Prep (MP Biomedicals)

Centrífuga refrigerada

Cabina de flujo

Congeladora

3. Procedimiento

- Cultivar *M. tuberculosis* en 5 mL de medio 7H9 enriquecido hasta obtener un $OD_{600} = 1.0$.
- Cosechar las células a 3000 x g por 20 minutos a 17°C. Decantar el sobrenadante.
- Lavar el pellet con 5 mL de buffer Tris EDTA pH 8.0. Homogenizar con pipeta de transferencia.
- Centrifugar a 3000 x g por 20 minutos. Decantar el sobrenadante.
- Agregar 800 μ L de trizol, y resuspender con pipeta de transferencia.
- Transferir la suspensión a un tubo tapa rosca contenido con beads de 0.1 mm (en volumen 400 μ L), y colocar en hielo.
- Lisar las células en el homogenizador Fast Prep a 6.5 m/s durante 30 segundos. Realizar 2 ciclos. NOTA: entre cada ciclo, colocar los tubos en hielo por 3 minutos.
- Centrifugar las muestras a 12000 x g por 10 minutos a 4°C.
- Transferir la fase soluble (fase superior), con cuidado de no tocar la interfase.
- Agregar 200 μ L de cloroformo y mezclar con vórtex durante 15 segundos e inmediatamente colocarlos en hielo. Dejar durante 5 minutos.
- Centrifugar a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. Transferir la fase superior, sin tocar la interfase, a otro tubo de 1.5 mL.
- Agregar etanol absoluto frío un volumen igual a la solución transferida anteriormente y homogenizar por inversión (10 veces). Precipitar a -20°C por 30 minutos.

- Centrifugar a 16000 x g por 10 minutos a 4°C. Decantar el etanol.
- Agregar 1 mL de etanol al 75% (diluido con agua DEPC), invertir el tubo 10 veces, y centrifugar a 16000 x g por 5 minutos. Realizar este paso 2 veces.
- Decantar el etanol y suspender el pellet con 10 uL de agua DEPC.
- Almacenar a -70°C.

**ANEXO 11: RETROTRANSCRIPCIÓN CON
OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS PARA *pncA* Y *16S***

1. Reactivos

Taqman Reverse Transcription Reagents Kit (Thermo Fisher)

Agua destilada tratada con DEPC

Oligonucleótidos RTR (*pncA/16S*)

2. Procedimiento

1er mix

Reactivos	Volumen (µL)
Agua DEPC	Completar para 20 µL
Oligonucleótidos RTR 10 µM (<i>pncA/16S</i>)	1
ARN tratado con DNase I (900 ng)	Varía de acuerdo a la concentración de ARN tratado

- Incubar a 65°C por 5 minutos, luego a 4°C por 2 minutos.

2do mix

Reactivos	Con RTasa	Sin RTasa
Buffer 10X	2	2
MgCl ₂ (25 mM)	1	1
dNTP mix (2.5 mM cada dNTP)	4	4
Inhibidor de RNasa (20U/µL)	1	0
MultiScribe RTasa (50U/µL)	1	0

- Agregar el 2do mix al 1er mix.
- Incubar a 37°C por 30 minutos, luego a 95°C por 5 minutos, finalmente, a 4°C por tiempo indefinido. Reservar para su uso a -20°C.

ANEXO 12: PCR EN TIEMPO REAL

1. Reactivos

SYBR Premix Ex Taq II (2X) (Tli RNaseH Plus) (Takara)

Oligonucleótidos forward y reverse (*pncA/16S*)

Agua PCR (GIBCO)

2. Procedimiento

Reactivos	Volumen (µL)
SYBR Premix 2X	2.5
Agua PCR	4.5
Oligonucleótido Forward (3 uM)	1
Oligonucleótido Reverse (3 uM)	1
cDNA	1

- Hold
95°/600 segundos, ramp 4.4 °C/s
- 3-Step Amplification (45 ciclos)

Temperatura	Ramp (°C/s)	Hold (s)
95°C	4.4	10
59°C	2.2	15
72°C	4.4	10

- Melting

Stage	Temperatura	Ramp (°C/s)	Hold (s)
Initial stage	65°C	2.2 °C/s	60 segundos
Final stage	97°C	0.1 °C/s	1 segundo

- Hold
40°C/600 segundos, ramp 5°C/s

**ANEXO 13: ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE pNIT-*pncA*,
GENES *pncA* Y PZAsas DE AISLADOS CLÍNICOS**

1. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE PROMOTOR NITRILASA Y

GENES *pncA* DE pNIT-*pncA*

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

pNIT_D49N	GGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGTTAACTACGTCGACATCGATAGTACTGC	60
pNIT_G78C	GGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGTTAACTACGTCGACATCGATAGTACTGC	60
pNIT_H51R	GGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGTTAACTACGTCGACATCGATAGTACTGC	60
pNIT_pncAWT	<u>GGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGTTAACTACGTCGACATCGATAGTACTGC</u>	60
pNIT_F94L	GGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGTTAACTACGTCGACATCGATAGTACTGC	60

pNIT_D49N	GAACTCCCTTATGCGGGTGGCGCAGAATGCCAGGACCCTTGTCAATCCACGTC AATTCAT	120
pNIT_G78C	GAACTCCCTTATGCGGGTGGCGCAGAATGCCAGGACCCTTGTCAATCCACGTC AATTCAT	120
pNIT_H51R	GAACTCCCTTATGCGGGTGGCGCAGAATGCCAGGACCCTTGTCAATCCACGTC AATTCAT	120
pNIT_pncAWT	<u>GAACTCCCTTATGCGGGTGGCGCAGAATGCCAGGACCCTTGTCAATCCACGTC AATTCAT</u>	120
pNIT_F94L	GAACTCCCTTATGCGGGTGGCGCAGAATGCCAGGACCCTTGTCAATCCACGTC AATTCAT	120

pNIT_D49N	GCGCCTTTTCACCTCGTACTGTCTGCCAAACACAAGCAACGGAGGTAATGCGGGCGTTG	180
pNIT_G78C	GCGCCTTTTCACCTCGTACTGTCTGCCAAACACAAGCAACGGAGGTAATGCGGGCGTTG	180
pNIT_H51R	GCGCCTTTTCACCTCGTACTGTCTGCCAAACACAAGCAACGGAGGTAATGCGGGCGTTG	180
pNIT_pncAWT	<u>GCGCCTTTTCACCTCGTACTGTCTGCCAAACACAAGCAACGGAGGTAATGCGGGCGTTG</u>	180
pNIT_F94L	GCGCCTTTTCACCTCGTACTGTCTGCCAAACACAAGCAACGGAGGTAATGCGGGCGTTG	180

pNIT_D49N	ATCATCGTCGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCGGTAACCGGTGGC	240
pNIT_G78C	ATCATCGTCGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCGGTAACCGGTGGC	240
pNIT_H51R	ATCATCGTCGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCGGTAACCGGTGGC	240
pNIT_pncAWT	<u>ATCATCGTCGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCGGTAACCGGTGGC</u>	240
pNIT_F94L	ATCATCGTCGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCGGTAACCGGTGGC	240

pNIT_D49N	GCCGCGCTGGCCCGGCCATCAGCGACTACCTGGCCGAAGCGGCGGACTACCATCACGTC	300
pNIT_G78C	GCCGCGCTGGCCCGGCCATCAGCGACTACCTGGCCGAAGCGGCGGACTACCATCACGTC	300
pNIT_H51R	GCCGCGCTGGCCCGGCCATCAGCGACTACCTGGCCGAAGCGGCGGACTACCATCACGTC	300
pNIT_pncAWT	<u>GCCGCGCTGGCCCGGCCATCAGCGACTACCTGGCCGAAGCGGCGGACTACCATCACGTC</u>	300
pNIT_F94L	GCCGCGCTGGCCCGGCCATCAGCGACTACCTGGCCGAAGCGGCGGACTACCATCACGTC	300

pNIT_D49N	GTGGCAACCAAGAAC TTCCACATCGACCCGGGTGACCAC TTCTCCGGCACACCGGACTAT	360
pNIT_G78C	GTGGCAACCAAGGACT TTCCACATCGACCCGGGTGACCAC TTCTCCGGCACACCGGACTAT	360
pNIT_H51R	GTGGCAACCAAGGACT TTCCGCATCGACCCGGGTGACCAC TTCTCCGGCACACCGGACTAT	360
pNIT_pncAWT	<u>GTGGCAACCAAGGACT TTCCACATCGACCCGGGTGACCAC TTCTCCGGCACACCGGACTAT</u>	360
pNIT_F94L	GTGGCAACCAAGGACT TTCCACATCGACCCGGGTGACCAC TTCTCCGGCACACCGGACTAT	360

