



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES
CON MUTACIONES COMPENSATORIAS A
MUTACIONES EN *rpoB* EN CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis RESISTENTES A
RIFAMPICINA.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Angie Katiushka Toledo Cornejo

Lima – Perú

2017

JURADO EXAMINADOR

Presidente : Dra. Dora Maurtua Torres

Vocal : Mg. Juan Agapito Panta

Secretario : Dr. Pablo Tsukayama Cisneros

Fecha de sustentación : 15 de diciembre del 2017

ASESOR DE TESIS

Dra. Patricia Sheen Cortavarria

Departamento Académico de Ciencias Celulares y Moleculares

DEDICATORIA

A mis padres, por su infinita paciencia, gran motivación y constante apoyo a lo largo de mi vida y mi educación. Por compartir conmigo la pasión por descubrir; además, de ser los mejores compañeros de viaje en esta travesía llamada investigación.

AGRADECIMIENTOS

A Patricia Sheen y Mirko Zimic, por ser fuente de inspiración y ejemplo a seguir en el mundo de la ciencia. Por la confianza depositada y los conocimientos compartidos.

Al equipo del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular, siempre dispuesto a ayudar y aconsejar.

RESUMEN

La rifampicina (RIF) es uno de los medicamentos más importantes en el tratamiento de primera línea de tuberculosis (TB) y su mecanismo de acción consiste en unirse a la subunidad beta de la ARN polimerasa (codificada por el gen *rpoB*) inhibiendo la transcripción. La resistencia a RIF se debe a mutaciones en *rpoB* que modifican la subunidad beta de la ARN polimerasa impidiendo la unión del medicamento. Mutaciones en este gen reducen el fitness bacteriano lo que conlleva a la generación de mutaciones compensatorias que incrementan la expresión de proteínas.

Se propone que al haber proteínas que se sobre-expresen en cepas resistentes a RIF, los antígenos pueden ser detectados por el sistema inmune del hospedero generando anticuerpos que estarán presentes en PBMC. Con ello, será posible desarrollar un inmunoensayo para detectar cepas resistentes a RIF. Probablemente, las proteínas que se estarían sobre-expresando en cepas resistentes a RIF en forma compensatoria serían aquellas que presenten ratios altos de velocidad de traducción cuando el gen que las codifica presente mutaciones.

Objetivo: El presente estudio tiene como objetivo evaluar mediante qPCR sobre-expresión de genes que han mutado en respuesta a reducción del fitness bacteriano de cepas resistentes a RIF a causa de mutaciones en *rpoB*.

Métodos: Cuatro cepas de *M. tuberculosis* fueron analizadas de las cuales 2 fueron sensibles a RIF y 2 resistentes a RIF. Para cada cepa se midió la expresión de los genes Rv1175c, Rv3041c, Rv3822, Rv2455c, Rv0791c, Rv2131c, Rv3661, Rv2568c, Rv1674c, Rv3395c y Rv2290, los cuales fueron seleccionados de acuerdo a la presencia la velocidad de traducción dado por la presencia de mutaciones en dicho gen y su relación con la resistencia a RIF, mediante la cuantificación relativa de su ARNm por PCR cuantitativo en tiempo real.

Resultados: El gen Rv2131c sobre-expresa en las dos cepas resistentes a RIF. Los genes Rv2568c, Rv1674c, Rv3395c y Rv2290 aumentan su nivel de expresión en las tres cepas del estudio con respecto a la cepa nativa.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*; *rpoB*, nivel de expresión de ARNm; resistencia a RIF, mutaciones compensatorias.

ABSTRACT

Rifampicin (RIF) is one of the most important drugs in first-line tuberculosis (TB) treatment and its mechanism of action is to bind to the beta subunit of RNA polymerase (encoded by the *rpoB* gene) by inhibiting transcription. Resistance to RIF is due to mutations in *rpoB* that modify the beta subunit of RNA polymerase by preventing drug binding. Mutations in this gene reduce bacterial fitness which leads to the generation of compensatory mutations that increase the expression of proteins.

It is proposed that as there are proteins that are overexpressed in strains resistant to RIF, the antigens can be detected by the host's immune system, generating antibodies that will be present in PBMC. With this, it will be possible to develop an immunoassay to detect strains resistant to RIF. Probably, the proteins that would be overexpressing in RIF-resistant strains in a compensatory manner would be those that show high ratios of translation speed when the gene encoding them present mutation.

Objective: The present study aims to identify by qPCR overexpression of genes that have mutated compensatorily in response to reduced bacterial fitness because of mutations in *rpoB*.

Methods: Four strains of *M. tuberculosis* were analyzed from which 2 were sensitive to RIF and 2 were resistant to RIF. For each strain the expression of Rv1175c, Rv3041c, Rv3822, Rv2455c, Rv0791c, Rv2131c, Rv3661, Rv2568c, Rv1674c, Rv3395c and Rv2290 genes was measured by quantitative real-time PCR. Genes were selected according to the presence of speed of translation given by the presence of mutation in the gene and its relation with resistance to RIF.

Results: The Rv2131c gene was overexpressed in the two RIF resistant strains. The Rv2568c, Rv1674c, Rv3395c and Rv2290 genes increase their expression level in the three strains of the study.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; *rpoB*, mRNA expression level; resistance to RIF, compensatory mutations.

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cepa nativa, 1 cepa sensible y 2 cepas resistentes a RIF con su respectiva mutación y cambio de aminoácido en el gen <i>rpoB</i>	14
Tabla 2. Mutación, tipo de mutación y aminoácido mutado de cada gen presente en las 3 cepas analizadas.....	15
Tabla 3. Características de cada gen escogido para el análisis y de la proteína que codifica.....	ANEXO 1
Tabla 4. Primers forward y reverse de cada uno de los genes seleccionados para el estudio.....	ANEXO 2
Tabla 5. Resultados de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de tres repeticiones para cada gen y cada cepa del estudio.....	ANEXO 5
Tabla 6. Promedios y desviaciones estándar de las tres repeticiones de cada gen en cada cepa del estudio	ANEXO 6

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Tendencias de la incidencia de TB y TBP FP (A) y la tasa de TB-MDR (B) en Perú entre los años 1991 y 2014.	2
Gráfico 2. Gráfico de barras de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de expresión relativa de los genes Rv1175c, Rv3041c, Rv3822, Rv2455c, Rv0791c, Rv2131c y Rv3661 en las 4 cepas de MTB.....	25
Gráfico 3. Gráfico de barras de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de expresión relativa de los genes Rv2568c, Rv1674c, Rv3395c, Rv2290 en las 4 cepas de MTB.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Flujograma del proceso metodológico seguido en el presente estudio.....	12
Figura 2. Dibujo del procedimiento de cultivo y reactivación de las cepas de MTB.....	16
Figura 3. Diagrama del procedimiento de aislamiento de ARN con Trizol y Lysing Matrix B con beads de sílica.....	18
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TBE-1X.....	23
Figura 5. Resultado de qPCR de la amplificación del gen housekeeping 16S correspondiente a la cepa resistente a RIF 2.....	ANEXO 4

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ARN	:	Ácido ribonucleico
ARNm	:	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	:	Ácido ribonucleico de transferencia
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISPOT	:	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos
EMB	:	Etambutol
INH	:	Isoniacida
KAN	:	Kanamicina
MIC	:	Concentración mínima inhibitoria
MTB	:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PBMC	:	Célula mononuclear de sangre periférica
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
RIF	:	Rifampicina
RRDR	:	Región determinante de resistencia a rifampicina
qPCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
SNPs	:	Polimorfismo de nucleótido único

TB	:	Tuberculosis
TBE	:	Tris/Borato/EDTA
TB-MDR	:	Tuberculosis multidrogo resistente
TBP FP	:	Tuberculosis pulmonar frotis positivo
TB-RR	:	Tuberculosis resistente a rifampicina
TB-XDR	:	Tuberculosis extremadamente resistente
VIH/SIDA	:	Virus de inmunodeficiencia humana / síndrome de inmunodeficiencia adquirida

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ESTUDIOS PREVIOS.....	7
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
IV. HIPÓTESIS.....	10
V. OBJETIVOS.....	11
V.1. Objetivo general.....	11
V.2. Objetivos específicos.....	11
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
VI.1. Selección de cepas y genes a analizar.....	12
VI.2. Cultivo de MTB.....	16
VI.3. Aislamiento de ARNm.....	16
VI.4. Transcripción reversa específica.....	19
VI.5. Cuantificación relativa de expresión de ARNm con PCR en tiempo real.....	19
VII. RESULTADOS.....	23
VII.1. Aislamiento de ARNm.....	23

	VII.2. Cuantificación relativa de ADNc en PCR en tiempo real (qPCR).....	24
VIII.	DISCUSIÓN.....	27
IX.	CONCLUSIONES.....	30
X.	RECOMENDACIONES.....	31
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
XII.	ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las principales enfermedades infecciosas más letales en todo el mundo siendo causante de alrededor 10.4 millones de casos de TB activa en el año 2015 de los cuales 1.5 millones fallecieron. Cerca del 58% de todos los casos se ubica en Asia Sudoriental – Pacífico Occidental y un 28% en África (1). Además, el Perú tiene cerca del 3% de la población infectada en el continente americano y el 12% de todos los casos América del Sur (2).

En el Perú, la tendencia de incidencia de TB y TBP FP ha disminuido considerablemente en los últimos años (Gráfico 1A) y la mortalidad se ha reducido en un 47% desde 1990 (3); sin embargo, ha habido un incremento acelerado de resistencia a los fármacos llegando a superar los 4 casos por cada 100 000 habitantes (Gráfico 1B) (4). La tendencia de TB multidrogo resistente (TB-MDR) para los años 2013 y 2014 fue de 4%, lo que es superior a lo reportado en años anteriores (1).

Esta enfermedad es ocasionada por el microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* que es una bacteria alcohol-ácido resistente cuyo crecimiento es dependiente de la presencia de oxígeno debido a que es aeróbica estricta y al pH del medio (5).

