



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

EFFECTO DE EFLUJO DEL ÁCIDO PIRAZINOICO POR MEDIO DEL
SILENCIAMIENTO DE GENES HOMÓLOGOS POR CRISPRI EN BOMBAS DE
EFLUJO DE *Mycobacterium tuberculosis* EN EL MODELO DE *Mycobacterium smegmatis*

EFFLUX EFFECT OF PYRAZINOIC Acid THROUGH HOMOLOGOUS GENE
SILENCING BY CRISPRI IN EFFLUX PUMPS OF *Mycobacterium tuberculosis* USING
THE *Mycobacterium smegmatis* MODEL

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA

AUTOR

KEVIN ROGGER OBANDO BALLARDO

ASESOR

JUAN CARLOS AGAPITO PANTA

CO-ASESOR

PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA

LIMA - PERÚ

2025

JURADO

Presidente: STEEV ORLANDO LOYOLA SOSA

Vocal: ROCIO MARLENE ALIAGA NAVARRO

Secretario: DIEGO BERNHARD CUICAPUZA ARTEAGA

Fecha de sustentación: 8 de julio del 2025

ASESORES DE TESIS

ASESOR

DR. JUAN CARLOS AGAPITO PANTA

Departamento Académico de Tecnología Médica

ORCID: 0000-0001-9134-7322

CO - ASESOR

DRA. PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA

Departamento Académico de Ciencias

ORCID: 0000-0002-7118-9301

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi profundo agradecimiento a mi madre, Milagros Ballardo León, por su apoyo constante e incondicional a lo largo de este proceso. Asimismo, agradezco a mi hermano, Xander Obando Ballardo; a mi tía, Fátima Ballardo León; y a mi abuelita, Paulina León, quienes han sido un pilar fundamental en mi vida y han contribuido significativamente a mi formación personal.

De igual manera, agradezco a los doctores Mirko Zimic y Patricia Sheen por brindarme la oportunidad de integrarme a su laboratorio, así como por el acompañamiento y las facilidades otorgadas durante el desarrollo del presente trabajo. De forma especial, expreso mi gratitud a mis asesores Dr. Juan Agapito y la Dra. Sheen, cuya orientación, y recomendaciones permitieron la correcta ejecución y culminación de este proyecto de investigación.

Finalmente, agradezco a una ser muy especial, Jimena Ruez durante este proceso, y a mis amigos: César Evangelista, Luis Canales, Alexia Azcárate, Ángela Ríos, Stefany Quiñones, Candy León, Alonso Flores, Brigitte Rivera, Valeria Velásquez y Sebastián Rodríguez, por su compañía, apoyo y aliento durante esta etapa.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

El presente estudio fue financiado por la entidad de PROCIENCIA N° contrato PE501090065-2024 y the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB, Italy), Contract NCRP/PER22-02

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El egresado:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	OBANDO BALLARDO KEVIN ROGGER

Pertencientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**, autor del trabajo titulado: **EFFECTO DE EFLUJO DEL ÁCIDO PIRAZINOICO POR MEDIO DEL SILENCIAMIENTO DE GENES HOMÓLOGOS POR CRISPR EN BOMBAS DE EFLUJO DE Mycobacterium tuberculosis EN EL MODELO DE Mycobacterium smegmatis** el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	AGAPITO PANTA JUAN CARLOS	MEDICINA	ASESOR
2.	SHEEN CORTAVARRIA PATRICIA	MEDICINA	CO-ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **15 %**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **trn:oid:::1:3483102494**; fecha de entrega: **16-02-2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 16 de febrero del 2026.**

Firma del asesor
N° DNI: 17520490
ORCID: 0000-0002-7118-9301

Firma del Co-asesor
N° DNI: 09541127
ORCID: 0000-0002-7118-9301



TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	5
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
IV. RESULTADOS.....	15
V. DISCUSIÓN.....	18
VI. CONCLUSIONES.....	23
VII. RECOMENDACIONES.....	24
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	25
IX. TABLAS Y FIGURAS.....	30
X. ANEXOS.....	40

RESUMEN

La pirazinamida (PZA) es un fármaco esencial en el tratamiento de la tuberculosis por su capacidad de reducir la duración terapéutica. Su metabolito activo, el ácido pirazinoico (POA), puede ser expulsado por bombas de eflujo bacterianas, lo que representa un posible mecanismo alternativo de resistencia en cepas sin mutaciones en *pncA*. **En este estudio**, se evaluó el papel funcional de genes homólogos a bombas de eflujo de *Mycobacterium tuberculosis* en *Mycobacterium smegmatis* mediante silenciamiento génico por CRISPRi. **Se diseñaron** y validaron ARNg dirigidos a los genes *MSMEG_0232*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_5046* y *MSMEG_6331*, utilizando criterios de eficiencia teórica de represión y modelos predictivos de silenciamiento. Además, se midió la expresión relativa de ARNm mediante qPCR, y se evaluó la velocidad de eflujo de POA utilizando el test de Wayne cuantitativo normalizado por proteínas (Bradford). Los datos obtenidos fueron analizados mediante regresión lineal múltiple en R Studio. **Los resultados** mostraron que *MSMEG_0232* actúa directamente en el eflujo de POA, mientras que *MSMEG_5046* y *MSMEG_6331* presentaron respuestas variables posiblemente asociadas a rutas compensatorias. En cambio, *MSMEG_0241* no presentó un impacto fenotípico significativo. Este hallazgo demuestra que el silenciamiento dirigido puede utilizarse para caracterizar bombas de eflujo relevantes en la resistencia a PZA, y propone nuevos blancos terapéuticos preliminares que podrían ser explorados en futuros estudios en *M. tuberculosis*.

Palabras clave: *Mycobacterium smegmatis*, pirazinamida, ácido pirazinoico, CRISPRi, bombas de eflujo, resistencia.

ABSTRACT

Pyrazinamide (PZA) is an essential drug in tuberculosis treatment due to its ability to shorten the duration of therapy. Its active metabolite, pyrazinoic acid (POA), can be expelled by bacterial efflux pumps, representing a potential alternative mechanism of resistance in strains lacking mutations in *pncA*. In this study, the functional role of efflux pump homologs from *Mycobacterium tuberculosis* was evaluated in *Mycobacterium smegmatis* through gene silencing using CRISPR interference (CRISPRi). Single-guide RNAs (sgRNAs) were designed and validated for the genes *MSMEG_0232*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_5046*, and *MSMEG_6331*, using theoretical repression efficiency criteria and predictive silencing models. Additionally, relative mRNA expression was quantified by qPCR, and POA efflux rate was assessed using the quantitative Wayne assay normalized by protein content (Bradford). Data were analyzed using multiple linear regression in R Studio. Results showed that *MSMEG_0232* plays a direct role in POA efflux, while *MSMEG_5046* and *MSMEG_6331* exhibited variable responses, possibly linked to compensatory pathways. In contrast, *MSMEG_0241* showed no significant phenotypic impact. These findings demonstrate that targeted gene silencing can be employed to functionally characterize efflux pumps involved in PZA resistance and identify novel preliminary therapeutic targets for future studies in *M. tuberculosis*.

Keywords: *Mycobacterium smegmatis*, pyrazinamide, pyrazinoic acid, CRISPRi, efflux pumps, resistance.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, con aproximadamente 9 millones de casos nuevos y 1.3 millones de muertes registradas en 2020, superando incluso la mortalidad por VIH (1). En Perú, representa un problema crítico de salud pública, con 17, 267 casos reportados ese mismo año y una tasa de mortalidad de 52.9 por cada 100,000 habitantes, concentrándose el 64% de los casos en Lima y Callao (2) . La TB pulmonar, causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), se transmite por gotículas que contienen bacilos al hablar, toser o estornudar, afectando principalmente los pulmones (3). Su tratamiento estándar incluye un esquema inicial de 2 meses con isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida (PZA), seguido de 4 meses con rifampicina e isoniacida (4,5) . No obstante, la resistencia a los medicamentos, incluida la multidrogo-resistencia (MDR-TB) y la tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB), sigue siendo un desafío, con más de 132,222 casos de MDR-TB reportados globalmente en 2020 (6).

La PZA, una prodroga esencial en el tratamiento de la TB latente, es convertida en ácido pirazinoico (POA) por la enzima pirazinamidasa, codificada por el gen *pncA*. Este compuesto acidifica el ambiente intracelular, inactivando enzimas esenciales para la supervivencia del bacilo (7,8). Las mutaciones en *pncA* son la principal causa de resistencia clínica a PZA (7). También se ha asociado la resistencia a mecanismos de eflujo que expulsan el POA de la célula, aunque los transportadores implicados no están completamente caracterizados (9,10)

Las bombas de eflujo bacterianas desempeñan un papel fundamental en la resistencia antimicrobiana al facilitar la expulsión de compuestos tóxicos fuera de la célula. Entre las principales familias de bombas de eflujo se encuentran *mmpL*, los transportadores de la superfamilia MFS (Major Facilitator Superfamily), los sistemas ABC-binding cassette (ABC)

y los transportadores ABC. La familia *mmpL* es esencial en *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), ya que participa en la exportación de lípidos de la membrana y en la formación de una envoltura celular impermeable, crucial para la resistencia intrínseca a múltiples antimicrobianos. Los transportadores MFS son altamente diversos y representan la familia más grande de bombas de eflujo. Estos transportadores operan mediante gradientes electroquímicos, desempeñando un rol clave en la expulsión de fármacos y metabolitos tóxicos. Por otro lado, los sistemas ABC, que utilizan energía derivada de la hidrólisis de ATP, han sido ampliamente asociados con la resistencia a múltiples fármacos y la capacidad de MTB para adaptarse a entornos hostiles. Estas bombas no sólo están relacionadas con la expulsión del ácido pirazinoico (POA), el metabolito activo de la pirazinamida (PZA), sino que también representan un desafío significativo en el tratamiento de la tuberculosis. Sin embargo, su relevancia funcional en la resistencia a la PZA aún no está completamente caracterizada, lo que las convierte en blancos prometedores para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a la tuberculosis resistente (11-14).