pNIT_T135P	TCCTCGTCGTGGCCACCGCATTGCGTCAGCGGTACTCCC GGCGGGACTTCCATCCCAGT	420
pNIT_D49N	TCCTCGTCGTGGCCACCGCATTGCGTCAGCGGTACTCCC GGCGGGACTTCCATCCCAGT	420
pNIT_G78C	TCCTCGTCGTGGCCACCGCATTGCGTCAGCGGTACTCCC GGCGGGACTTCCATCCCAGT	420
pNIT_H51R	<u>TCCTCGTCGTGGCCACCGCATTGCGTCAGCGGTACTCCC GGCGGGACTTCCATCCCAGT</u>	420
pNIT_pncAWT	<u>TCCTCGTCGTGGCCACCGCATTGCGTCAGCGGTACTCCC GGCGGGACTTCCATCCCAGT</u>	420
pNIT_F94L	TCCTCGTCGTGGCCACCGCATTGCGTCAGCGGTACTCCC GGCGGGACTTCCATCCCAGT	420

pNIT_G78C	CTGGACACGTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACAAGGGTGCCTACACCGGAGCGTACAGC	480
pNIT_H51R	<u>CTGGACACGTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACAAGGGTGCCTACACCGGAGCGTACAGC</u>	480
pNIT_pncAWT	<u>CTGGACACGTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACAAGGGTGCCTACACCGGAGCGTACAGC</u>	480
pNIT_F94L	CTGGACACGTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACAAGGGTGCCTACACCGGAGCGTACAGC	480

pNIT_T135P	GGCTTCGAAGGAGTGCACGAGAACGGCAGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGC	540
pNIT_D49N	GGCTTCGAAGGAGTGCACGAGAACGGCAGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGC	540
pNIT_G78C	GGCTTCGAAGGAGTGCACGAGAACGGCAGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGC	540
pNIT_H51R	<u>GGCTTCGAAGGAGTGCACGAGAACGGCAGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGC</u>	540
pNIT_pncAWT	<u>GGCTTCGAAGGAGTGCACGAGAACGGCAGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGC</u>	540
pNIT_F94L	GGCTTCGAAGGAGTGCACGAGAACGGCAGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGC	540

pNIT_D49N	GTCGATGAGGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGATCATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAG	600
pNIT_G78C	GTCGATGAGGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGATCATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAG	600
pNIT_H51R	<u>GTCGATGAGGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGATCATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAG</u>	600
pNIT_pncAWT	<u>GTCGATGAGGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGATCATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAG</u>	600
pNIT_F94L	GTCGATGAGGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGATCATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAG	600

pNIT_T135P	GGCTTCGAAGGAGTGCACGAGAACGGCAGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGC	540
pNIT_D49N	GGCTTCGAAGGAGTGCACGAGAACGGCAGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGC	540
pNIT_G78C	GGCTTCGAAGGAGTGCACGAGAACGGCAGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGC	540
pNIT_H51R	<u>GGCTTCGAAGGAGTGCACGAGAACGGCAGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGC</u>	540
pNIT_pncAWT	<u>GGCTTCGAAGGAGTGCACGAGAACGGCAGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGC</u>	540
pNIT_F94L	GGCTTCGAAGGAGTGCACGAGAACGGCAGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGC	540

pNIT_D49N	GTCGATGAGGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGATCATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAG	600
pNIT_G78C	GTCGATGAGGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGATCATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAG	600
pNIT_H51R	<u>GTCGATGAGGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGATCATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAG</u>	600
pNIT_pncAWT	<u>GTCGATGAGGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGATCATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAG</u>	600
pNIT_F94L	GTCGATGAGGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGATCATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAG	600

pNIT_D49N	GACGCGGTACGCAATGGCTTGGCCACCAGGGTGTGGTGGACCTGACAGCGGGTGTGTCTG	660
pNIT_G78C	GACGCGGTACGCAATGGCTTGGCCACCAGGGTGTGGTGGACCTGACAGCGGGTGTGTCTG	660
pNIT_H51R	<u>GACGCGGTACGCAATGGCTTGGCCACCAGGGTGTGGTGGACCTGACAGCGGGTGTGTCTG</u>	660
pNIT_pncAWT	<u>GACGCGGTACGCAATGGCTTGGCCACCAGGGTGTGGTGGACCTGACAGCGGGTGTGTCTG</u>	660
pNIT_F94L	GACGCGGTACGCAATGGCTTGGCCACCAGGGTGTGGTGGACCTGACAGCGGGTGTGTCTG	660