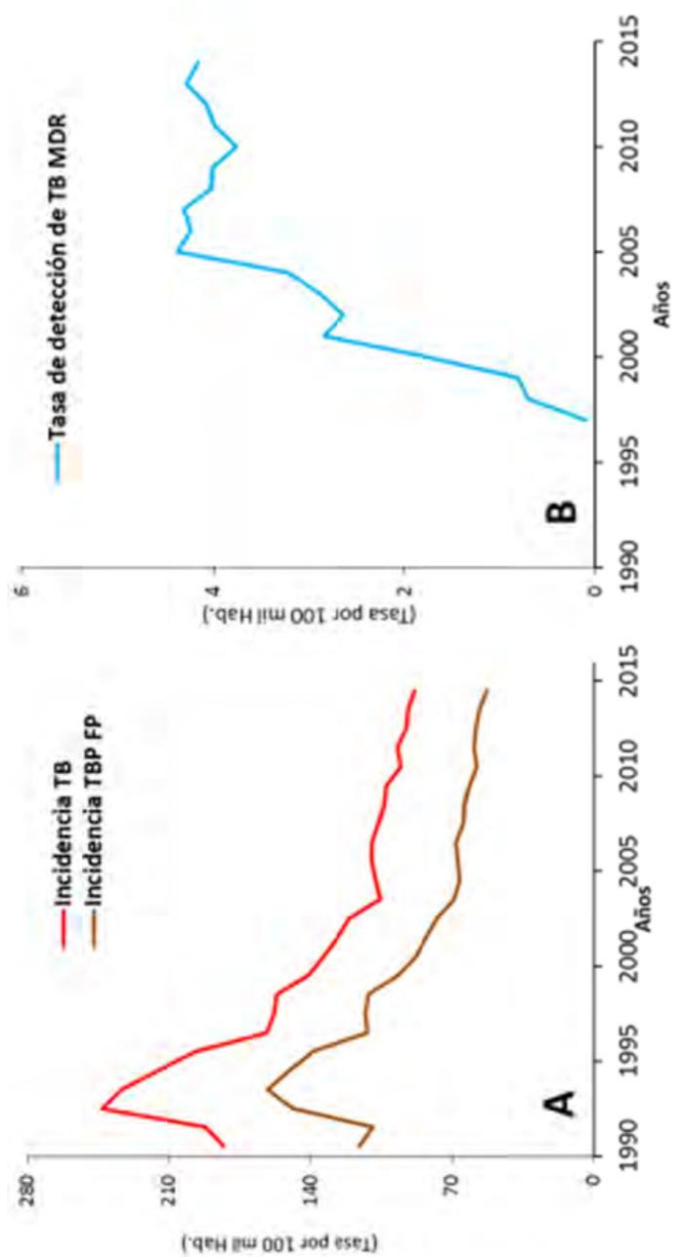


Gráfico 1. Tendencias de la incidencia de TB y TBP FP (A) y la tasa de TB-MDR (B) en Perú entre los años 1991 y 2014. Fuente: MINSA (4)

El tratamiento antituberculoso consiste en la utilización de cuatro drogas durante los primeros dos meses, rifampicina (RIF), isoniacida (INH), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA), posteriormente, se continúa con la rifampicina e isoniacida durante un periodo de cuatro meses (6,7). Cabe resaltar que la INH es la más potente contra los bacilos en multiplicación durante el tratamiento (8). La efectividad del tratamiento depende en gran medida de su cumplimiento riguroso e ininterrumpido.

Tuberculosis multidrogo resistente (TB-MDR) se le denomina a aquellas cepas que son capaces de sobrevivir a la isoniacida (INH) y la rifampicina (RIF), los cuales son medicamentos eficaces en el tratamiento de TB (9). La tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR) es capaz de sobrevivir a medicamentos más eficaces, como las fluoroquinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina o moxifloxacina) y las drogas de segunda línea (kanamicina, capreomicina o amikacina) (10). En los últimos años, ha habido una creciente aparición de TB-MDR y TB-XDR en países industrializados y en vías de desarrollo (11).

Los factores que inducen la resistencia a antibióticos son múltiples, entre ellas: 1) la utilización generalizada de antimicrobianos, 2) el uso de dosis no adecuadas y 3) la interrupción del tratamiento.

Se puede distinguir dos tipos de resistencia: 1) la natural que comprende los mecanismos intrínsecos y permanentes determinados genéticamente, y 2) la adquirida que se presenta cuando hay mutaciones puntuales a nivel de ADN o por la adquisición de plásmidos, integrones, etc.

A nivel bioquímico y molecular, se observa tres mecanismos: 1) inactivación del antibiótico, 2) modificación del blanco del antibiótico y 3) permeabilidad de membrana (12).

La rifampicina (RIF) es uno de los medicamentos más importantes en el tratamiento de primera línea de TB y es un factor clave en la determinación de la efectividad del mismo (7,13), esto se debe a que más del 90% de cepas resistentes a RIF, también son resistentes a INH (14,15). Su mecanismo de acción consiste en unirse a la subunidad beta de la ARN polimerasa, la cual es codificada por el gen *rpoB*, inhibiendo la transcripción (13,16).

La resistencia a RIF se logra cuando se presentan mutaciones en *rpoB* que modifican la subunidad beta de la ARN polimerasa impidiendo la unión del medicamento. En estudios previos se ha observado que alrededor del 95% de las cepas resistentes a RIF, presentaban mutaciones en una región de 81 pb, que comprende desde el codón 507 hasta el codón 533, a la que se le denomina Región Determinante de Resistencia a RIF (RRDR por sus siglas en inglés)(17,18). Cabe resaltar que dentro de esta región, las mutaciones en los codones 516, 536 y 531 son responsables de más del 90% de cepas resistentes a RIF y el nivel de resistencia varía según el codón afectado (13,19–21).

Dadas las mutaciones en el gen *rpoB*, el fitness bacteriano se reduce debido a que la efectividad de la ARN polimerasa se ve afectada y por ello, la transcripción no se lleva a cabo de manera normal lo que genera alteraciones en el tiempo de duplicación, infectividad y patogenicidad. Sin embargo, se ha observado que el costo del fitness es mejorado parcial o completamente por mutaciones compensatorias. Estas observaciones son producto de los estudios

realizados *in vitro* e *in vivo* con *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* (22,23) y en estudios clínicos con *Helicobacter pylori* y *Staphylococcus aureus* (24,25). Esto en concordancia con lo postulado por Bergval et al. en 2007 quien indica que “mutaciones en un gen tan crítico para la supervivencia bacteriana como *rpoB*, muy probablemente tenga efectos en muchas áreas de la función celular” y “quizás, todas las cepas que llevan mutaciones en *rpoB* tienen una expresión alterada de una amplia gama de genes”, sugiere que *M. tuberculosis* presenta mutaciones compensatorias a la reducción del fitness bacteriano. En su estudio, trabajó con 6 cepas mutantes de *M. tuberculosis* que tenían mutaciones en *rpoB* y encontró que en 4 de ellas, había aumento de la expresión del gen *dnaE2* entre 2 y 5 veces en comparación con la cepa nativa (26).

En un estudio realizado en Rusia, se observó que la mayoría de cepas MDR aisladas tenían mutaciones en el promotor del gen de virulencia *eis* haciendo posible el incremento de su expresión y por ende, favoreciendo la virulencia, la preservación del fitness y la resistencia a KAN (27). En otro estudio que también identificó mutaciones en el mismo promotor, se obtuvo entre 20 y 180 veces más transcritos de ARNm de *eis* en relación a cepas sin mutaciones; esto a su vez se refleja en el aumento del nivel de expresión de proteínas (28).

También, hay evidencia de que una cepa de MTB con mutación en *rpoB* resistente a RIF sobre-expresa las proteínas ppsA (Rv2931), ppsB (Rv2932) y ppsC (Rv2933) hasta 10 veces más en relación a la cepa nativa lo que indicaría que hay estrecha asociación entre la alteración de la concentración de proteínas de ciertos genes y la resistencia a RIF (29). Adicionalmente, se ha asociado la

resistencia a RIF y mutaciones en *rpoB* en MTB con alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos (30).

Los resultados presentados aportan conocimientos importantes para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos de TB que sirvan de apoyo a los métodos convencionales. Incluso, en los últimos años, se ha enfatizado el uso de PCR en tiempo real (qPCR) como método diagnóstico que además, hace posible determinar cepas MDR y XDR. Por ejemplo, Reddington et. al, (31) han observado que mediante el análisis de la expresión de genes con multiplex Real-time PCR, se puede identificar y diferenciar con certitud las especies *M. tuberculosis*, *M. canettii* y cepas complejas de *M. tuberculosis*, lo cual no se lograba con métodos de cultivo, tinción, determinación de resistencia convencionales e incluso kits comerciales. De igual manera, Heng Li (32) hace detección rápida de *M. tuberculosis* resistente a PZA mediante qPCR de un fragmento largo del gen *pncA*. Él observó que amplificando ADN de todo el gen *pncA* (incluyendo promotor y ORF) de muestras de esputo, se puede determinar si la cepa presenta mutaciones en el gen que le podrían conferir resistencia al medicamento con un 92% de sensibilidad y un 97% de especificidad al ser comparada con el método de cultivo estándar.

II. ESTUDIOS PREVIOS

El Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en convenio con la Universidad de Pensilvania (UPENN-UPCH) ha desarrollado un proyecto llamado “Pilot Research Proposal for Bioinformatics-driven Antigen Identification for the Development of an Immunologic Assay for the Diagnosis of Drug-Resistant Latent *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) Infection” el cual tiene por objetivo generar datos preliminares que permitan investigar cómo el sistema inmune del hospedero puede responder específicamente a antígenos de MTB que se expresan de forma selectiva durante la resistencia a medicamentos. Para ello, es necesario conocer posibles targets que permitan facilitar el diagnóstico de MTB-MDR.