Para explorar estos mecanismos, *Mycobacterium smegmatis* se utiliza como modelo experimental debido a sus similitudes genéticas y fisiológicas con MTB. Aunque *M. smegmatis* es naturalmente resistente a PZA por un eflujo rápido de POA, resulta útil para estudiar la resistencia antimicrobiana y validar nuevos blancos terapéuticos. (15)

En este contexto, la tecnología CRISPR de interferencia (CRISPRi) se empleó como herramienta para investigar la función de genes asociados a la resistencia a PZA. CRISPRi utiliza un complejo dCas9-sgRNA para reprimir la expresión génica sin cortar el ADN, lo que permite un análisis funcional preciso de los genes implicados. En este estudio, se optimizó CRISPRi mediante el plásmido pLJR962 para silenciar genes específicos en *M. smegmatis*,

contribuyendo al entendimiento de los mecanismos de resistencia y a la identificación de nuevos blancos terapéuticos (16,17).

La PZA es un fármaco fundamental en el tratamiento contra TB, ya que acorta el tratamiento a seis meses y reduce la probabilidad de reactivación de la bacteria. Además, presenta eficacia contra cepas de MTB multidrogo resistente (MDR) (18). Aunque la PZA es un fármaco crucial en el tratamiento de la TB, se ha evidenciado que una gran proporción de pacientes infectados con MTB tiene resistencia a ella, con una incidencia cercana al 85% de cepas MDR. Esta resistencia es conferida por las mutaciones presentes en el gen *pncA*, responsable de la producción de la enzima PZAsa, necesaria para el efecto terapéutico de la PZA (7) . Sin embargo, existen casos en donde no se han evidenciado mutaciones en el gen *pncA* y aun así se presenta resistencia a la PZA. En estos casos, se han propuesto otros mecanismos que podrían explicar la resistencia al fármaco, como mutaciones en los genes que son el objetivo de PZA y genes que codifican a bombas de eflujo y el papel que pueden tener las bombas de eflujo en el mecanismo de acción de PZA (19,20). Uno de los objetivos principales que se busca para el tratamiento de TB es que sea mucho más rápido y que a su vez no genere resistencia. Sin embargo, la evolución a la resistencia a los antibióticos actuales es un desafío para el tratamiento actual. Por lo tanto, es evidente que debemos expandir en nuevas áreas de objetivo para el tratamiento contra la TB.

CRISPRi (Clustered repeats interspaced palindromic repeats-interference) es una técnica que permite el silenciamiento específico de genes mediante un complejo formado por un ARN guía (sgRNA) y la enzima Cas9 mutada (dCas9), la cual pierde su capacidad endonucleasa para optimizar la represión de uno o varios genes simultáneamente en *M. smegmatis* utilizando el vector pLJR962 (16,17). Estudios previos realizados en *M. smegmatis* han demostrado que CRISPRi es efectiva en el silenciamiento de genes relacionados con bombas de eflujo,

involucradas en el transporte y resistencia a fármacos. Específicamente, se ha observado una reducción significativa en la velocidad de eflujo del POA al silenciar el gen MSMEG_0250 con esta técnica (21) . Con base en estos antecedentes, el presente estudio busca evaluar la velocidad de eflujo de POA mediante la represión transcripcional de genes codificantes para bombas de eflujo implicadas en la resistencia a PZA.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto del silenciamiento de genes que codifican a bombas de eflujo sobre la velocidad de eflujo del ácido pirazinoico en *Mycobacterium smegmatis*, mediante la represión transcripcional por CRISPRi

2.2 Objetivos específicos

- Silenciar y determinar la velocidad de eflujo de POA del gen *MSMEG_5046*.
- Silenciar y determinar la velocidad de eflujo de POA del gen *MSMEG_0241* codificante para la bomba de eflujo.
- Silenciar y determinar la velocidad de eflujo de POA del gen *MSMEG_6331* codificante para la bomba de eflujo.
- Silenciar y determinar la velocidad de eflujo de POA del gen *MSMEG_0232* codificante para la bomba de eflujo.

2.3 Hipótesis

- El silenciamiento de uno de los genes codificantes para las bombas de eflujo por CRISPRi varía la velocidad de eflujo del POA en *M. smegmatis*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

- El estudio fue experimental y analítico. Es experimental debido a que se reprimirá la transcripción de los genes homólogos de MTB en *M. smegmatis* mediante la técnica de CRISPRi y analítico debido a que analizará si existe una relación entre los genes reprimidos, codificantes para las bombas de eflujo, con el eflujo de ácido pirazinoico (POA) en intervalos de tiempo.

3.2 Cepas y lugar de estudio

- Las cepas de *M. smegmatis* mc2 155, utilizadas en este estudio fueron conservadas en el banco de cepas del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de los laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.3 Criterios de inclusión

no aplica

3.4 Criterios de exclusión

no aplica

3.5 Muestra (cálculo muestral)

no aplica

3.6 Instrumentos de investigación

no aplica

3.7 Procedimientos y Técnicas

3.7.1 Identificación de genes de bombas de eflujo y análisis de homología entre *Mycobacterium tuberculosis* y *M. smegmatis*

La selección de genes candidatos relacionados con la resistencia a pirazinamida (PZA) se realizó mediante una estrategia combinada de revisión bibliográfica y análisis bioinformático. Se identificaron genes de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37Rv) asociados a mecanismos de resistencia, especialmente aquellos vinculados al transporte y expulsión del ácido pirazinoico (POA), metabolito activo de la PZA.

Las secuencias proteicas de los genes candidatos (Rv3756c, Rv0191c, Rv1250c y Rv0202c) fueron descargadas desde MycoBrowser y verificadas en la base de datos NCBI (ensamblaje de referencia H37Rv, RefSeq: GCF_000195955.2). Para encontrar ortólogos en *M. smegmatis*, se realizó un análisis BLASTp utilizando parámetros por defecto: matriz BLOSUM62, *e-value* 10, sin penalizaciones modificadas. Se consideraron válidos los alineamientos con ≥ 30 % de identidad, ≥ 50 % de cobertura y *e-value* $< 1 \times 10^{-5}$.

Los genes homólogos identificados fueron alineados mediante el programa EMBOSS Needle (web) para validar la similitud funcional, empleando penalizaciones estándar (gap open = 10, extension = 0.5). Solo se aceptaron como ortólogos los pares con una similitud superior al 40 %, acorde con literatura previa. Por ejemplo, *MSMEG_6331* mostró un 77.38 % de identidad con Rv3756c, con una cobertura del 82 % y un *e-value* de 9×10^{-96} . Los alineamientos globales confirmaron similitudes de 67.4 % a 80.6 %.

Este análisis *in silico* respaldó la conservación funcional de los genes seleccionados, permitiendo su uso como blancos para el diseño de ARN guía (ARNg) en el sistema CRISPRi, con el fin de evaluar experimentalmente su implicancia en el eflujo de POA y la resistencia a PZA. (tabla1)

3.7.2 Diseño de los ARN guía (ARNg) de los genes

Las secuencias de los genes a estudiar fueron obtenidas del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para el diseño de los ARN guías (ARNg), se siguieron dos enfoques: Protocolo de Rock et al. (CRISPRi gene silencing in mycobacteria): Se utilizó para el diseño de los ARNg para los genes MSMEG_0232 (ARNg_1), MSMEG_6331(ARNg_1), MSMEG_5046 , MSMEG_0241 asimismo para el control positivo MSMEG_0250. En primer lugar se identificó la cadena no molde de los genes a silenciar, y se buscó el reverso complementario de la secuencia PAM con mayor “fold repression” (Tabla 3). Luego se incluyó la selección de 20 - 25 nucleótidos que complementa con la cadena no molde, asimismo se añadieron los extremos de corte de restricción para la enzima BsmBI en el extremo 5', GGGA para el Forward y AAAC para el Reverse (22)

Software Pebble: El diseño de los ARNg para MSMEG_0232 (ARNg_2) y MSMEG_6331 (ARNg_2) fue realizado utilizando el programa Pebble (sgRNA tool for Rockefeller University). Este software permite seleccionar los mejores candidatos de ARNg según parámetros de “predicted strength” más cercano a 1(23). El diseño y las secuencias para ambos métodos de diseño de ARNg se encuentran en la tabla 4.

3.7.3 Clonación de ARNg en el plásmido pLJR962 y transformación en *E. coli*

El plásmido integrativo pLJR962 fue digerido con BsmBI (40 U) en una mezcla de reacción de 50 µL que contenía 2.5 µg de ADN, Buffer 3.1 y agua libre de nucleasas. La digestión se incubó a 55 °C por 12 h y fue inactivada a 80 °C por 20 min. La correcta digestión fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % con SYBR Safe. Posteriormente, la banda linealizada fue purificada utilizando el kit Zymoclean.