pNIT_D49N	GCCGATACCACCGTCGCGCGCTGGAGGAGATGCGCACCGCCAGCGTCGAGTTGGTTTGC	720
pNIT_G78C	GCCGATACCACCGTCGCGCGCTGGAGGAGATGCGCACCGCCAGCGTCGAGTTGGTTTGC	720
pNIT_H51R	<u>GCCGATACCACCGTCGCGCGCTGGAGGAGATGCGCACCGCCAGCGTCGAGTTGGTTTGC</u>	720
pNIT_pncAWT	<u>GCCGATACCACCGTCGCGCGCTGGAGGAGATGCGCACCGCCAGCGTCGAGTTGGTTTGC</u>	720
pNIT_F94L	GCCGATACCACCGTCGCGCGCTGGAGGAGATGCGCACCGCCAGCGTCGAGTTGGTTTGC	720

pNIT_D49N	AGCTCCTGA	729
pNIT_G78C	AGCTCCTGA	729
pNIT_H51R	AGCTCCTGA	729
pNIT_pncAWT	<u>AGCTCCTGA</u>	729
pNIT_F94L	AGCTCCTGA	729

NOTA: la secuencia en cuadro rojo corresponde al promotor nitrilasa, y la secuencia en cuadro azul, al gen *pncA* WT.

2. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DEL PROMOTOR Y GENES *pncA* AMPLIFICADAS A PARTIR DE AISLADOS CLÍNICOS

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

MDRDM1098      GCAAAGTCCCCGGGCAGTCGCCGAACGTATGGTGGACGTATGCGGGCGTTGATCATCGT   60
CSV4644        GCAAAGTCCCCGGGCAGTCGCCGAACGTATGGTGGACGTATGCGGGCGTTGATCATCGT   60
CSV10399       GCAAAGTCCCCGGGCAGTCGCCGAACGTATGGTGGACGTATGCGGGCGTTGATCATCGT   60
pncAWT_NCBI    GCAAAGTCCCCGGGCAGTCGCCGAACGTATGGTGGACGTATGCGGGCGTTGATCATCGT   60
H37RV          GCAAAGTCCCCGGGCAGTCGCCGAACGTATGGTGGACGTATGCGGGCGTTGATCATCGT   60
CSV5769        GCAAAGTCCCCGGGCAGTCGCCGAACGTATGGTGGACGTATGCGGGCGTTGATCATCGT   60
*****

MDRDM1098      CGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCGGTAACCGGTGGCGCCGCGCT  120
CSV4644        CGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCGGTAACCGGTGGCGCCGCGCT  120
CSV10399       CGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCGGTAACCGGTGGCGCCGCGCT  120
pncAWT_NCBI    CGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCGGTAACCGGTGGCGCCGCGCT  120
H37RV          CGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCGGTAACCGGTGGCGCCGCGCT  120
CSV5769        CGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCGGTAACCGGTGGCGCCGCGCT  120
*****

MDRDM1098      GGCCCGCGCCATCAGCGACTACCTGGCCGAAGCGGCGGACTACCATCACGTCGTGGCAAC  180
CSV4644        GGCCCGCGCCATCAGCGACTACCTGGCCGAAGCGGCGGACTACCATCACGTCGTGGCAAC  180
CSV10399       GGCCCGCGCCATCAGCGACTACCTGGCCGAAGCGGCGGACTACCATCACGTCGTGGCAAC  180
pncAWT_NCBI    GGCCCGCGCCATCAGCGACTACCTGGCCGAAGCGGCGGACTACCATCACGTCGTGGCAAC  180
H37RV          GGCCCGCGCCATCAGCGACTACCTGGCCGAAGCGGCGGACTACCATCACGTCGTGGCAAC  180
CSV5769        GGCCCGCGCCATCAGCGACTACCTGGCCGAAGCGGCGGACTACCATCACGTCGTGGCAAC  180
*****