Se secuenció el genoma completo de 68 cepas clínicas de MTB de pacientes limeños con TB y se tomó como cepa de referencia la cepa nativa H37Rv. El alineamiento de las secuencias se hizo con el programa NextGENe (version 2.2.0, SoftGenetics) a fin de identificar SNPs e indels. Finalmente, se identificó 49 cepas resistentes a RIF con mutaciones en la región RRDR de *rpoB* y 19 cepas sensibles a RIF sin mutaciones en *rpoB*.

Se calculó *in silico* la velocidad relativa de traducción de cada gen tanto en la cepa nativa como en las cepas mutantes considerando que el tiempo de incorporación de un aminoácido es inversamente proporcional a la abundancia del ARNt asociado a dicho aminoácido. Con estos datos, se calculó un ratio que compara velocidad de traducción de un gen en una cepa mutante con respecto a la cepa nativa ($Ratio_i = V_{mut_i} / V_{wt_i}$); los valores mayores a 1 indicaron

aumento de velocidad de traducción y los valores menores a 1 indicaron disminución de la misma.

Luego, se hizo una regresión logística para evaluar la asociación entre el ratio de velocidades y el estado sensible o resistente de las cepas. Si el Odds Ratio obtenido era mayor a 1, había asociación positiva con el estado de resistencia; si era menor a 1, la asociación era negativa con el estado de resistencia. Se consideró una asociación significativa con un valor $p \leq 0.05$. Finalmente, se obtuvo una lista de 14 genes con mutaciones puntuales asociadas a cambio de velocidad de traducción y 11 cepas con asociación significativa al estado de resistencia a RIF.

Para el presente estudio, se seleccionó al azar 9 genes de la lista: Rv1175c, Rv3041c, Rv3822, Rv2455c, Rv0791c, Rv2568c, Rv1674c, Rv3395c, y Rv2290; además, se estudió dos genes con evidencia de aumento de concentración proteica en cepas con mutaciones en *rpoB*: Rv2131c y Rv3661 (29). La cepa de referencia nativa fue H37Rv y las cepas mutantes fueron escogidas al azar al observarse que todas compartían el mismo patrón de variación teórica de la velocidad de traducción: 1 cepa clínica sensible a RIF y 2 cepas clínicas resistentes a RIF. Se espera encontrar genes que además de aumentar teóricamente su velocidad de traducción, también aumenten su transcripción para ser considerados posibles target para el diagnóstico de MTB-MDR mediante inmunoensayos.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La selección de genes candidatos a la sobre-expresión debido al proceso de compensación puede basarse en el análisis de la sobre-expresión *in silico*. Las proteínas sobre-expresadas pueden ser evaluadas con fines diversos como inmunodiagnóstico, respuesta al tratamiento de pacientes, etc.

Cuando MTB ingresa al organismo, los antígenos micobacterianos dan lugar a una respuesta inmune aumentando la actividad de macrófagos, linfocitos citotóxicos (CD8+) y linfocitos B que se encargan de la producción de anticuerpos. Ante evidencia de sobre-expresión de alguna proteína en cepas resistentes a un medicamento, sería posible diseñar un ensayo de ELISPOT en el que se fije la proteína sobre-expresada (antígeno) y se enfrente con los anticuerpos presentes en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). De darse una reacción positiva, se habría detectado satisfactoriamente, la presencia de una cepa resistente en un paciente TB.

IV. HIPÓTESIS

Al comprometerse el fitness bacteriano a causa de mutaciones en el gen *rpoB* en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a RIF, se generan mutaciones compensatorias que incrementan la expresión de proteínas (a nivel transcripcional y traduccional) como mecanismo de recuperación del mismo.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

- Identificar mediante qPCR sobre-expresión de genes que han mutado compensatoriamente en respuesta a reducción del fitness bacteriano a causa de mutaciones en *rpoB*.

V.2. Objetivos específicos

- Extraer ARNm de cepas sensibles y resistentes a RIF de MTB.
- Estandarizar el proceso de cuantificación relativa de ARNm mediante qPCR en la cepa nativa (cepa de referencia H37Rv).
- Comparar los niveles de expresión de ARNm entre las cepas resistentes a RIF y la cepa nativa de MTB.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El flujograma de la figura 1 muestra el orden secuencial de los procesos realizados en la metodología. Posteriormente, se desarrolla detalladamente cada uno de ellos.

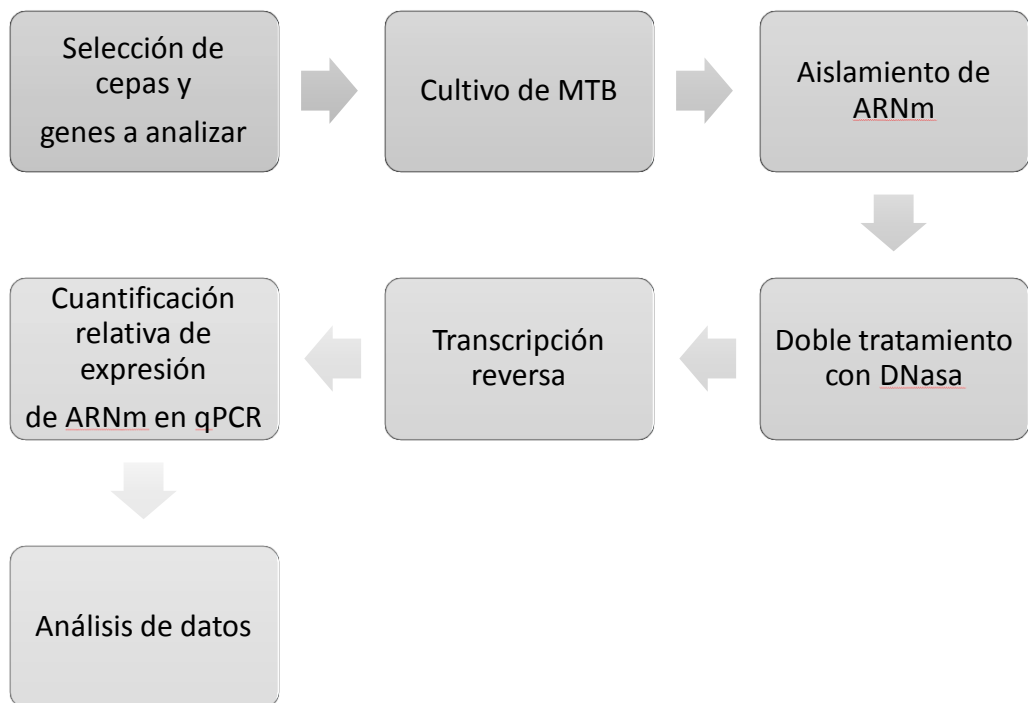


Figura 1. *Flujograma del proceso metodológico seguido en el presente estudio.*

VI.1. Selección de cepas y genes a analizar

En estudios previos, en la unidad de Bioinformática de la Universidad Peruana Cayetano Heredia se estudió la asociación del estado de resistencia y el aumento de la traducción a cada gen mediante regresión logística. Se seleccionaron los genes que presentaron asociación significativa: Odds Ratio mayor a 1 y $P \leq 0.5$.

Se encontró 14 genes candidatos cuya variación en la velocidad de traducción podría estar relacionada con el estado de resistencia a RIF y se seleccionó 9 de

aquellos que presentaban asociación positiva (Rv1175c, Rv3041c, Rv3822, Rv2455c, Rv0791c, Rv2568c, Rv1674c, Rv3395c, y Rv2290), además, se incluyó los genes Rv2131c y Rv3661 que fueron analizados por Gregory Bisson et. al en 2012 (29), de los cuales se conoce que la concentración proteica aumenta en cepas resistentes a RIF con mutaciones en el gen *rpoB*. En el anexo 1, se muestra los 11 genes que se analizaron en este estudio y se detalla su tamaño, el tamaño de la proteína que codifican y la función que llevan a cabo. Además, en el anexo 2, se encuentra la secuencia de los primers forward y reverse que se usaron para la amplificación de cada gen y el tamaño de cada amplicón.

De un grupo de 49 cepas clínicas, 11 fueron resistentes a RIF y presentaron mutaciones en genes asociadas a una alta tasa de traducción. Se seleccionó dos de ellas al azar ya que todas compartían el mismo patrón de variación teórica de la velocidad de traducción. Ambas tenían un MIC de 16g/ml y presentaban un cambio de nucleótido en la posición 1590 del gen *rpoB* en la región RRDR con cambio de aminoácido S450L. Cabe resaltar que esta es la mutación más frecuente que caracteriza a las cepas resistentes a RIF (33). Adicionalmente, se seleccionó una cepa clínica sensible a RIF sin mutaciones en *rpoB* con un MIC de 0.063ug/ml.

En la tabla 1, se detallan las características fenotípicas y genotípicas de las cepas analizadas. En la tabla 2, se especifica el tipo de mutación presente en cada gen para cada cepa del estudio, así como el correspondiente cambio de nucleótido y aminoácido.