Para la hibridación, se mezclaron 2 µL de cada oligo (top y bottom, 100 µM) con 46 µL de buffer de annealing (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA), y se aplicó un

programa térmico de 95 °C por 2 min seguido de un descenso controlado a 25 °C a razón de 0.1 °C/s para permitir la formación de duplex.

La ligación se realizó en un volumen total de 5 µL que contenía 9 ng del vector digerido, 0.5 µL de oligos hibridados (dilución 1:10), 40 U de T4 DNA ligasa y 0.5 µL de su buffer correspondiente. La mezcla se incubó a 16 °C durante 20 h. Se incluyó un control de autoligado sin oligos para verificar la eficiencia del proceso.

Posteriormente, 5 µL del producto de ligación fueron transformados en células competentes de *E. coli* NovaBlue mediante choque térmico (0 °C por 10 min → 42 °C por 45 s → 0 °C por 2 min). La recuperación se realizó en medio LB sin antibióticos por 1 h a 37 °C y 200 rpm. Las células se sembraron en placas LB-agar suplementadas con kanamicina (40 µg/mL) y tetraciclina (12.5 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16–18 h.

Las colonias resistentes fueron seleccionadas y cultivadas para minipreparaciones plasmídicas (Zymo Miniprep Kit). La inserción correcta del ARNg fue verificada mediante digestión diagnóstica con BsmBI y secuenciación Sanger utilizando primers universales pLJR962_F/R. Solo se utilizaron clones confirmados con secuencia 100 % correcta para las siguientes etapas. (figura 1-3)

(Fig. 1 muestra el esquema de clonación; Fig. 2, la digestión/ligación; Fig. 3, secuencias confirmadas).

3.7.4 Transformación en *M. smegmatis* y controles utilizados en los experimentos de silenciamiento

Para la transformación en *M. smegmatis mc²155*, se utilizaron entre 0.5–5 µg del plásmido pLJR962-ARNg en condiciones de electroporación (2.5 kV, 25 µF, 1000 Ω). Las células fueron

recuperadas en 7H9 y seleccionadas en agar 7H10 con kanamicina (20 µg/mL), OADC y 0.2 % de glicerol. (figura 3)

Una única clona transformada fue seleccionada por cada gen para evitar variabilidad genética y asegurar consistencia en los ensayos. Estas clonas fueron criopreservadas y empleadas en todas las etapas experimentales posteriores. Se implementaron dos controles principales para validar la eficiencia y especificidad del sistema CRISPRi:

Control positivo (MSMEG_0250): Este gen fue elegido por su conocida susceptibilidad al silenciamiento en *M. smegmatis*. Su ARNg fue diseñado siguiendo el mismo protocolo de Rock et al., clonado en pLJR962 y transformado en *M. smegmatis* como los genes experimentales. Su función fue confirmar que el sistema CRISPRi respondía adecuadamente a la inducción con ATC.

Control negativo (pLJR962 sin ARNg): Consiste en la cepa *M. smegmatis* mc²155 transformada con el plásmido vacío. Se utilizó para descartar efectos inespecíficos ocasionados por la electroporación o la presencia del plásmido per se, en ausencia de un ARNg específico.

3.7.5 Inducción del silenciamiento y selección de clonas

Cada clona resistente a kanamicina fue cultivada en 7H9 suplementado con OADC, glicerol, Tween 80 y antibióticos correspondientes a 37 °C y 300 rpm. Los cultivos se llevaron a fase logarítmica (OD 0.5–0.8), se diluyeron a OD 0.1–0.2 y se indujo el silenciamiento adicionando anhidrotetraciclina (ATC) a concentración final de 100 ng/mL (disuelta en etanol). La inducción se realizó durante 18–24 h a 37 °C y 300 rpm, hasta alcanzar OD > 1.

3.7.6 Extracción de ARN

Las bacterias inducidas y no inducidas fueron centrifugadas a 3000 g durante 20 minutos a 4 °C en tubos libres de RNasa. El sedimento se lavó con buffer TE (pH 8) y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se resuspendió en 1 ml de TRI reagent junto con beads de zirconio de 0.1 mm, y la lisis celular se llevó a cabo utilizando el equipo Fast Prep MP Biomedicals a 6.5 m/s durante 30 segundos, repitiendo el proceso dos veces con intervalos en hielo.

El lisado fue centrifugado a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo donde se añadieron 200 µl de cloroformo. La mezcla se agitó, se incubó en hielo durante 5 minutos, y se centrifugó nuevamente para separar las fases. La fase acuosa obtenida se mezcló con etanol frío al 100 % y se transfirió a columnas de sílica para su purificación. Después se realizaron lavados sucesivos con solución de prelavado y tampón de ARN. Finalmente, el ARN fue eluido con 20 µl de agua libre de RNasa (DEPC) y cuantificado utilizando un espectrofotómetro Nanodrop.

3.7.7 Retrotranscripción

El ARN extraído se trató con Ambion DNase I (Thermo Fisher Scientific) para eliminar ADN residual: 5 µg de ARN, 1 µL Turbo DNase, 2 µL de buffer, agua DEPC (20 µL total), incubación 37 °C 15 min e inactivación 75 °C 5 min.

El ARN tratado se retrotranscribió a ADNc con SuperScript IV según protocolo del fabricante (Anexo 4)

3.7.8 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa qPCR

El ADNc se utilizó para cuantificar niveles relativos de ARNm por qPCR con SYBR Green. Los primers se diseñaron con Primer-BLAST (NCBI) siguiendo los criterios

descritos (24,25). La reacción incluyó 3 μM de cada primer, 2.5 μL de SYBR Green, 5 μL de agua PCR y 0.5 μL de ADNc, en un volumen final de 10 μL . Condiciones: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 40 ciclos de 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; curva de melting. La cuantificación relativa se realizó con el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak), usando como gen housekeeping MSMEG_2758. Las reacciones se realizaron por tres réplicas biológicas. (Figura 4)

3.7.9 Velocidad de eflujo de POA

Las cepas con genes silenciados fueron cultivadas hasta la fase exponencial, diluidas a una densidad óptica (OD) de 0.1-0.2 en medio 7H9 e inducidas con anhidrotetraciclina (ATC, 100 ng/mL) o sin ATC (control) a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 18-20 horas. Luego, los cultivos fueron centrifugados a 12,500 rpm durante 20 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$, y el sedimento fue resuspendido en buffer de citrato (10 mM, pH 7) para ajustar la OD_{600nm}. Se incubaron muestras de 900 μl de bacterias con 100 μl de PZA (10 mM) a 37 $^{\circ}\text{C}$ en intervalos de 5 a 60 minutos. Tras detener la reacción mediante centrifugación (14,800 rpm, 2 minutos), se reservaron 500 μl del sobrenadante para la reacción de Wayne.

Adicionalmente, se preparó un tubo control con 900 μl del cultivo sin PZA, que fue centrifugado, mezclado con 50 μl de PZA (10 mM, pH 7), hervido a 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos y centrifugado a 10,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido, correspondiente a la fracción intracelular, fue analizado mediante el método de Bradford.

A. Reacción de Wayne

El POA expulsado se cuantificó mediante el ensayo de Wayne: formación de coloración rojiza con $\text{Fe}(\text{SO}_4)$ y lectura a 450 nm (26). Se añadió sulfato de amonio ferroso al 20% a 500 μl de la fracción extracelular, se agitó en vórtex y se incubó a

temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifugó (10,000 rpm, 5 min) y se transfirieron 100 μ L a placa de 96 pozos para lectura en Spectra Max 190 a 450 nm. La cuantificación se realizó con curva estándar de POA (0.4–16 mM) en buffer citrato 10 mM pH 7 (26,27).

B. Bradford

La técnica de Bradford permite cuantificar proteínas por absorbancia en la región visible (28). El objetivo fue normalizar POA en función de biomasa, expresando los resultados cómo mM POA/mg proteína. Para ello, se determinó concentración proteica mediante Bradford para cada punto temporal del experimento (0–60 min cada 5 min).

En placa ELISA de 96 pozos se añadieron 20 μ L de muestra y 200 μ L de reactivo Bradford (1:4 en agua MilliQ). La absorbancia se leyó a 595 nm. Se construyó curva estándar con BSA (5, 10, 20, 50, 80 y 100 μ g/mL). (Figura 5)

3.8 Aspectos éticos

- Este trabajo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CIE-UPCH) y se registró en el sistema SIDISI de la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología antes de su ejecución. Se utilizaron únicamente cepas bacterianas de *Mycobacterium smegmatis* y *E. coli* Nova Blue previamente almacenadas en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular, las cuales no son patógenas y requieren únicamente un laboratorio de bioseguridad nivel 2 para su manipulación. Se garantizó la seguridad del personal

mediante el uso de equipo de protección personal y cabinas de bioseguridad. Además, no se realizaron toma de muestras en sujetos humanos.