MDRDM1098      CAAGGACTTCCACATCGACCCGGGTGACCACTTCTCCGGCACACCGGACTATTCCCTCGTC  240
CSV4644        CAAGGACTTCCGACATCGACCCGGGTGACCACTTCTCCGGCACACCGGACTATTCCCTCGTC  240
CSV10399       CAAGGACTTCCACATCGACCCGGGTGACCACTTCTCCGGCACACCGGACTATTCCCTCGTC  240
pncAWT_NCBI    CAAGGACTTCCACATCGACCCGGGTGACCACTTCTCCGGCACACCGGACTATTCCCTCGTC  240
H37RV          CAAGGACTTCCACATCGACCCGGGTGACCACTTCTCCGGCACACCGGACTATTCCCTCGTC  240
CSV5769        CAAGGACTTCCACATCGACCCGGGTGACCACTTCTCCGGCACACCGGACTATTCCCTCGTC  240
****

```


MDRDM1098	GTGGCCACCGCATTGCGTCAGCGGTA	CTCCGGCGCGGACTTCCATCCCAGTCTGGACAC	300
CSV4644	GTGGCCACCGCATTGCGTCAGCGGTA	CTCCGGCGCGGACTTCCATCCCAGTCTGGACAC	300
CSV10399	GTGGCCACCGCATTGCGTCAGCGGTA	CTCCGGCGCGGACTTCCATCCCAGTCTGGACAC	300
pncAWT_NCBI	<u>GTGGCCACCGCATTGCGTCAGCGGTA</u>	<u>CTCCGGCGCGGACTTCCATCCCAGTCTGGACAC</u>	300
H37RV	GTGGCCACCGCATTGCGTCAGCGGTA	CTCCGGCGCGGACTTCCATCCCAGTCTGGACAC	300
CSV5769	GTGGCCACCGCATTGCGTCAGCGGTA	CTCCGGCGCGGACTTCCATCCCAGTCTGGACAC	300

MDRDM1098	GTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACA	AAGGGTGCCACACCGGAGCGTACAGCGGCTTCGA	360
CSV4644	GTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACA	AAGGGTGCCACACCGGAGCGTACAGCGGCTTCGA	360
CSV10399	GTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACA	AAGGGTGCCACACCGGAGCGTACAGCGGCTTCGA	360
pncAWT_NCBI	<u>GTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACA</u>	<u>AAGGGTGCCACACCGGAGCGTACAGCGGCTTCGA</u>	360
H37RV	GTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACA	AAGGGTGCCACACCGGAGCGTACAGCGGCTTCGA	360
CSV5769	GTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTACA	AAGGGTGCCACACCGGAGCGTACAGCGGCTTCGA	360

MDRDM1098	AGGAGTCGACGAGAACGGCACGCCACT	GCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGCGTCGATGA	420
CSV4644	AGGAGTCGACGAGAACGGCACGCCACT	GCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGCGTCGATGA	420
CSV10399	AGGAGTCGACGAGAACGGCACGCCACT	GCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGCGTCGATGA	420
pncAWT_NCBI	<u>AGGAGTCGACGAGAACGGCACGCCACT</u>	<u>GCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGCGTCGATGA</u>	420
H37RV	AGGAGTCGACGAGAACGGCACGCCACT	GCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGCGTCGATGA	420
CSV5769	AGGAGTCGACGAGAACGGCACGCCACT	GCTGAATTGGCTGCGGCAACGCGGCGTCGATGA	420

MDRDM1098	GGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGAT	CATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAGGACGCGGT	480
CSV4644	GGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGAT	CATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAGGACGCGGT	480
CSV10399	GGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGAT	CATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAGGACGCGGT	480
pncAWT_NCBI	<u>GGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGAT</u>	<u>CATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAGGACGCGGT</u>	480
H37RV	GGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGAT	CATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAGGACGCGGT	480