Tabla 1. *Cepa nativa, 1 cepa sensible y 2 cepas resistentes a RIF con su respectiva mutación y cambio de aminoácido en el gen rpoB.*

Cepa	Descripción	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido
Wild type (H37Rv)	Nativa, sensible	-	-
Sensible a RIF	Sensible	-	-
Resistente a RIF 1	Resistente a RIF	1590	S450L
Resistente a RIF 2	Resistente a RIF	1590	S450L

Tabla 2. *Mutación, tipo de mutación y aminoácido mutado de cada gen presente en las 3 cepas analizadas.*

Gen	Cepa	Mutación	Tipo de mutación	Aminoácido mutado
	Sensible a RIF	TGC por TCC	No silenciosa	C210S
	Resistente a RIF 1	TGC por TCC	No silenciosa	C210S
Rv1175c	Resistente a RIF 1	GCT por GCC	Silenciosa	A656A
	Resistente a RIF 2	TGC por TCC	No silenciosa	C210S
	Resistente a RIF 2	GCT por GCC	Silenciosa	A656A
	Sensible a RIF	WT	-	-
Rv3041c	Resistente a RIF 1	GCT por GCC	Silenciosa	A16A
	Resistente a RIF 2	GCT por GCC	Silenciosa	A16A
	Sensible a RIF	WT	-	-
Rv3822	Resistente a RIF 1	AGT por AAT	No silenciosa	S130N
	Resistente a RIF 2	WT	-	-
	Sensible a RIF	WT	-	-
Rv2455c	Resistente a RIF 1	WT	-	-
	Resistente a RIF 2	WT	-	-
	Sensible a RIF	TCC por TGC	No silenciosa	S100C
Rv0791c	Resistente a RIF 1	WT	-	-
	Resistente a RIF 2	WT	-	-
	Sensible a RIF	WT	-	-
Rv2131c	Resistente a RIF 1	WT	-	-
	Resistente a RIF 2	WT	-	-
	Sensible a RIF	WT	-	-
Rv3661	Resistente a RIF 1	WT	-	-
	Resistente a RIF 2	WT	-	-
	Sensible a RIF	CGG por AGG	Silenciosa	R78R
Rv2568c	Resistente a RIF 1	WT	-	-
	Resistente a RIF 2	WT	-	-
	Sensible a RIF	GAA por GGA	No silenciosa	E189G
Rv1674c	Resistente a RIF 1	WT	-	-
	Resistente a RIF 2	WT	-	-
	Sensible a RIF	WT	-	-
Rv3395c	Resistente a RIF 1	WT	-	-
	Resistente a RIF 2	WT	-	-
	Sensible a RIF	WT	-	-
Rv2290	Resistente a RIF 1	WT	-	-
	Resistente a RIF 2	WT	-	-

VI.2. Cultivo de MTB

Los cultivos fueron realizados en una cabina de nivel de seguridad biológica clase II en un laboratorio de categoría III de acuerdo a las regulaciones de salud y seguridad al trabajar con MTB. Las cepas de MTB fueron reactivadas en agar 7H10 suplementado con OADC (ácido oxálico, albúmina, dextrosa and catalasa) de 3 a 4 semanas a 37°C (figura 2). Las cepas clínicas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia bajo el cumplimiento de las norma éticas de la institución (anexo 3).

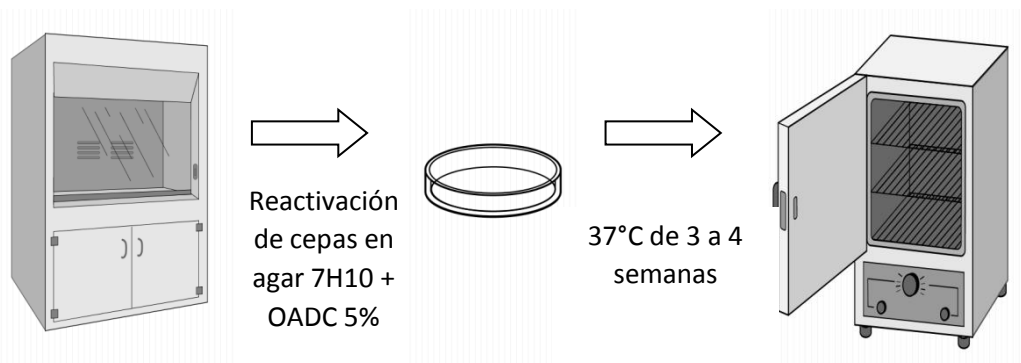


Figura 2. Dibujo del procedimiento de cultivo y reactivación de las cepas de MTB.

VI.3. Aislamiento de ARNm

La extracción de ARN fue realizada a partir del cultivo en agar con TRI Reagent (Sigma Aldrich) con un protocolo modificado que se describe a continuación. Se colocó tres asadas de cultivo en 1ml de trizol y se homogenizó. El homogenizado fue traspasado a un Lysing Matrix B de 2 ml con beads de sílica 0.1mm (MP Biomedicals) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Se agregó 200 ul de

cloroformo y se mezcló con vortex. La lisis de las células se realizó utilizando el Fast-Prep-24 (Applied Biosystems) 4 veces, dejando enfriar cada vez. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm (o 12000 g) por 10 minutos a temperatura entre 2 y 8 °C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo de microcentrífuga y se le agregó 200ul de cloroformo, luego se dejó incubar a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos en posición vertical. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 10000 rpm (o 12000 g) por 10 minutos a temperatura entre 2 a 8 °C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga nuevo, se adicionó 500ul de isopropanol y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y en posición vertical. Nuevamente, se centrifugó las muestras a 10000 rpm (o 12000 g) por 10 minutos a temperatura de 2 a 8 °C. Se observó un pellet blanco y se removió cuidadosamente el sobrenadante. Al pellet se le adicionó 1ml de etanol al 75% para lavarlo y se mezcló por inversión. Se centrifugó las muestras a 6000 rpm por 5 minutos a temperatura de 2 a 8 °C. Finalmente, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se secó el pellet a temperatura ambiente, colocando el tubo de microcentrífuga con el ARN sobre papel toalla estéril. El pellet de ARN fue diluido en 200ul de agua DEPC con pipeteo suave (figura 3).

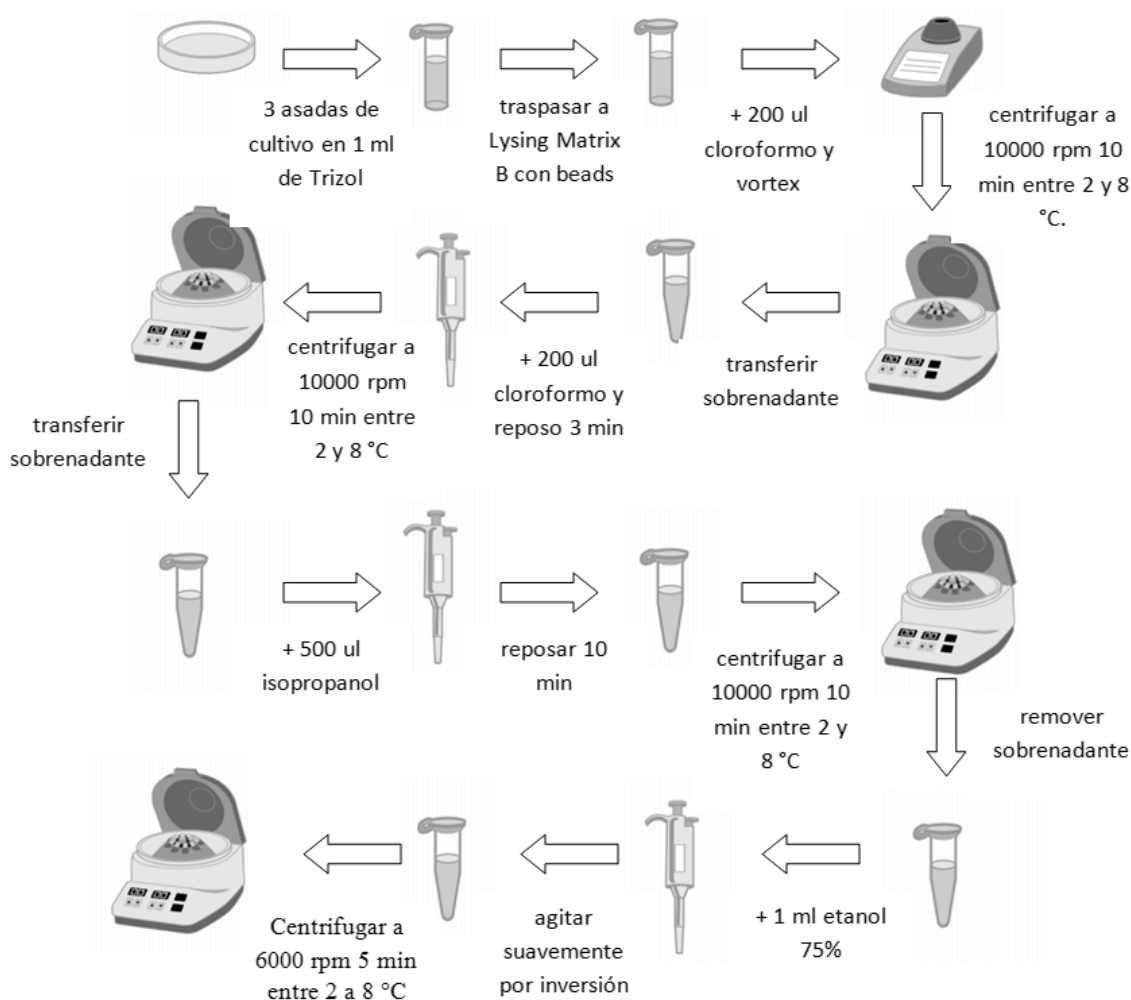


Figura 3. Diagrama del procedimiento de aislamiento de ARN con Trizol y Lysing Matrix B con beads de sílica.

La concentración de ARN aislado en cada muestra fue cuantificada por espectrofotometría con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) a una longitud de onda de 260nm. La integridad del ARN fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1X.

Con el fin de evitar la contaminación con ADN genómico y reducir el ruido en la qPCR, se realizó dos tratamientos con DNasaI. 200ng de ARN fueron tratados con 0,4U de DNasa/g de ARN en un volumen de reacción de 50 uL que contenía buffer de DNasa 1X y agua tratada DECP a 37°C durante 30 minutos. El

segundo tratamiento fue realizado bajo las mismas condiciones, pero en un volumen final de reacción de 25uL. Finalmente, la DNasa fue inactivada a 75°C durante 5 minutos.