3.9 Plan de análisis

- El eflujo de POA fue cuantificado como mM POA/mg proteína en *M. smegmatis* inducido (+ATC) y no inducido (-ATC) con CRISPRi, evaluado de 0 a 60 min en intervalos de 5 min. Ambas variables fueron analizadas mediante regresión lineal múltiple con 95% de confianza, considerando significativo $p \leq 0.05$. Los análisis se realizaron en RStudio Version 2025.09.2+418 (2025.09.2+418).

3.10 Limitaciones

- El uso de CRISPRi presenta la incapacidad de silenciar (knock down) completamente la expresión de un gen, por lo que la expresión parcial de la proteína podría ejecutar su función.
- El silenciamiento del gen depende estrictamente de la secuencia PAM que es reconocida por dCas9, por lo que es posible que existan genes en donde la secuencia PAM tenga un fold repression bajo y no produzca un cambio fenotípico significativo a través del silenciamiento.
- La tecnología CRISPRi restringe la supresión de la expresión génica mediante la inducción de un "knock down" con ATC en aproximadamente 24 horas.

IV. RESULTADOS

4.1 Identificación y validación de genes homólogos resistentes a PZA

Se identificaron cuatro genes en *Mycobacterium tuberculosis* asociados a resistencia a pirazinamida (*Rv3756c*, *Rv0191c*, *Rv1250c* y *Rv0202c*), y se determinaron sus ortólogos en *M. smegmatis*: *MSMEG_6331*, *MSMEG_0232*, *MSMEG_5046* y *MSMEG_0241*, respectivamente.

4.2 Evaluación del porcentaje de similitud de los genes homólogos con EMBOSS Needle

Las comparaciones a nivel de secuencia de aminoácidos mostraron porcentajes de similitud entre 67.4% a 80.6% de los genes homólogos de *M. tuberculosis* (*Rv3756c*, *Rv0191*, *Rv1250* y *Rv0202c*) y sus contrapartes en *M. smegmatis* (*MSMEG_6331*, *MSMEG_0232*, *MSMEG_5046* y *MSMEG_0241*). En particular, el alineamiento global entre *MSMEG_6331* y *Rv3756c* mostró un 73.9 % de similitud y 10.8 % de diferencias por inserciones y deleciones (*gaps*), como se detalla en la Figura 6-7. Los resultados completos de las comparaciones para todos los genes se resumen en la Tabla 2.

4.3 Verificación del ARNg clonado en el plásmido pLJR962 en E. coli NovaBlue

La secuenciación por Sanger confirmó la inserción correcta de los ARN guía (ARNg) en el plásmido pLJR962, para todas las construcciones dirigidas a los genes *MSMEG_0232* (ARNg_1 y ARNg_2), *MSMEG_6331* (ARNg_1 y ARNg_2), *MSMEG_0241*, *MSMEG_5046* y al control positivo *MSMEG_0250*. (Figura 8,9)

4.4 Electroporación de los plásmidos clonados con los ARNg en M. smegmatis

Se obtuvieron colonias transformantes para cada constructo en *M. smegmatis*. El control negativo (Mc2 155 con pLJR962 sin ácido ribonucleico guía) se empleó para estimar la expresión basal y descartar efectos del vector. El control positivo dirigido a *MSMEG_0250* se utilizó para verificar la capacidad del sistema inducible de reducir la expresión del blanco tras

la inducción. Por tanto, el crecimiento observado en presencia de este antibiótico confirmó no solo la incorporación estable del plásmido, sino también la presencia del ARNg específico en cada caso. (figura 10)

4.5 Cuantificación de los niveles de ARN mensajero relativo para la evaluación de expresión de genes en *M. smegmatis*

En el control negativo mc²155::pLJR962, la expresión relativa se mantuvo cercana a 1 en ATC⁻ y ATC⁺, indicando ausencia de cambios atribuibles al vector. El control positivo *MSMEG_0250* mostró disminución marcada del ARNm en ATC⁺ (expresión relativa < 1), validando el sistema CRISPRi.

En los genes experimentales, *MSMEG_5046* y *MSMEG_0241* presentaron reducción de ARNm en ATC⁺ (expresión relativa < 1). En *MSMEG_0232* y *MSMEG_6331*, la respuesta dependió del ARNg: ARNg₂ produjo reducción de ARNm en ATC⁺ (expresión relativa < 1), mientras que ARNg₁ mostró ausencia de represión o incremento relativo (expresión relativa > 1) (Figura 11).

4.6 Niveles de fold repression en cepas *M. smegmatis*

Los niveles de fold repression fueron consistentes con los patrones de expresión relativa. En el control negativo mc²155::pLJR962 los valores se mantuvieron cercanos a 1. El control positivo *MSMEG_0250* presentó fold repression elevado en ATC⁺, indicando represión transcripcional. *MSMEG_5046* y *MSMEG_0241* mostraron fold repression > 1 bajo ATC⁺, consistente con reducción de ARNm.

Para *MSMEG_0232* y *MSMEG_6331*, el fold repression dependió del ARNg: ARNg₂ mostró fold repression > 1, mientras que ARNg₁ mostró valores cercanos a 1 o < 1, lo que evidencia que ARNg₂ fue más efectivo para inducir represión en estos genes (Figura 12).

4.7 Análisis estadístico de los genes homólogos bajo la condición del silenciamiento genético activo.

En el análisis estadístico descrito en el plan de análisis se aplicaron modelos de regresión lineal para evaluar el efecto de la interacción tiempo:condición (\pm ATC) sobre la producción/eflujo de POA normalizado (mM POA/mg proteína). Los modelos mostraron valores de R^2 ajustados entre 0.7377 y 0.9854. En los controles, *mc²155* y *mc²155::pLJR962* no mostraron diferencias significativas entre ATC⁺ y ATC⁻. En el control positivo *MSMEG_0250*, la interacción tiempo:condición fue significativa ($p < 0.001$), observándose una menor pendiente bajo ATC⁺ en comparación con ATC⁻. En los genes experimentales, *MSMEG_5046* presentó una interacción significativa ($p = 0.000212$) con un incremento de la pendiente bajo ATC⁺, mientras que *MSMEG_0241* no mostró significancia estadística en la interacción tiempo:condición ($p = 0.0598$). Para *MSMEG_0232*, tanto ARNg₁ como ARNg₂ presentaron interacción significativa ($p < 0.001$ y $p = 0.00423$), con una reducción de la pendiente bajo ATC⁺. En *MSMEG_6331*, solo ARNg₂ mostró interacción significativa ($p = 0.008804$) con una pendiente mayor bajo ATC⁺, mientras que ARNg₁ no mostró cambios significativos ($p = 0.982$). Estos resultados se resumen en la Figura 13 y Tabla 5.

V. DISCUSIÓN

Un punto de partida relevante es que el mecanismo de acción de la pirazinamida continúa en debate. Diversas líneas de evidencia han propuesto que el ácido pirazinoico puede alterar procesos de membrana y transporte, así como activar respuestas de estrés de la envoltura; en consecuencia, la cuantificación cinética de la expulsión del ácido pirazinoico constituye un indicador funcional útil para priorizar transportadores con contribución directa o estrechamente acoplada a la salida del metabolito. (7–10,14,29)

En esta tesis se evaluó el aporte funcional de genes candidatos de *Mycobacterium smegmatis* asociados al transporte y la expulsión del ácido pirazinoico, mediante reducción transcripcional dirigida con una plataforma de interferencia basada en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas. Este enfoque enlaza la identificación in silico de ortólogos de *Mycobacterium tuberculosis* con evidencia experimental de función, y permite evaluar contribuciones individuales dentro de una red potencialmente redundante de bombas de eflujo. (15) Así, los resultados se interpretan como evidencia funcional en el modelo (*M. smegmatis*) y no como equivalencia directa en *M. tuberculosis*, lo que requiere validación posterior en el patógeno.

De manera global, los hallazgos apoyan que la dinámica del ácido pirazinoico puede estar influenciada por más de un transportador. La redundancia funcional y la superposición de especificidad de sustrato son rasgos frecuentes en bombas de eflujo; por ello, la represión de un solo gen puede resultar en efectos fenotípicos variables, moderados o parcialmente compensados. (14)

Alineado a los objetivos del estudio, primero se confirmó la relación de ortología (similitud 67–81%) entre genes de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, luego se validó la construcción de ARNg y, finalmente, se evaluó el efecto del silenciamiento sobre la cinética de POA

normalizado (mM POA/mg proteína). Esta estructura permite discutir los hallazgos en dos niveles: (i) eficiencia de silenciamiento (ARNm/fold repression) y (ii) efecto funcional (cambio de pendiente en la cinética de POA).

El hallazgo central fue que el silenciamiento de MSMEG_0232 generó el patrón fenotípico más consistente sobre la dinámica del ácido pirazinoico bajo las condiciones ensayadas. En particular, para MSMEG_0232 *Mycobacterium tuberculosis* que sugieren que transportadores del eje de Rv0191 pueden modular respuestas a pirazinamida y ácido pirazinoico, y que la inhibición farmacológica de eflujo puede restaurar susceptibilidad en contextos con actividad elevada de expulsión. (14,20,21)

En MSMEG_5046 y MSMEG_6331, el efecto fenotípico fue más dependiente del diseño del ácido ribonucleico guía y, en general, más variable. En MSMEG_5046 y MSMEG_6331 (ARNg_2) se observó una pendiente mayor bajo ATC+, lo que sugiere que la reducción de un componente puede acompañarse de compensación funcional de la red de eflujo, ya sea por activación de rutas alternativas o por redistribución del flujo a otros transportadores. Esta redundancia y superposición de especificidad explican por qué la represión de un solo gen puede producir efectos intermedios o incluso cambios en dirección inesperada. (14) En contraste, MSMEG_6331 (ARNg_1) no mostró un cambio significativo en pendiente, coherente con un silenciamiento menos efectivo en términos de represión transcripcional, lo que refuerza la relación entre diseño de ARNg y sensibilidad del ensayo.