CSV5769	GGTCGATGTGGTCGGTATTGCCACCGAT	CATTGTGTGCGCCAGACGGCCGAGGACGCGGT	480

MDRDM1098	ACGCAATGGCTTGGCCACCAAGGGT	GCTGGTGGACCTGACAGCGGGTGTGTCGGCCGATAC	540
CSV4644	ACGCAATGGCTTGGCCACCAAGGGT	GCTGGTGGACCTGACAGCGGGTGTGTCGGCCGATAC	540
CSV10399	ACGCAATGGCTTGGCCACCAAGGGT	GCTGGTGGACCTGACAGCGGGTGTGTCGGCCGATAC	540
pncAWT_NCBI	<u>ACGCAATGGCTTGGCCACCAAGGGT</u>	<u>GCTGGTGGACCTGACAGCGGGTGTGTCGGCCGATAC</u>	540
H37RV	ACGCAATGGCTTGGCCACCAAGGGT	GCTGGTGGACCTGACAGCGGGTGTGTCGGCCGATAC	540
CSV5769	ACGCAATGGCTTGGCCACCAAGGGT	GCTGGTGGACCTGACAGCGGGTGTGTCGGCCGATAC	540

MDRDM1098	CACCGTCGCCGCGCTGGAGGAGATGCG	CACCGCCAGCGTCGAGTTGGTTTGCAGCTCCTG	600
CSV4644	CACCGTCGCCGCGCTGGAGGAGATGCG	CACCGCCAGCGTCGAGTTGGTTTGCAGCTCCTG	600
CSV10399	CACCGTCGCCGCGCTGGAGGAGATGCG	CACCGCCAGCGTCGAGTTGGTTTGCAGCTCCTG	600
pncAWT_NCBI	<u>CACCGTCGCCGCGCTGGAGGAGATGCG</u>	<u>CACCGCCAGCGTCGAGTTGGTTTGCAGCTCCTG</u>	600
H37RV	CACCGTCGCCGCGCTGGAGGAGATGCG	CACCGCCAGCGTCGAGTTGGTTTGCAGCTCCTG	600
CSV5769	CACCGTCGCCGCGCTGGAGGAGATGCG	CACCGCCAGCGTCGAGTTGGTTTGCAGCTCCTG	600

MDRDM1098	A	601	
CSV4644	A	601	
CSV10399	A	601	
pncAWT_NCBI	<u>A</u>	<u>601</u>	
H37RV	A	601	
CSV5769	A	601	
	*		

NOTA: la secuencia en cuadro rojo corresponde al promotor del gen *pncA*, y la secuencia en cuadro azul, al gen *pncA* WT.

3. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE PZAsas

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

D49N      MRALIIVDVQND FCEGGS LAVTGGAALARAISDYLAEAAADYHHVATKNFHIDPGDHFSG      60
H51R      MRALIIVDVQND FCEGGS LAVTGGAALARAISDYLAEAAADYHHVATKDFRIDPGDHFSG      60
G78C      MRALIIVDVQND FCEGGS LAVTGGAALARAISDYLAEAAADYHHVATKDFHIDPGDHFSG      60
F94L      MRALIIVDVQND FCEGGS LAVTGGAALARAISDYLAEAAADYHHVATKDFHIDPGDHFSG      60
PZAasaWT  MRALIIVDVQND FCEGGS LAVTGGAALARAISDYLAEAAADYHHVATKDFHIDPGDHFSG      60
*****:*****

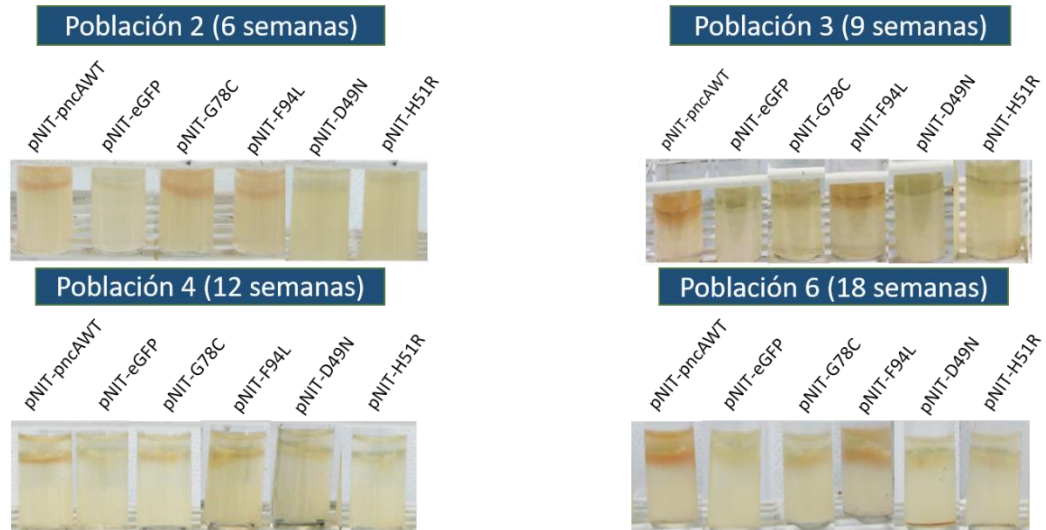
D49N      TPDYSSSWPPHC VSGTPGADFHPSLDTSAIEAVFYKGAYTGAYSGFEGVDENGTPLLNLW      120
H51R      TPDYSSSWPPHC VSGTPGADFHPSLDTSAIEAVFYKGAYTGAYSGFEGVDENGTPLLNLW      120
G78C      TPDYSSSWPPHC VSGTPCADFHPSLDTSAIEAVFYKGAYTGAYSGFEGVDENGTPLLNLW      120
F94L      TPDYSSSWPPHC VSGTPGADFHPSLDTSAIEAVLYKGAYTGAYSGFEGVDENGTPLLNLW      120
PZAasaWT  TPDYSSSWPPHC VSGTPGADFHPSLDTSAIEAVFYKGAYTGAYSGFEGVDENGTPLLNLW      120
*****:*****

D49N      RQRGVDEVDVWG IATDHCVRQTAEDAVRNLATRVLDL TAGVSADTTVAALEEMRTASV      180
H51R      RQRGVDEVDVWG IATDHCVRQTAEDAVRNLATRVLDL TAGVSADTTVAALEEMRTASV      180
G78C      RQRGVDEVDVWG IATDHCVRQTAEDAVRNLATRVLDL TAGVSADTTVAALEEMRTASV      180
F94L      RQRGVDEVDVWG IATDHCVRQTAEDAVRNLATRVLDL TAGVSADTTVAALEEMRTASV      180
PZAasaWT  RQRGVDEVDVWG IATDHCVRQTAEDAVRNLATRVLDL TAGVSADTTVAALEEMRTASV      180
*****

D49N      ELVCSSTop      190
H51R      ELVCSSTop      190
G78C      ELVCSSTop      190
F94L      ELVCSSTop      190
PZAasaWT  ELVCSSTop      190
*****

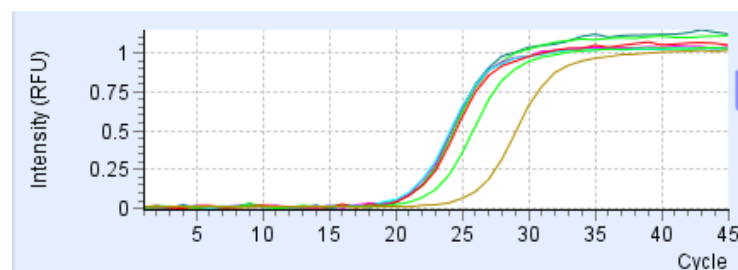
```