VI.4. Transcripción reversa específica

Los genes fueron transcritos con primers específicos y el gen housekeeping 16S fue usado como control en un T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). La reacción fue llevada a cabo con reactivos TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems), en 20 ul de reacción que contenía 200 ng de ARN previamente tratado dos veces con DNasa I, Buffer 1X de retro transcripción, 5.5 mM MgCl₂, 2 mM de dNTPs, 0.5 uM de primer específico, 0.4 U / ul de inhibidor de RNasa, 2 U / ul de Transcriptasa reversa Multi Scribe y agua DECP tratada. Los parámetros térmicos fueron 1 ciclo a 25°C por 10 minutos, 1 ciclo a 48°C por 30 minutos, 1 ciclo a 95°C por 5 minutos y finalmente a 5°C por 5 minutos. Para verificar que no hubiera contaminación de ADN genómico, una reacción sin transcriptasa reversa fue agregada como control negativo. El ADNc fue guardado a -20°C hasta su utilización.

VI.5. Cuantificación relativa de expresión de ARNm con PCR en tiempo real

El ADNc fue cuantificado mediante amplificación en tiempo real usando un termociclador LightCycler Nano (Roche). Fueron mezclados 10 uL de LightCycler 480 SYBR Green I Master, 1.6 uL de cada primer forward y reverse (a concentración 10uM), 2uL de ADNc y 4.8uL de agua (incluido en el kit) bajo los siguientes parámetros de ciclamiento: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos y 72°C por 35 segundos,

1 ciclo de una rampa de 60°C a 95°C a 0.1°C/s y 1 ciclo de 40°C por 10 minutos.

El cálculo de la cuantificación relativa fue realizado con el método de Livak también conocido como el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (34,35) cuya derivación se basa en la característica exponencial de la ecuación de PCR (ec. 1) que luego es normalizada en primer lugar con respecto al gen de referencia que en este estudio es el gen housekeeping 16S ribosomal (HK) y con respecto a la cepa calibradora H37Rv (cb):

$$C_n = C_0 (1+E)^n \text{ _____ (ec. 1)}$$

Donde C_n es la concentración de copias de gen amplificado después de n ciclos, C_0 es la concentración inicial del gen antes de la amplificación y E es la eficiencia de amplificación del gen. El equipo de qPCR detecta la fluorescencia emitida durante la amplificación tras alcanzar un umbral determinado; el ciclo en el que esta fluorescencia es detectada se denomina Ct . Entonces, se reemplaza n por Ct (ec. 2).

$$C_{Ct} = C_0 (1+E)^{Ct} \text{ _____ (ec. 2)}$$

Los resultados fueron normalizados para cada gen usando ecuaciones para dicho gen (target) (ec. 3) y para el gen housekeeping 16S (HK) (ec. 4).

$$C_{Ct \text{ target}} = C_{0 \text{ target}} (1+E_{\text{target}})^{Ct \text{ target}} \text{ _____ (ec. 3)}$$

$$C_{Ct \text{ HK}} = C_{0 \text{ HK}} (1+E_{\text{HK}})^{Ct \text{ HK}} \text{ _____ (ec. 4)}$$

El ratio fue entre ambas ecuaciones fue calculado dividiendo la ecuación 3 entre la ecuación 4 (ec. 5)

$$\frac{C_{Ct\ target} = C_{0\ target} (1+E_{target})^{Ct\ target}}{C_{Ct\ HK} = C_{0\ HK} (1+E_{HK})^{Ct\ HK}} \quad \text{(ec. 5)}$$

Las eficiencias de ambos genes fueron consideradas iguales (ec. 6), por lo tanto se obtuvo la ecuación 7 donde K es una constante:

$$E_{target} = E_{HK} = E \quad \text{(ec. 6)}$$

$$K = \frac{C_{0\ target}}{C_{0\ HK}} (1+E)^{Ct\ target - Ct\ HK} \quad \text{(ec. 7)}$$

La cantidad normalizada del gen target ($C_{0\ target}/ C_{0\ HK}$) fue reemplazada por N_{target} que fue despejada quedando (ec. 8):

$$N_{target} = K (1+E)^{-(Ct\ target - Ct\ HK)} \quad \text{(ec. 8)}$$

La segunda normalización fue realizada calculando la ecuación tanto para la cepa a analizar (cepa) como para la cepa calibradora (cb) y se obtuvo el ratio (ec. 9).

$$\frac{N_{target\ cepa}}{N_{target\ cb}} = \frac{K (1+E)^{-(Ct\ target\ cepa - Ct\ HK\ cepa)}}{K (1+E)^{-(Ct\ target\ cb - Ct\ HK\ cb)}} \quad \text{(ec. 9)}$$

Ya que la constante K era igual para ambas ecuaciones, fueron eliminadas. Se obtuvo lo siguiente (ec. 10):

$$\frac{N_{\text{target cepa}}}{N_{\text{target cb}}} = (1+E)^{-(Ct \text{ target cepa} - Ct \text{ HK cepa}) + (Ct \text{ target cb} - Ct \text{ HK cb})} \quad \text{---(ec. 10)}$$

Como la eficiencia de amplificación en los genes era aproximadamente el 100%, E tomó el valor 1, por lo tanto, la ecuación final para el análisis de la expresión relativa de los genes target fue la siguiente (ec. 11):

$$\frac{N_{\text{target cepa}}}{N_{\text{target cb}}} = (2)^{-(Ct \text{ target cepa} - Ct \text{ HK cepa}) + (Ct \text{ target cb} - Ct \text{ HK cb})} \quad \text{---(ec. 11)}$$

Esta ecuación fue simplificada por Livak quien consideró $Ct \text{ target} - Ct \text{ HK}$ como ΔCT y $(Ct \text{ target cepa} - Ct \text{ HK cepa}) + (Ct \text{ target cb} - Ct \text{ HK cb})$ como $\Delta\Delta CT$ con lo que se obtuvo:

$$\text{Cantidad de gen target} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \text{---(ec. 12)}$$

Si el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculado era mayor a cero, por ejemplo 4, indicó que había 4 veces más expresión del gen con respecto a la cepa nativa, por el contrario, si el valor era menor a cero, por ejemplo 0.3, indicaba que la cepa analizada tenía 0.3 veces la cantidad de ARN target con respecto a la muestra nativa. La desviación estándar se calculó a partir de las tres repeticiones que se realizó para cada gen.

Cabe resaltar que para hacer uso de este método es importante considerar los siguientes aspectos:

1. La eficiencia de amplificación debe ser $100\% \pm 10\%$.
2. Correr al menos tres repeticiones de cada gen y cada muestra.
3. Correr cada gen en diferentes tubos.

VII. RESULTADOS

VII.1. Aislamiento de ARNm

Se realizó la extracción de ARNm de las cepas H37Rv, sensible a RIF, resistente a RIF 1 y resistente a RIF 2. Se muestra la electroforesis realizada en gel de agarosa 1% en buffer TBE-1X para comprobar la integridad de éstas (figura 4). En las cuatro cepas se observa claramente las bandas correspondientes al ARN ribosomal 23S y 16S. En la parte inferior se aprecia una gruesa banda de ARNm.

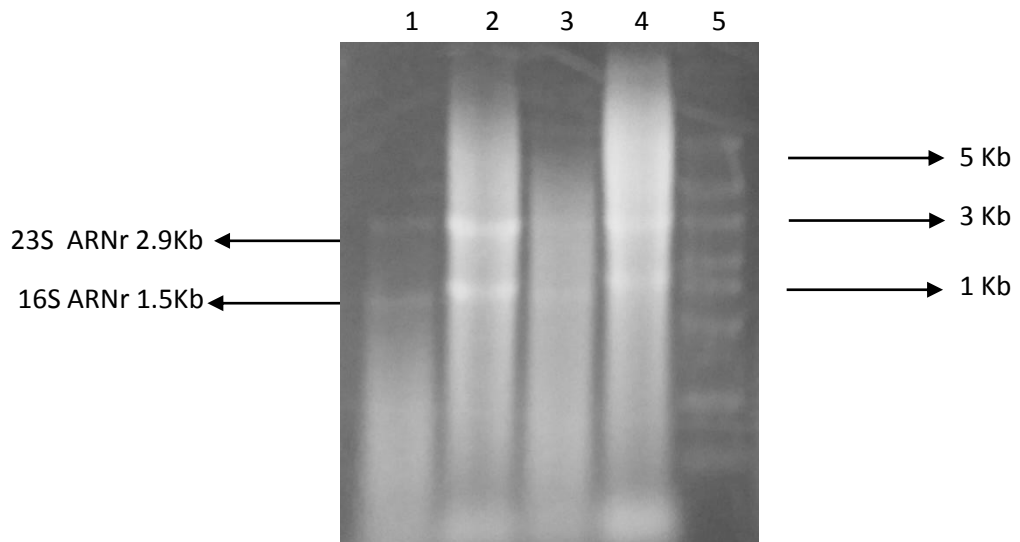


Figura 4. *Electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TBE-1X. Carril1: cepa H37Rv; Carril2: cepa sensible a RIF; Carril3: cepa resistente a RIF 1; Carril4: cepa resistente a RIF 2; Carril5: marcador 1Kb. Se observa en todas las muestras la presencia de dos bandas correspondientes a los ARN ribosomales 16S y 23S.*

VII.2. Cuantificación relativa de ADNc en PCR en tiempo real (qPCR)

El Ct del gen housekeeping 16S se tomó como gen de referencia y la cepa H37Rv fue el calibrador.

En todos los casos se obtuvo una diferencia de Ct entre las muestras con y sin transcriptasa reversa mayor a 9 confirmando que la contaminación con ADN es casi nula (anexo 4). Con los Cts obtenidos para cada reacción (anexo 5), se realizó los cálculos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que se realizaron según el método de Livak (anexo 6). Se halló el promedio y la desviación estándar de las 3 repeticiones realizadas para cada gen (anexo 7). Los resultados obtenidos mediante la cuantificación relativa normalizada con genes de referencia permiten hacer el análisis relativo con respecto al gen de referencia y a la cepa calibrador y los resultados no son absolutos.