Para MSMEG_0241, aun cuando se evidenció represión transcripcional, el efecto sobre la expulsión del ácido pirazinoico fue limitado. Esto es consistente con el comportamiento descrito para miembros de transportadores de membrana asociados a la envoltura celular, que pueden contribuir de manera indirecta a fenotipos asociados a permeabilidad e integridad de pared, más que actuar como exportadores primarios del ácido pirazinoico. En este escenario,

cambios sutiles en cinética podrían reflejar efectos indirectos (envoltura/estrés de superficie) más que transporte directo de POA, lo que justifica complementar con otros desenlaces si se busca inferencia mecánica (p. ej., MIC a PZA, pH intracelular, etc.). (14,20)

En esa misma línea, los resultados sin efecto claro deben interpretarse en el contexto de la magnitud de represión lograda y de la vulnerabilidad funcional del gen. La interferencia basada en CRISPRi produce reducción parcial y no delección; por tanto, la actividad residual puede sostener la función, especialmente cuando existen transportadores de alta capacidad o cuando el gen presenta alta actividad basal. Además, la compensación por otros transportadores, la estabilidad proteica, la regulación postranscripcional y los efectos polares sobre genes cotranscritos pueden enmascarar un fenotipo. Por ello, es recomendable utilizar múltiples diseños de ácido ribonucleico guía por gen, reportar de manera sistemática la relación entre represión transcripcional y cambio fenotípico, y considerar análisis complementarios a nivel de proteína cuando exista desacople entre ácido ribonucleico mensajero y actividad. (16,24,30,31)

Los perfiles cinéticos también deben interpretarse a la luz de diferencias biológicas entre especies. *Mycobacterium smegmatis* presenta rasgos que favorecen una conversión y expulsión más rápida del ácido pirazinoico, incluyendo mayor permeabilidad de la envoltura y diferencias en la dotación y actividad de enzimas que convierten pirazinamida a ácido pirazinoico. Esto subraya que la extrapolación hacia *Mycobacterium tuberculosis* puede no ser lineal y requiere validación directa en ese organismo. (13,15,32)

Entre las limitaciones metodológicas, destacan el diseño del ácido ribonucleico guía y la elección del motivo adyacente al protoespaciador. En este estudio se priorizaron motivos con mayor puntuación teórica de eficiencia; emplear PAMs con menor “fold” esperado probablemente reduciría la magnitud de represión y podría convertir efectos detectables en no

detectables, incrementando el riesgo de falsos negativos. Esto es consistente con la observación experimental de respuestas dependientes del ARNg (por ejemplo, ARNg_1 vs ARNg_2), lo que refuerza que el “diseño” es una fuente principal de variabilidad. Asimismo, aunque CRISPRi no genera cortes de doble cadena, pueden ocurrir efectos fuera del blanco que alteren la interpretación si impactan rutas relacionadas con transporte o metabolismo; por ello, se sugiere ampliar el número de guías por gen, incluir evaluaciones de especificidad y documentar criterios de selección del PAM/ARNg . (30)

Adicionalmente, el uso de una sola clona por gen (estrategia para estandarizar el fondo genético) introduce un posible efecto clonal; por ello, en estudios futuros se recomienda evaluar más de una clona por construcción o replicar el fenotipo en construcciones independientes. También sería útil incorporar desenlaces complementarios que modulan la respuesta a PZA, cómo la concentración mínima inhibitoria frente a pirazinamida, pH intracelular, y marcadores de estrés oxidativo y de envoltura.

Finalmente, las diferencias intrínsecas entre *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* deben considerarse explícitamente: una divergencia cercana a diez por ciento en la secuencia de aminoácidos entre ortólogos puede concentrarse en regiones críticas para la función (por ejemplo, segmentos transmembrana o regiones de reconocimiento de sustrato) y modificar afinidad, cinética de transporte o regulación. Por ello, una diferencia del ~10% no es “pequeña” si cae en dominios funcionales clave: podría cambiar el acoplamiento energético, el acceso del sustrato o la especificidad, afectando la interpretación del modelo. En consecuencia, los efectos observados pueden subestimar o sobreestimar el impacto en *M. tuberculosis*, por lo que la validación en el patógeno es un paso indispensable (32,33).

En conjunto, la evidencia apoya que la modulación dirigida de transportadores puede alterar la dinámica del ácido pirazinoico y ofrece una ruta para priorizar blancos de eflujo relevantes

para la pirazinamida. Estudios futuros deberían evaluar condiciones que imiten mejor el entorno en el que actúa la pirazinamida, explorar silenciamientos combinados para mapear redundancia y sinergia, y complementar con mediciones a nivel de proteína (o actividad de transporte) para explicar discrepancias entre represión transcripcional y efecto fenotípico.

VI. CONCLUSIONES

- El silenciamiento de *MSMEG_0232* con ARNg₁ y ARNg₂ se asoció a una disminución significativa de la pendiente del eflujo de POA bajo inducción con ATC+, lo que indica que este gen contribuye al fenotipo de expulsión de POA en *M. smegmatis*. Por tanto, *MSMEG_0232* se prioriza como candidato funcional para estudios de validación en *M. tuberculosis*.
- En el caso de *MSMEG_6331*, se observó una respuesta dependiente del diseño del ARNg. Mientras que ARNg₁ no generó cambios significativos en la tasa de eflujo de POA. El silenciamiento con ARNg₂ logró una represión transcripcional con un aumento en la concentración de POA expulsado. Este efecto sugiere la activación de una posible función reguladora de este transportador.
- El silenciamiento de *MSMEG_5046* se asoció a un aumento significativo del eflujo de POA bajo ATC+, lo que sugiere la participación de mecanismos compensatorios que podrían modificar la expulsión global al reducir un componente de la red de transporte.
- A pesar de lograr una represión transcripcional efectiva, *MSMEG_0241* no mostró una reducción significativa en la expulsión de POA, lo cual indica que este transportador probablemente no participa directamente en la expulsión de este metabolito.
- En conjunto, estos resultados refuerzan la importancia de optimizar el diseño de ARN guía y validar experimentalmente su eficacia, dado que pequeñas variaciones en la ubicación o fuerza de represión pueden alterar significativamente los efectos fenotípicos observados.

VII. RECOMENDACIONES

- Validar los hallazgos en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* bajo condiciones de bioseguridad nivel 3 (BSL-3), utilizando sistemas CRISPRi adaptados a esta especie, para confirmar la relevancia funcional de los genes identificados.
- Diseñar e implementar múltiples ARNg por gen (y, cuando sea posible, más de una clona independiente) para reducir falsos negativos y variabilidad asociada al diseño/eficiencia del silenciamiento.
- Ampliar el análisis funcional a otras bombas de eflujo no evaluadas y explorar combinaciones de silenciamiento de múltiples bombas para estudiar efectos sinérgicos o compensatorios.
- Integrar transcriptómica o proteómica comparativa posterior al silenciamiento de cada gen para identificar rutas de compensación o cambios globales en la expresión génica.
- Evaluar la sinergia entre silenciamiento CRISPRi y compuestos inhibidores de bombas de eflujo para explorar nuevas estrategias terapéuticas combinadas frente a cepas resistentes.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2021: TB deaths and incidence. Global tuberculosis report. 2021;13–4.
2. MINSA - DPCTB :: Portal de Información [Internet]. [cited 2025 Jan 11]. Available from: <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/DashboardDPCTB/Dashboard.aspx>
3. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. Clin Dev Immunol [Internet]. 2011 [cited 2025 Jan 11];2011. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21234341/>
4. Treatment of tuberculosis: guidelines [Internet]. [cited 2025 Jan 11]. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/44165>
5. Suárez I, Fünfer SM, Rademacher J, Fätkenheuer G, Kröger S, Rybniker J. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. Dtsch Arztebl Int [Internet]. 2019 Oct 25 [cited 2025 Jan 11];116(43):729–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31755407/>
6. Global Tuberculosis Programme [Internet]. [cited 2025 Jan 11]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/data>
7. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. Microbiol Spectr [Internet]. 2014 Aug 15 [cited 2025 Jan 11];2(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26104205/>
8. 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 [Internet]. 1999 [cited 2025 Jan 11];181(7):2044–9. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.181.7.2044-2049.1999>