ANEXO 14: DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ESTABILIDAD DE LOS PLÁSMIDOS EN LAS CEPAS *pncA* COMPLEMENTADAS



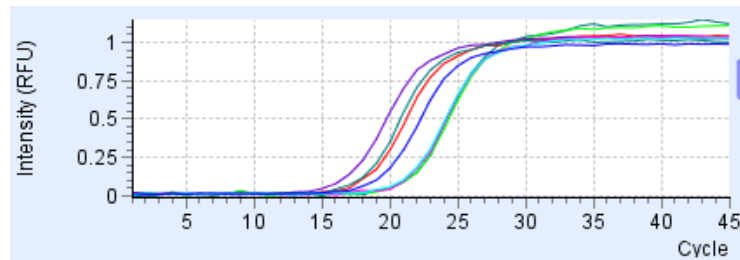
Sólo se lograron realizar 6 poblaciones debido al lento crecimiento de *M. tuberculosis* (2 semanas tanto en medio 7H9 como en medio 7H10 enriquecido → 4 semanas para cada población).

ANEXO 15: qPCR PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *pncA* Y *16S* EN CEPAS COMPLEMENTADAS Y AISLADOS CLÍNICOS

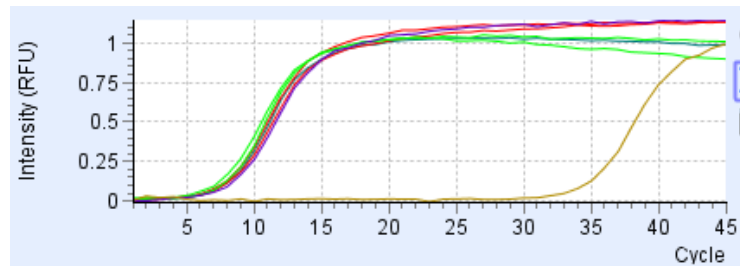


A. Plot de amplificación de genes *pncA* de las cepas *pncA* complementadas (condición no inducida) y H37Rv, mostradas en conjunto (una sola línea de

diversos colores), *pncA*-KO (línea verde aislada), y control de retrotranscripción (línea marrón).



B. Plot de amplificación de genes *pncA* de las cepas complementadas no inducidas (líneas en conjunto) e inducidas (líneas aisladas).



C. Plot de amplificación de genes *16S* (gen housekeeping) de las cepas complementadas y de los aislados clínicos (líneas en conjunto), y control de retrotranscripción (línea marrón).

ANEXO 16: OBTENCIÓN DE PZAsas RECOMBINANTES

PRODUCIDAS EN *E. coli*

El protocolo descrito a continuación fue adaptado del estudio realizado por Patricia Sheen, PhD. “Molecular Diagnosis of pyrazinamide resistance and molecular understanding of the pyrazinamide functionality in *Mycobacterium tuberculosis*”, Tesis para optar grado de Doctor en Filosofía, submitido a la Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health en el año 2007.