En el Gráfico 2, se aprecia que los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de la expresión de los 5 genes (Rv1175c, Rv3041c, Rv3822, Rv2455c, Rv0791c) en las cepas mutantes no supera la expresión de genes en la cepa nativa. Sólo el gen Rv2131c se sobre-expresa en la cepa resistente a RIF 2 y el gen Rv3661 tiene una expresión mayor en la cepa sensible a RIF y la cepa resistente a RIF 2 con respecto a la cepa H37Rv.

En el gráfico 3, se observa la expresión de 4 genes (Rv2568c, Rv1674, Rv3395c y Rv2290) y en todos los casos, los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ son superiores a uno, es decir, se sobre-expresan.

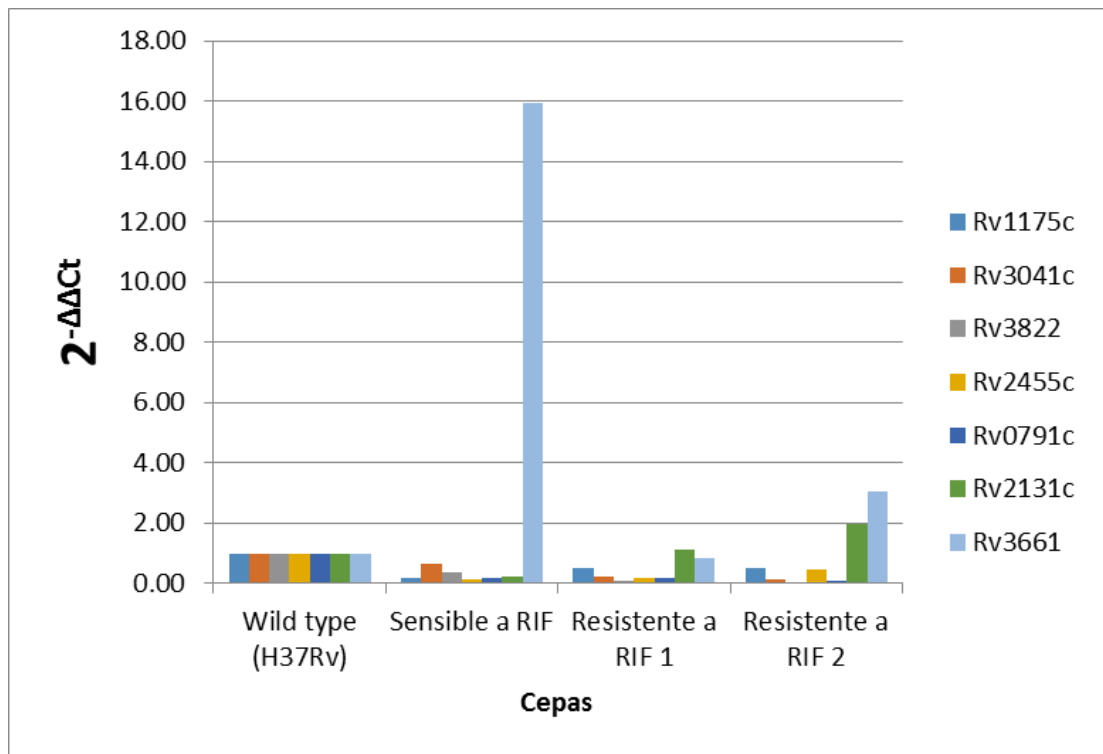


Gráfico 2. Gráfico de barras de los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de expresión relativa de los genes *Rv1175c*, *Rv3041c*, *Rv3822*, *Rv2455c*, *Rv0791c*, *Rv2131c* y *Rv3661* en las 4 cepas de MTB.

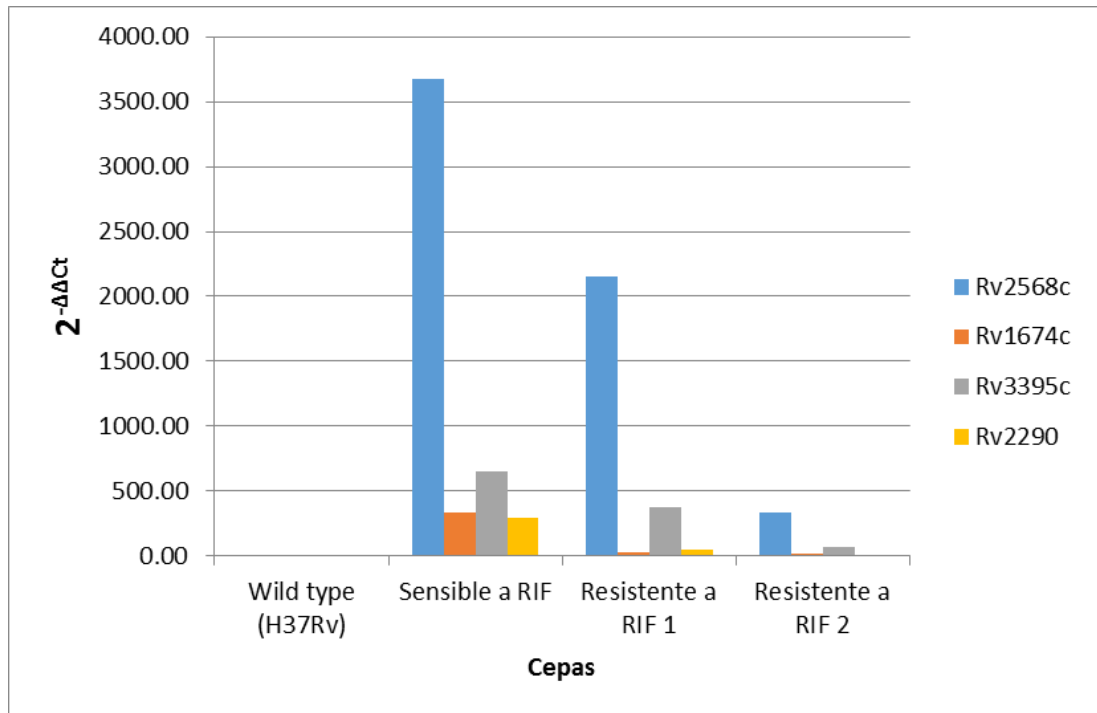


Gráfico 3. Gráfico de barras de los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de expresión relativa de los genes *Rv2568c*, *Rv1674c*, *Rv3395c*, *Rv2290* en las 4 cepas de MTB.

VIII. DISCUSIÓN

Esta investigación es un estudio exploratorio en el que se ha analizado la expresión de once genes en cuatro cepas, de las cuales 3 son cepas clínicas y cepa la H37Rv es la cepa nativa que se usó como calibrador. No hay estudios previos de la sobre-expresión a nivel transcripcional de los genes del estudio.

Los genes Rv1175c, Rv3041c, Rv3822, Rv0791c no se sobre-expresan en ninguna de las cepas en estudio, por el contrario, la expresión está disminuida en relación a la cepa de referencia. La función de estos genes no es conocida con exactitud, pero, en un estudio realizado por Griffin JE et al. en 2011 (42), se muestra que estos cuatro genes no son esenciales para el crecimiento *in vitro* de la cepa nativa H37Rv, por lo tanto es probable que la expresión del gen disminuya en las cepas mutantes para no generar gastos adicionales de energía ya que no se compromete el crecimiento normal del cultivo. En este estudio, la expresión del gen Rv2455 en las cepas mutantes es mucho menor que en la cepa nativa lo que concuerda con los resultados obtenidos por Tsolaki et al. en 2004, en los que el gen se encuentra total o parcialmente deletado en cepas clínicas. El autor propone que al tratarse de una proteína antigénica, su delección le conferiría ventaja selectiva durante la infección o transmisión de la bacteria (43).

Por otro lado, hay sobre-expresión de los genes Rv2131c, Rv3661, Rv2568c, Rv1674c, Rv3395c y Rv2290. En este estudio, se observa un incremento de la expresión del gen Rv2131c en ambas cepas resistentes con respecto a H37Rv, lo que estaría indicando que probablemente se trata de un gen importante para el metabolismo de la bacteria. El gen Rv2131c codifica una monofosfatasa CysQ

que se encuentra involucrada en el metabolismo de metabolitos que contienen sulfuro lo que contribuye a la patogenicidad de la bacteria (44). Además, se trata de un gen esencial para el crecimiento *in vitro* de la cepa H37Rv (42).

El gen Rv33661 tiene una expresión 3.07 veces mayor en la cepa resistente a RIF 2 con respecto a la H37Rv. Se ha identificado como una proteína hipotéticamente conservada cuya función estaría relacionada con la diferenciación celular ya que posee un alto porcentaje de identidad con proteínas similares en *Streptomyces cyaneus*, *Streptomyces azureus* y *Streptomyces coelicolor*.

En la investigación liderada por Bisson, se encontró a nivel traduccional que los genes Rv2131c y Rv3661 en conjunto con otros genes, se expresaban significativamente más en cepas mutadas en el gen *rpoB* que en cepas nativas (29).

El gen Rv2568c codifica para una proteína conservada hipotética que podría ser intermediaria en el metabolismo y la respiración (41). En este estudio el gen se sobre-expresa 333 veces más en la cepa resistente a RIF 2 y 2149 veces más en la cepa resistente a RIF 1. En la cepa sensible a RIF la expresión aumenta 36 veces. Este gen podría ser un posible candidato para estudios posteriores ya que si bien hay sobre-expresión del gen en todas las cepas, esta es mucho mayor en las cepas resistentes.

Los genes Rv1674c, Rv3395c y Rv2290 se sobre-expresan en las tres cepas del estudio, observándose que esta es mucho mayor en la cepa sensible. El gen Rv1674 codifica para una proteína regulatoria identificada en fracción de

membrana celular de H37Rv mediante 2DLC/MS (36). Rv3395 codifica para una proteína hipotética conservada que tiene similitud con la proteína RECA que participa en la reparación de ADN recombinante. Finalmente, Rv2290 codifica para una probable lipoproteína.