9. Boshoff HI, Mizrahi V, Barry CE. Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *J Bacteriol* [Internet]. 2002 [cited 2025 Jan 11];184(8):2167–72. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.184.8.2167-2172.2002>
10. Stehr M, Elamin AA, Singh M. Pyrazinamide: the importance of uncovering the mechanisms of action in mycobacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2025 Jan 11];13(5):593–603. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25746054/>
11. Li P, Gu Y, Li J, Xie L, Li X, Xie J. Mycobacterium tuberculosis Major Facilitator Superfamily Transporters. *J Membr Biol* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2025 May 11];250(6):573–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28852815/>
12. Rempel S, Gati C, Nijland M, Thangaratnarajah C, Karyolaimos A, de Gier JW, et al. A mycobacterial ABC transporter mediates the uptake of hydrophilic compounds. *Nature* [Internet]. 2020 Apr 16 [cited 2025 May 11];580(7803):409–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32296172/>
13. Li XZ, Zhang L, Nikaido H. Efflux Pump-Mediated Intrinsic Drug Resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2004 Jul [cited 2025 Jan 26];48(7):2415. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC434187/>
14. Pal R, Fatima Z, Hameed S. Efflux pumps in drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*: A panoramic view. *IntJCurrMicrobiolAppSci* [Internet]. 2014 [cited 2025 May 11];3(8):528–46. Available from: <http://www.ijcmas.com>
15. T JAS, J R, Rajan A, Shankar V. Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*. *J*

Infect Public Health [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2025 Jan 11];13(9):1255–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32674978/>

16. Rock JM, Hopkins FF, Chavez A, Diallo M, Chase MR, Gerrick ER, et al. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nat Microbiol* [Internet]. 2017 Feb 6 [cited 2025 Jan 11];2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28165460/>

17. Rock J. Tuberculosis drug discovery in the CRISPR era. *PLoS Pathog* [Internet]. 2019 [cited 2025 Jan 11];15(9):e1007975. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1007975>

18. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: Module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment, 2022 update [Internet]. [cited 2025 Jan 11]. Available from: <https://reliefweb.int/report/world/who-consolidated-guidelines-tuberculosis-module-4-treatment-drug-resistant-tuberculosis-treatment-2022-update>

19. Liu J, Shi W, Zhang S, Hao X, Maslov DA, Shur K V., et al. Mutations in efflux pump Rv1258c (Tap) cause resistance to pyrazinamide, isoniazid, and streptomycin in *M. tuberculosis*. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 Feb 19 [cited 2025 Jan 11];10(FEB):440830. Available from: www.frontiersin.org

20. Li X, Li P, Ruan C, Xie L xiang, Gu Y, Li J, et al. Mycobacterium tuberculosis Rv0191 is an efflux pump of major facilitator superfamily transporter regulated by Rv1353c. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2019 May 30 [cited 2025 Jan 11];667:59–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31054279/>

21. Quiñones-Garcia S, Gilman RH, Sheen P, Zimic M. Silencing of an efflux pump coding gene decreases the efflux rate of pyrazinoic acid in *Mycobacterium smegmatis*. *bioRxiv* [Internet]. 2021 Oct 30 [cited 2025 Jan 11];2021.10.29.466536. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.29.466536v1>

22. Rock J. CRISPRi gene silencing in mycobacteria Background reading.
23. Pebble [Internet]. [cited 2025 May 11]. Available from: <https://pebble.rockefeller.edu/>
24. Wong AI, Rock JM. CRISPR Interference (CRISPRi) for Targeted Gene Silencing in Mycobacteria. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2021 [cited 2025 May 11];2314:343–64. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1460-0_16
25. Integrated DNA Technologies | IDT [Internet]. [cited 2025 May 11]. Available from: <https://www.idtdna.com/page>
26. Meinzen C, Proaño A, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Zimic M, et al. A quantitative adaptation of the Wayne test for pyrazinamide resistance. *Tuberculosis* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2025 May 11];99:41–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27450003/>
27. Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *AMERREVRESPDIS* [Internet]. 1974 [cited 2025 May 11];109(1):147–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4203284/>
28. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* [Internet]. 1994 [cited 2025 May 11];32:9–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7951753/>
29. Sun Q, Li X, Perez LM, Shi W, Zhang Y, Sacchettini JC. The molecular basis of pyrazinamide activity on *Mycobacterium tuberculosis* PanD. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Jan 17 [cited 2025 Jan 11];11(1):1–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-14238-3>
30. Guo C, Ma X, Gao F, Guo Y. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023 Mar 9;11:1143157.

31. Calvo-Villamañán A, Ng JW, Planel R, Ménager H, Chen A, Cui L, et al. On-target activity predictions enable improved CRISPR–dCas9 screens in bacteria. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2020 Jun 19 [cited 2025 May 11];48(11):e64–e64. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa294>
32. Malhotra S, Vedithi SC, Blundell TL. Decoding the similarities and differences among mycobacterial species. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2025 May 11];11(8):e0005883. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5595346/>
33. Rost B. Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng.* 1999;12(2):85–94. doi:10.1093/protein/12.2.85

IX. TABLAS Y FIGURAS

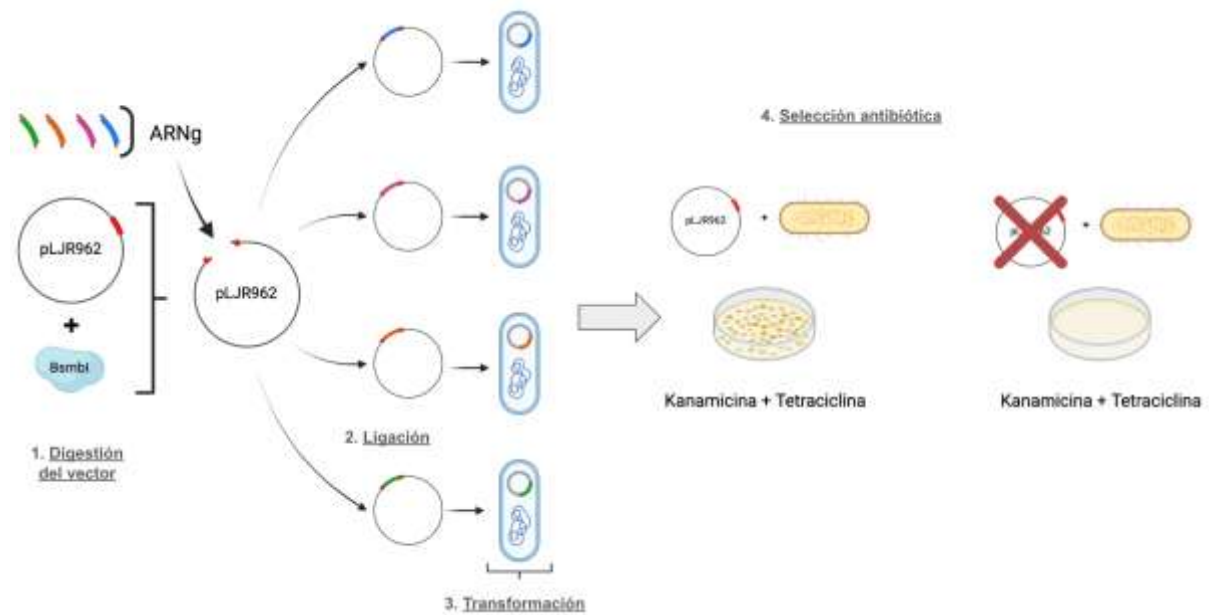


Figura 1: Representación esquemática del proceso de clonación de los ARNg en el vector pLJR962, incluyendo digestión con BsmBI, ligación de los oligonucleótidos, transformación en *E. coli* NovaBlue y selección en placas LB con kanamicina y tetraciclina.

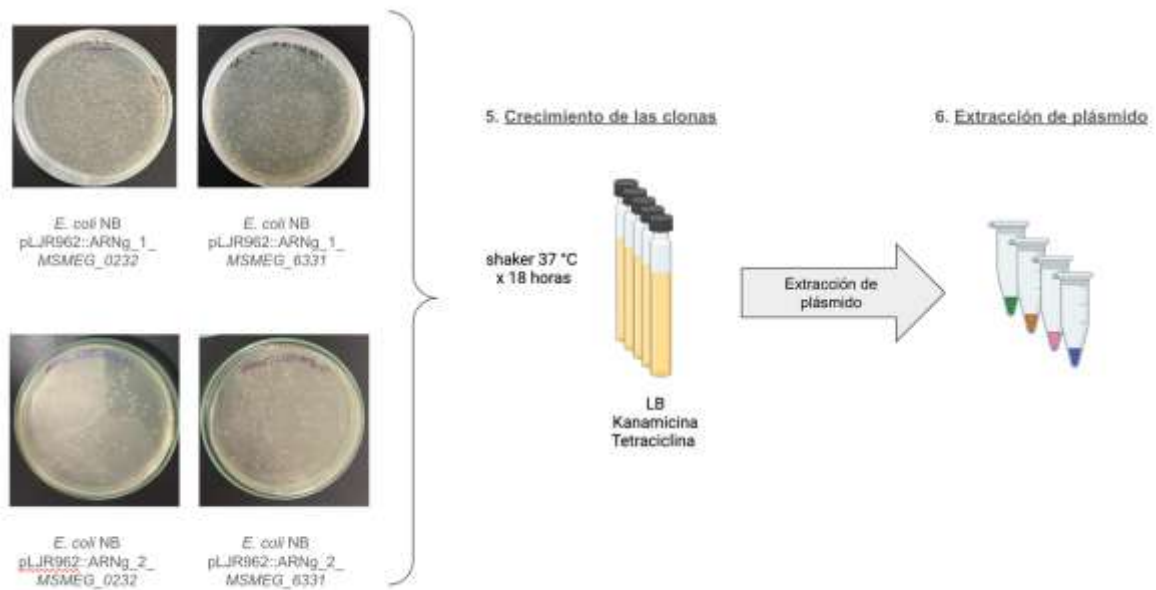


Figura 2: Imágenes de las colonias transformadas con los diferentes ARNg clonados en

pLJR962. Estas fueron cultivadas en medio LB con antibióticos. Posteriormente, se extrajeron los plásmidos para la electroporación en *M. smegmatis*.