1. Clonación del gen *pncA*

Se amplificó el gen *pncA* de *M. tuberculosis* H37Rv a partir su genoma usando oligonucleótidos con los sitios de restricción NcoI: 5´ CCC CCA TGG GCC GGG CGT TGA TCA TC y para XhoI: 5´ CCC CTC GAG GGA GCT GCA AAC CAA CTC. Una doble digestión con las enzimas NcoI y XhoI (New England Biolabs, USA) fue realizada en los productos de amplificación del gen purificado *pncA* y en el plásmido pET28a (Novagen, USA). El gen del *pncA* fue insertado en el plásmido pET28a (Novagen) usando la T4 ADN ligasa (New England BioLabs, USA) luego de una incubación por 16 horas a 16°C resultando en pET28a::His₆-*pncA*. Seis histidinas fueron añadidas en el extremo carboxilo terminal y una glicina al comienzo del extremo amino terminal para crear un sitio de corte para la enzima NcoI.

La reacción de ligación fue empleada para transformar a la células *E. coli* Novablue (Novagen) mediante shock térmico. Los plásmidos fueron extraídos **con el** el kit de extracción de plásmidos (QIAGEN, USA) y fue secuenciado en ambas direcciones con el secuenciador ABIPRISM (Applied Biosystems, USA) para asegurar que el gen estuviera en el marco de lectura correcto para la expresión de la proteína His₆-*PncA* marcada.

2. Expresión de la enzima PZAsa recombinante

Para la expresión de la PZAsa, se prepararon células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) pLyss (Novagen). Se inoculó una colonia en 2 mL de medio LB y se incubó a 37°C en agitación constante durante 16 horas. Luego se transfirió 1 mL en 50 mL de medio LB, y se incubó a 37°C en agitación constante hasta obtener un OD₆₀₀ = 0.4. cosechar las células por centrifugación a 4000 x g por 10 minutos a 4°C. el pellet

celular fue lavado con 20 mL de CaCl₂ 0.1 M más glicerol al 15%, previamente enfriado. Se homogenizó y se reservó por 15 minutos en hielo. Nuevamente se centrifugó a 4000 x g por 10 minutos a 4°C, y el pellet fue resuspendido en 1 mL de CaCl₂ 0.1 M, y alicuotados en fracciones de 50 uL, y almacenadas a -70°C.

Las células competentes anteriormente preparadas fueron transformadas con el plásmido pET28a::His₆-pncA (40 a 100 ng) mediante shock térmico, descrito en el Anexo 02. Una colonia fue inoculada en 10 mL de medio LB más kanamicina (40 ug/mL) incubándolas a 37°C en agitación constante hasta obtener un OD₆₀₀ = 0.5-1.0. Luego, se agregó 250 uL de isopropil β-D-tiogalactosido o IPTG 1M, y se dejó inducir la expresión a 37°C durante 6 horas en agitación constante. Las células fueron centrifugadas a 6037.2 g y a 4°C por 20 minutos y el pellet fue resuspendido en 20 ml de tampón de unión pH 7.4 (fosfato sódico 20mM, NaCl 0.5 M, imidazol 20 mM). Las células resuspendidas fueron almacenadas a -70°C.

3. Purificación de la enzima PZAsa

Las células congeladas a -70°C fueron descongeladas a 37°C y congeladas nuevamente a -70°C tres veces. En un baño de hielo, la suspensión fue sonicada usando el sonicador S3000 (Misonix Inc), con un nivel de poder de 3 por 3 ciclos (cada ciclo consistió de 1 segundo activo y 1 segundo inactivo durante un minuto con descansos de 3 minutos entre cada ciclo). El lisado celular fue centrifugado a 12581 g y a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante, conteniendo la fracción soluble de interés, fue recuperado y almacenado a -70°C.

El lisado fue utilizado para purificar la enzima PZAsa mediante cromatografía de afinidad. Para esto, el sobrenadante se cargó en la columna “His-trap chelating”

(Pharmacia, Suecia) de capacidad de 5 ml, que fue pre-empaquetada con “Ni Sepharose High Performance”, y luego se realizaron lavados con 40, 60 y 500 mM de Imidazol, 0.5 M NaCl y 20 mM buffer fosfato (pH 7.4). Los tampones fueron adicionados en orden creciente a la concentración de imidazol y fueron reemplazados cada vez que el pico del cromatograma descendía y la señal del espectrofotómetro se hacía constante.