Adicionalmente, se hizo un análisis de las secuencias de los promotores de cada gen con el fin de identificar polimorfismos que podrían influir en la expresión de estos y no se encontró mutaciones.

En el presente trabajo, se identificó sobre-expresión de genes mediante qPCR, sin embargo, no es posible afirmar que para estas cepas se deba a la presencia de mutaciones compensatorias en respuesta a reducción del fitness bacteriano a causa de mutaciones en *rpoB*.

Los resultados de este estudio no evidencian relación entre la sobre-expresión de genes analizados y el estado sensible o resistente de las cepas clínicas estudiadas. En este modelo, se evalúa la capacidad de sobre-expresión de genes asociados a la resistencia a RIF, sin embargo, dicha asociación no se presenta debido a que aunque la velocidad de traducción aumente, no necesariamente hay sobre-expresión. Esto indicaría que la transcripción y la traducción serían dos procesos independientes que se regulan con mecanismo que no están relacionados entre sí.

IX. CONCLUSIONES

- a. No hay presencia de mutaciones compensatorias en respuesta a reducción del fitness bacteriano a causa de mutaciones en *rpoB* en las cepas analizadas.

- b. No hay relación entre la sobre-expresión de genes y estado sensible o resistente de las cepas estudiadas.

- c. La transcripción y la traducción serían dos procesos independientes que se regulan con mecanismo que no están relacionados entre sí.

X. RECOMENDACIONES

Durante la extracción de ARN es importante tener en consideración que el ambiente en el que se va a trabajar debe estar totalmente libre de RNasas, ya que el ARN es menos estable que el ADN y es más probable que se degrade por la presencia de contaminantes. El protocolo de extracción con trizol se modificó al realizar la lisis de las bacterias con el trizol y el cloroformo juntos, ya que se observó mayor integridad del ARN. Otro aspecto a considerar es que los guantes deben cambiarse periódicamente y que todos los materiales que van a usarse deben ser nuevos. Es importante realizar el proceso según el protocolo y no dejar pasar más tiempo del indicado para reducir al mínimo la degradación de ARN. Los tratamientos con DNasa son necesarios para asegurar que los resultados medidos con el qPCR sean producto del ADNc presente en la muestra y no se sobreestime los valores por presencia de ADN. Para hacer uso del método de Livak, es importante que la eficiencia de amplificación sea cercana al 100%, de lo contrario se debe analizar la expresión de genes con métodos como el Método de Pfaffl, que considera las variaciones de eficiencia en sus ecuaciones ya que considera la eficiencia de cada uno de los genes, además de usar más de una muestra calibradora (45).

Se debe considerar los genes Rv2131c, Rv3661, Rv2568c, Rv1674c, Rv3395c y Rv2290 en estudios posteriores de análisis de expresión de genes. Además, es necesario analizar la expresión de estos genes en más cepas a fin de tener una base de datos más completa.

Se podría realizar el experimento sometiendo a las bacterias a RIF, ya que bajo estrés es posible que se observe variaciones más críticas de expresión.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Salud. Análisis de la situación epidemiológica de la tuberculosis en el Perú 2015. 2015. [citado 5 Sept 2017]. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/3446.pdf>
2. Ministerio de Salud. Boletín epidemiológico. Semana epidemiológica N°29. 2017. [citado 5 Sept 2017]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2017/11.pdf>
3. Organización Mundial de la Salud. Global tuberculosis report 2015. 2015. [citado 5 Sept 2017]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf.
4. Ministerio de Salud. Situación de la tuberculosis en el Perú. 2011. [citado 5 Sept 2017]. Disponible en: http://www.minsa.gob.pe/portada/Especiales/2011/respiravida/archivos/Ayuda_memoria_Lanzamiento_TB.pdf
5. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, Fordham von Reyn C. Tuberculosis. *N Engl J Med*. 2013;368(8):745-55.
6. Mitchison DA. Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest*. 1979;76(6 Suppl):771-81.
7. Mitchison DA, Nunn AJ. Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1986;133(3):423-30.

8. Tobón CJ. Tuberculosis. *Medicina*. 2012;17(2):132-56.
9. Ministerio de Salud. Situación de la tuberculosis en el Perú. Informe de Gestión 2008. 2008. [citado 5 Sept 2017]. Disponible en: <ftp://ftp2.minsa.gob.pe/descargas/dgsp/ESN-tuberculosis/normaspublicaciones/InfEvaluacion2008.pdf>
10. World Health Organization. WHO Global Task Force on XDR-TB [Internet]. WHO. [citado 5 Sept 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/tb/publications/tb-xdrtb-report2006/en/>
11. World Health Organization. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. WHO/HTM/TB/2014.11 [Internet]. [citado 5 Sept 2017]. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/pmdt_companionhandbook/en/
12. Sussmann O, Mattos L, Restrepo A. Resistencia Bacteriana. *Universitas Médica* [Internet]. 2002 [citado 5 Sept 2017];43(1):91-96. Disponible en: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>
13. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Resp Res*. 2001;2:164.
14. Felmler TA, Liu Q, Whelen AC, Williams D, Sommer SS, Persing DH. Genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance:

- comparison of single-strand conformation polymorphism and dideoxy fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 1995;33(6):1617-23.
15. García de Viedma D, del Sol Díaz Infantes M, Lasala F, Chaves F, Alcalá L, Bouza E. New Real-Time PCR Able To Detect in a Single Tube Multiple Rifampin Resistance Mutations and High-Level Isoniazid Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):988-95.
 16. McClure WR, Cech CL. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J Biol Chem.* 1978;253(24):8949-56.
 17. Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol.* 2002;43(3):717-31.
 18. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell.* 2001;104(6):901-12.
 19. Gamboa F, Cardona PJ, Manterola JM, Lonca J, Matas L, Padilla E, et al. Evaluation of a commercial probe assay for detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* directly from respiratory and nonrespiratory clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998;17(3):189-92.
 20. Kocagoz T, Saribas Z, Alp A. Rapid Determination of Rifampin Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):6015-9.

21. Ohno H, Koga H, Kohno S, Tashiro T, Hara K. Relationship between rifampin MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(4):1053-6.
22. Björkman J, Hughes D, Andersson DI. Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(7):3949-53.
23. Reynolds MG. Compensatory evolution in rifampin-resistant *Escherichia coli*. *Genetics.* 2000;156(4):1471-81.
24. Björkholm B, Sjölund M, Falk PG, Berg OG, Engstrand L, Andersson DI. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(25):14607-12.
25. Nagaev I, Björkman J, Andersson DI, Hughes D. Biological cost and compensatory evolution in fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 2001;40(2):433-9.
26. Bergval IL, Klatser PR, Schuitema ARJ, Oskam L, Anthony RM. Specific mutations in the *Mycobacterium tuberculosis rpoB* gene are associated with increased *dnaE2* expression. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;275(2):338-43.
27. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Ignatyeva O, Kontsevaya I, Harris SR, et al. Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. *Genome Res.* 2012;22(4):735-45.
28. Zaunbrecher MA, Sikes RD, Metchock B, Shinnick TM, Posey JE. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside

- acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(47):20004-9.
29. Bisson GP, Mehaffy C, Broeckling C, Prenni J, Rifat D, Lun DS, et al. Upregulation of the Phthiocerol Dimycocerosate Biosynthetic Pathway by Rifampin-Resistant, *rpoB* Mutant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 2012;194(23):6441-52.
 30. du Preez I, Loots DT. Altered fatty acid metabolism due to rifampicin-resistance conferring mutations in the *rpoB* Gene of *Mycobacterium tuberculosis*: mapping the potential of pharmaco-metabolomics for global health and personalized medicine. *OMICS*. 2012;16(11):596-603.
 31. Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Maher M, van Soolingen D, Barry T. Novel Multiplex Real-Time PCR Diagnostic Assay for Identification and Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, and *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *J Clin Microbiol*. 2011;49(2):651-7.
 32. Li H, Chen J, Zhou M, Geng X, Yu J, Wang W, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and pyrazinamide susceptibility related to *pncA* mutations in sputum specimens through an integrated gene-to-protein function approach. *J Clin Microbiol*. 2014;52(1):260-7.
 33. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993;341(8846):647-50.

34. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*. 2008;3(6):1101.
36. Mawuenyega KG, Forst CV, Dobos KM, Belisle JT, Chen J, Bradbury EM, et al. Mycobacterium tuberculosis functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Mol Biol Cell*. 2005;16(1):396-404.
37. Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of Mycobacterium tuberculosis. *FEMS Microbiol Rev*. 2000;24(4):449-67.
38. Parker SK, Barkley RM, Rino JG, Vasil ML. Mycobacterium tuberculosis Rv3802c Encodes a Phospholipase/Thioesterase and Is Inhibited by the Antimycobacterial Agent Tetrahydrolipstatin. *PLOS ONE*. 2009;4(1):e4281.
39. Seeliger JC, Holsclaw CM, Schelle MW, Botyanszki Z, Gilmore SA, Tully SE, et al. Elucidation and chemical modulation of sulfolipid-1 biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem*. 2012;287(11):7990-8000.
40. Målen H, Berven FS, Fladmark KE, Wiker HG. Comprehensive analysis of exported proteins from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Proteomics*. 2007;7(10):1702-18.

41. Mazandu GK, Mulder NJ. Function prediction and analysis of mycobacterium tuberculosis hypothetical proteins. *Int J Mol Sci.* 2012;13(6):7283-302.
42. Griffin JE, Gawronski JD, Dejesus MA, Ioerger TR, Akerley BJ, Sasseti CM. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog.* 2011;7(9):e1002251.
43. Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, Enciso JA, Wong MZ, Hannan M, et al. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights from genomic deletions in 100 strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(14):4865-70.
44. Hatzios SK, Iavarone AT, Bertozzi CR. Rv2131c from *Mycobacterium tuberculosis* is a CysQ 3'-phosphoadenosine-5'-phosphatase. *Biochemistry.* 2008;47(21):5823-31.
45. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.