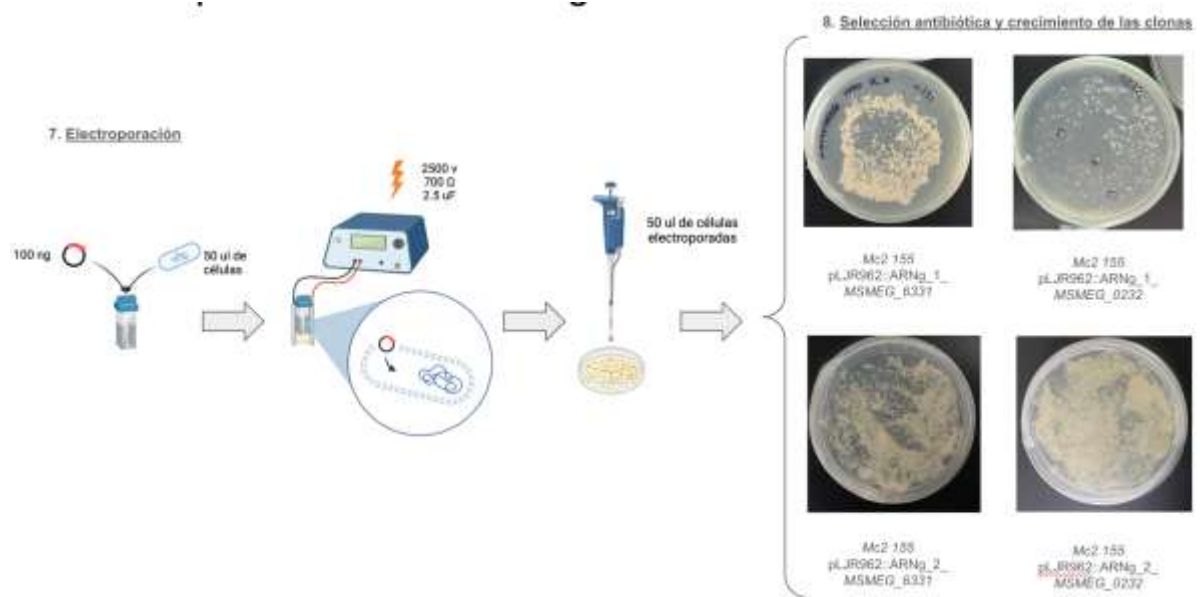


Figura 3: Diagrama representando el protocolo de transformación mediante electroporación de *M. smegmatis* *mc*²*155* con los plásmidos recombinantes. Se incluye la recuperación celular y selección en placas con antibióticos. Se observan las colonias resultantes.

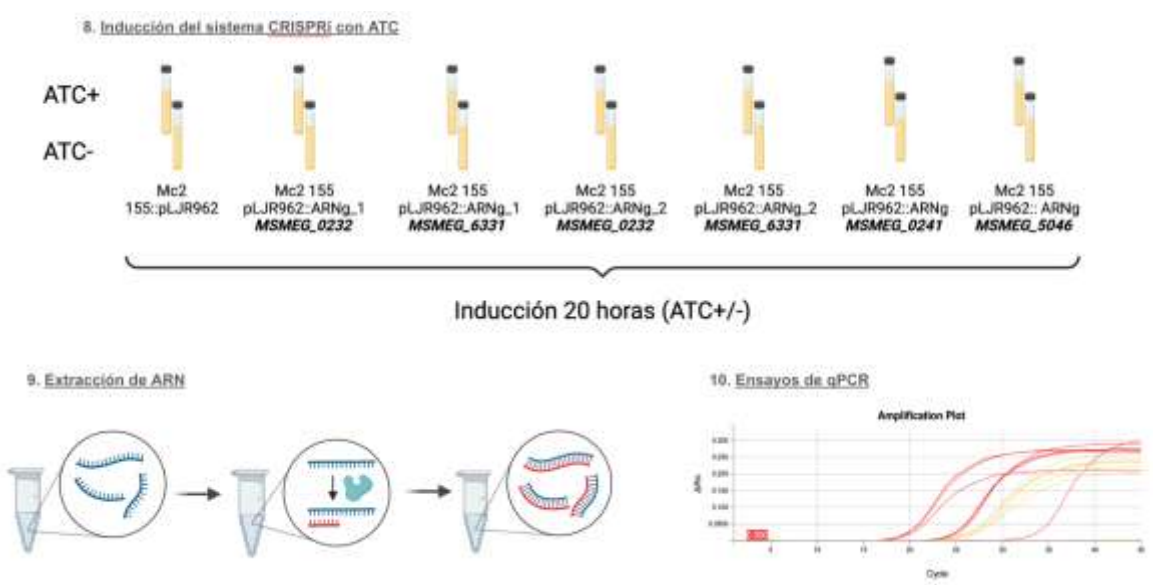


Figura 4: Diagrama del protocolo experimental para la inducción con anhidrotetraciclina (ATC), extracción de ARN, retrotranscripción y evaluación de la represión génica por qPCR.

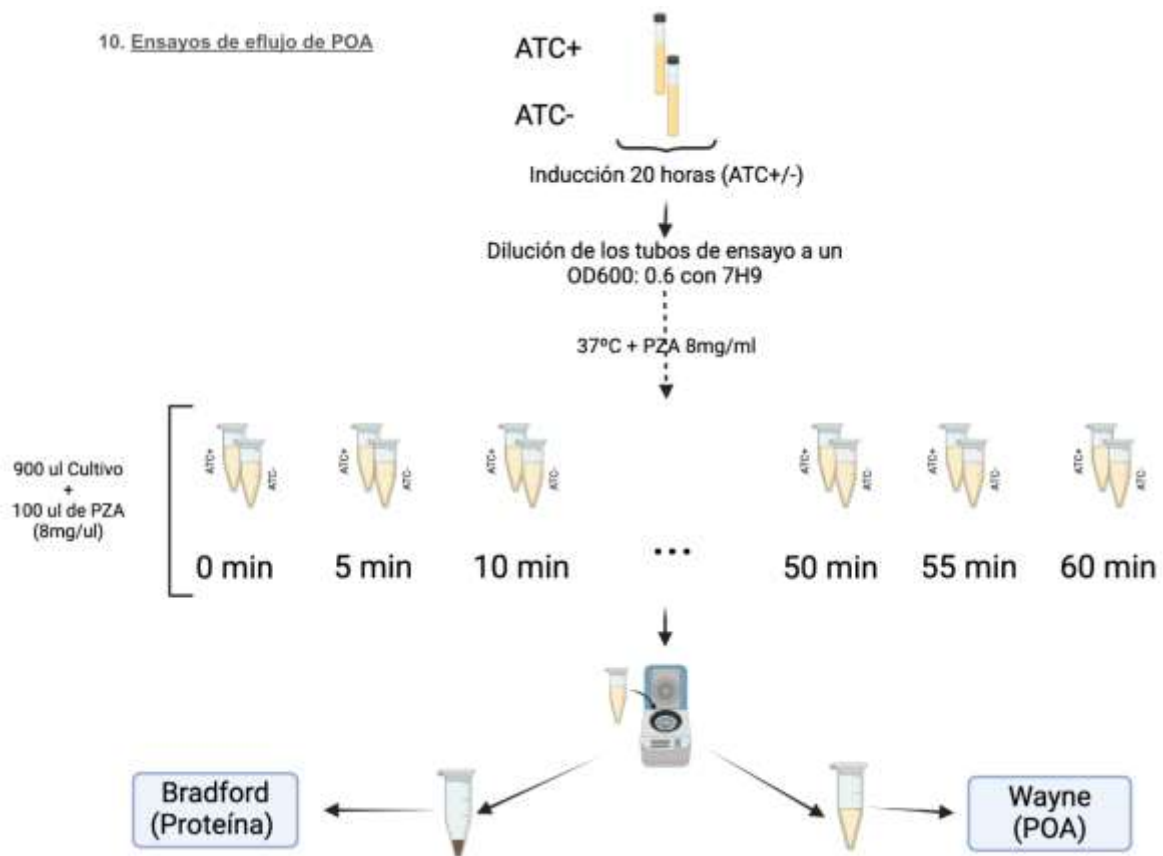


Figura 5: Protocolo experimental del ensayo de eflujo de POA basado en la incubación de cultivos tratados con PZA, toma de muestras por tiempo, separación de fases, cuantificación de POA por ensayo de Wayne y normalización con proteínas totales por método de Bradford.