XII. ANEXOS

Anexo 1

Tabla 3. Características de cada gen escogido para el análisis y de la proteína que codifica.

Locus	Símbolo	Nombre	Función	Tamaño gen (bp)	Tamaño proteína (aa)
Rv1175c	fadH	NADPH dependent 2,4-dienoyl-CoA reductase fadH	Metabolismo de lípidos	2025	674
Rv3041c	Rv3041c	ABC transporter ATP-binding protein	Pared celular y procesos celulares	864	287
Rv3822	Rv3822	conserved hypothetical protein	Función desconocida	1215	404
Rv2455c	Rv2455c	oxidoreductase alpha subunit	Metabolismo intermediario y respiración	1962	653
Rv0791c	Rv0791c	conserved hypothetical protein	Función desconocida	1044	347
Rv2131c	cysQ	monophosphatase cysQ	Metabolismo intermediario y respiración	804	267
Rv3661	Rv3661	conserved hypothetical protein	Virulencia, detoxificación y adaptación	864	287
Rv2568c	Rv2568c	conserved hypothetical protein	Metabolismo intermediario	1026	341
Rv1674c	Rv1674c	transcriptional regulator	Proteína regulatoria	657	218
Rv3395c	Rv3395c	conserved hypothetical protein	Función desconocida	615	204
Rv2290	lppO	lipoprotein lppO	Pared celular y procesos celulares	516	171

Anexo 2

Tabla 4. *Primers forward y reverse de cada uno de los genes seleccionados para el estudio.*

Gen	Primers Forward	Primers Reverse	Amplificación (bp)
Rv1175c	5'CGAAATCATGGGCAGCGAAG 3'	5'CTCTGGCCCTTCTGCAACGTA 3'	204
Rv3041c	5'GACCTGCTGATCGACTTCCG 3'	5'GAGACGACAAGATCGCGGAC 3'	305
Rv3822	5'TGACGGACCAATCTTCGTGG 3'	5'CGCATTGAGGTCAGCGAGTA 3'	301
Rv2455c	5'ATCTGGGCTATCTCAACCCG 3'	5'AAATCTGGCGACCAACGTCTT 3'	253
Rv0791c	5'GTTGGCTGCCGACGGTTAATG 3'	5'GTAGGAATTGCACAGCACGC 3'	316
Rv2131c	5'ATCTGACGGACGACCTGACT 3'	5'TGCCATCCAACGGGTCAATAA 3'	264
Rv3661	5'GTGCCGGTCGATAGTCAACGA 3'	5'TTCGCCGTAGCAGTAGAACG 3'	243
Rv2568c	5'GGCGGACTTTGCAAGTCTTG 3'	5'GATACGGCTCGTCCATCTCG 3'	304
Rv1674c	5'TGGAGCTGTTGGATCTGCTG 3'	5'GATCGGTTCCAGGCTGTCTC 3'	281
Rv3395c	5'CGAATCACTACGACGGCAGA 3'	5'AGCACCAACAGATCCATGC 3'	365
Rv2290	5'TCCTTTTGGATCCCGCTTGCT 3'	5'CGCCAATCCTTGAAACCTGC 3'	317

Anexo 3

Carta de autorización de uso de cepas clínicas

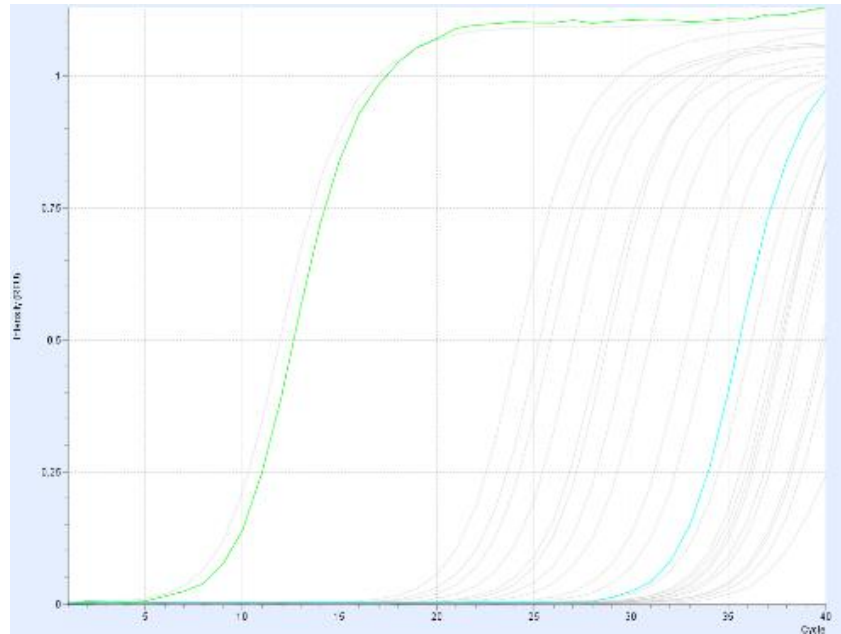
Yo, Patricia Sheen Cortavarria, Coordinadora del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular, autorizo el uso de tres cepas clínicas para cultivo, extracción de ARNm, transcripción reversa y análisis mediante qPCR para el desarrollo de la tesis de Licenciatura “Análisis de la expresión de genes con mutaciones compensatorias a mutaciones en *rpoB* en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a rifampicina” desarrollado por la Srta. Angie Katiushka Toledo Cornejo.

Lima, 15 de octubre del 2013



Patricia Sheen Cortavarria

Anexo 4



Gen 16S

Línea verde

Línea azul

Ct con transcriptasa reversa Ct sin transcriptasa reversa

9.53

29.67

Figura 5. Resultado de qPCR de la amplificación del gen housekeeping 16S correspondiente a la cepa resistente a RIF 2. Valor de Ct de la muestra con transcriptasa reversa es 9.53, valor de Ct de la muestra sin transcriptasa reversa es 20 veces mayor.

Anexo 5

Tabla 5. Resultados de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de tres repeticiones para cada gen y cada cepa del estudio.

		Valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$											
		Rv1175c	Rv3041c	Rv3822	Rv2455c	Rv0791c	Rv2131c	Rv3661	Rv2568c	Rv1674c	Rv3395c	Rv2290	
Repetición 1	Wild type (H37Rv)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Sensible a RIF	0.03	0.22	0.13	0.05	0.07	0.48	41.93	2210.26	484.38	1552.09	515.56	
	Resistente a RIF 1	0.04	0.06	0.08	0.06	0.03	2.64	0.69	891.44	2.81	126.24	99.04	
	Resistente a RIF 2	0.08	0.06	0.00	0.03	0.00	3.56	2.00	313.00	3.07	34.06	3.29	
Repetición 2	Wild type (H37Rv)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Sensible a RIF	0.30	0.47	0.24	0.16	0.22	0.15	5.86	7643.41	519.15	310.83	290.02	
	Resistente a RIF 1	1.42	0.45	0.21	0.51	0.46	0.68	1.75	0.41	0.38	0.46	27.28	
	Resistente a RIF 2	0.52	0.17	0.00	1.22	0.10	2.03	7.01	630.35	35.02	159.79	10.78	
Repetición 3	Wild type (H37Rv)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Sensible a RIF	0.27	1.21	0.72	0.15	0.29	0.02	0.05	1176.27	0.18	88.65	76.11	
	Resistente a RIF 1	0.09	0.24	0.02	0.02	0.01	0.01	0.04	5556.65	83.29	1002.93	7.26	
	Resistente a RIF 2	0.94	0.23	0.06	0.12	0.11	0.28	0.18	56.49	25.46	13.36	1.06	

Anexo 6

Tabla 6. Promedios y desviaciones estándar de las tres repeticiones de cada gen en cada cepa del estudio.

	Rv1175c	Rv3041c	Ct Rv3822	Rv2455c	Rv0791c	Rv2131c
Wild type (H37Rv)	1	1	1	1	1	1
Sensible a RIF	0.20±0.15	0.63±0.52	0.36±0.31	0.12±0.06	0.20±0.11	0.22±0.24
Resistente a RIF 1	0.52±0.78	0.25±0.20	0.11±0.10	0.20±0.27	0.17±0.26	1.11±1.36
Resistente a RIF 2	0.52±0.43	0.15±0.09	0.02±0.03	0.46±0.67	0.07±0.06	1.95±1.64

	Rv3661	Rv2568c	Rv1674c	Rv3395c	Rv2290
Wild type (H37Rv)	1	1	1	1	1
Sensible a RIF	15.94±22.69	36.76.64±3474	334.57±290.11	650.52±788.65	293.90±219.75
Resistente a RIF 1	0.83±0.86	2149.50±2984.12	28.82±47.18	376.54±546.10	44.53±48.26
Resistente a RIF 2	3.07±3.54	333.28±287.46	21.18±16.40	69.07±79.24	5.05±5.09

Anexo 7

Preparación de agar 7H10 + OADC 5%

1. Diluir 19 gramos de polvo 7H10 en 900 mL de agua purificada que contenga 5 mL de glicerol.
2. Mezclar bien hasta disolver completamente el polvo.
3. Autoclavar.
4. Dejar enfriar el medio hasta los 50-55°C.
5. Agregar 50 mL de OADC y mezclar bien.
6. Colocar el agar en las placas en una cabina esterilizada.

Preparación de buffer TBE 10X (1 litro)

1. Agregar 108 gramos de Tris base, 55 gramos de ácido bórico y 7.5 gramos de EDTA en 800 mL de agua desionizada.
2. Mezclar hasta disolver casi por completo.
3. Enrasar con agua desionizada hasta 1 litro y completar la dilución.

Preparación de buffer TBE 1X (1 litro)

1. Agregar 100 mL de buffer TBE 10X en 900 mL de agua desionizada.
2. Mezclar bien.