MSMEG_6331 / Rv3756c

Sequence ID: **Query_2912149** Length: **239** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 221 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
269 bits(687)	9e-96	Compositional matrix adjust.	171/221(77%)	191/221(86%)	0/221(0%)
Query 1		MNFLQQALAFIFTAENWAGPSGLGARIVEHLEYTAVAVFFSALIAVPLGMVIGHTGRGTF			60
Sbjct 1		MNFLQQAL+++ TA NW GP GL R EHLEYTAVAV SALIAVP+G++IGHTGRGT			60
Query 61		LVVTGVNLRALPTLVLLLVLLWGLVLPPTVALMLLGIPLLAGTYAGVANVERTVV			120
Sbjct 61		LVV VN LRALPTLVLLLVLL+GLGL PP VALMLLGIPLLAGTYAG+A+V+ VV			120
Query 121		DAARSMGMTESRILLRVEVPNALPLILGGLRTSTLQIVATATVAAYASLGGLGRYLIDGI			180
Sbjct 121		DAAR+MGMTES++LLRVEVPNALPL+LGGLR++TLQ+VATATVAAYASLGGLG YLIDGI			180
Query 181		KIREFHIALVGAIMVTALALILDAALAFVWLSVPGAGRLR		221	
Sbjct 181		K R FHIALVGA+MV ALAL LD LA A W+SVPG GR+R		221	
Query 181		KERRFHIALVGAMVAALALTLDGLLALAGWVSVPGTGRMR		221	

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E-value	Per. Ident
MSMEG_6331/Rv3756c		269	269	82%	9e-96	77.38%

Figura 6: Resultados del alineamiento por BLAST NCBI de las secuencias de aminoácidos del gen *MSMEG_6331* (*M. smegmatis*) y *Rv3756c* (*M. tuberculosis*), mostrando un porcentaje de identidad del 77.38 %, un valor de e-value de 9e-96, y una cobertura del 82 %.

```
# Similarity: 190/268 (73.9%)
# Gaps: 29/268 (10.8%)
# Score: 843.0
#
#
#-----
MSMEG_6331      1 MNFLQQALAFIFTAENWAGPSGLGARIVEHLEYTAVAVFFSALIAVPLGM      50
|||...:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:..:
Rv3756c         1 MNFLQQALSYLLTASNWTGPVGLAVRICEHLEYTAVAVAASALIAVPVGL      50

MSMEG_6331     51 VIGHTGRGTFVVVTGVNLRALPTLVLLLVLLWGLVLPPTVALMLLG      100
:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
Rv3756c        51 L|IGHTGRGTL|VVGAVNGLRALPTLVLLLVLLPGLGLPPLVALMLLG      100

MSMEG_6331    101 IPPLLAGTYAGVANVERTVDAARSMGMTESRILLRVEVPNALPLILGGL      150
||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
Rv3756c       101 IP|SLLASTYAGIASVDPLVDAARAMGMTESQVLLRVEVPNALPLMLGGL      150

MSMEG_6331    151 RTSTLQIVATATVAAYASLGGLGRYLIDGIRKREFHIALVGAIMVTALAL      200
:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
Rv3756c       151 RSATLQVVATATVAAYASLGGLGGYLIDGIRKERRFHIALVGAMVAALAL      200

MSMEG_6331    201 ILDAALAFVWLSVPGAGRLRGRS5GRQMPQPFLLGDEVALESRTPNASA      250
||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
Rv3756c       201 TL DGLLALAGMVSVPGTGRMRKLA---VVDKPAAGGGHALR-----      239

MSMEG_6331    251 RSSGVGVYEGGAPSHTEG      268
Rv3756c       240 -----      239
```

Figura 7: Resultado del alineamiento global por EMBOSS Needle entre las secuencias de aminoácidos del gen *MSMEG_6331* y *Rv3756c*. El análisis arrojó un porcentaje de similitud del 73.9 %, con un 10.8 % de diferencias debido a *gaps*.

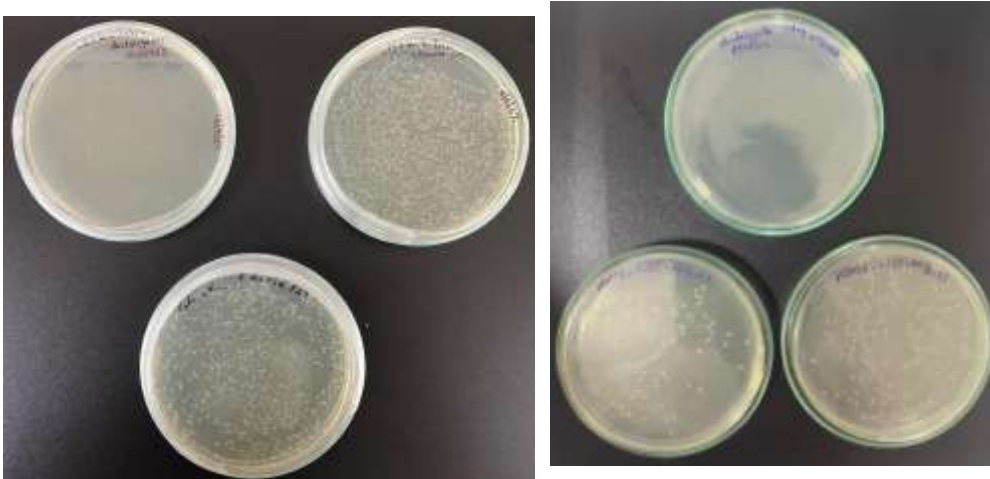


Figura 8: Transformación del vector con los ARNg en *E. coli* NovaBlue para los genes *MSMEG_6331* (ARNg_1), *MSMEG_0232* (ARNg_1), *MSMEG_6331* (ARNg_2) y *MSMEG_0232* (ARNg_2), cultivados en placas LB suplementadas con Kanamicina y Tetraciclina.

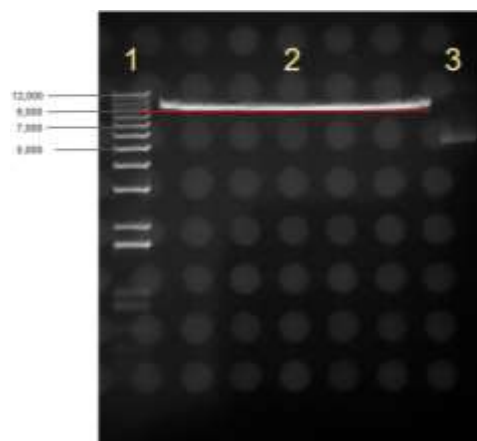


Figura 9: Verificación de la linealización del plásmido pLJR962 mediante digestión con la enzima BsmBI y corrida electroforética en gel de agarosa al 0.8 %. Carril 1: marcador de peso molecular (1 kb plus). Carril 2: pLJR962 linealizado. Carril 3: pLJR962 sin digerir.

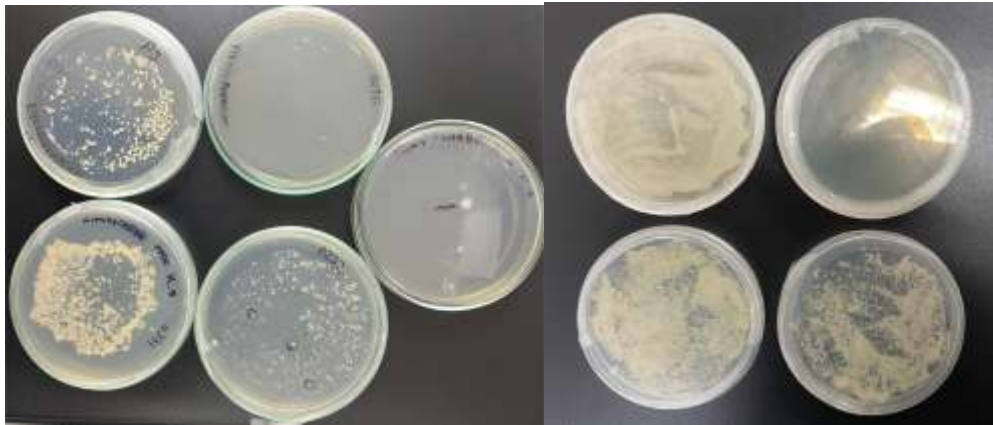


Figura 10: Electroporación del plásmido pLJR962, *MSMEG_6331* (ARNg_1), *MSMEG_6331* (ARNg_2) y *MSMEG_0232* (ARNg_1), *MSMEG_0232* (ARNg_2) y *MSMEG_0250* en *M. smegmatis*.

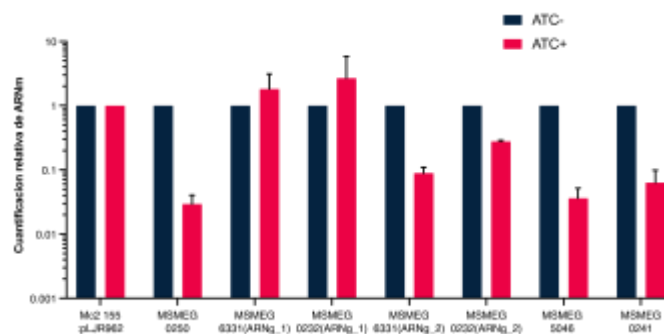


Figura 11: Cuantificación relativa de ARNm en condiciones con (ATC+) y sin (ATC-) anhidrotetraciclina para genes regulados por CRISPRi. La expresión relativa se calculó como $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$, normalizada con *MSMEG_2758* y calibrada a ATC- (=1). Se muestran promedios de $n = 3$ réplicas biológicas \pm SD. En esta figura, ATC- se muestra en barras negras y ATC+ en barras rojas. El eje Y está en escala logarítmica.

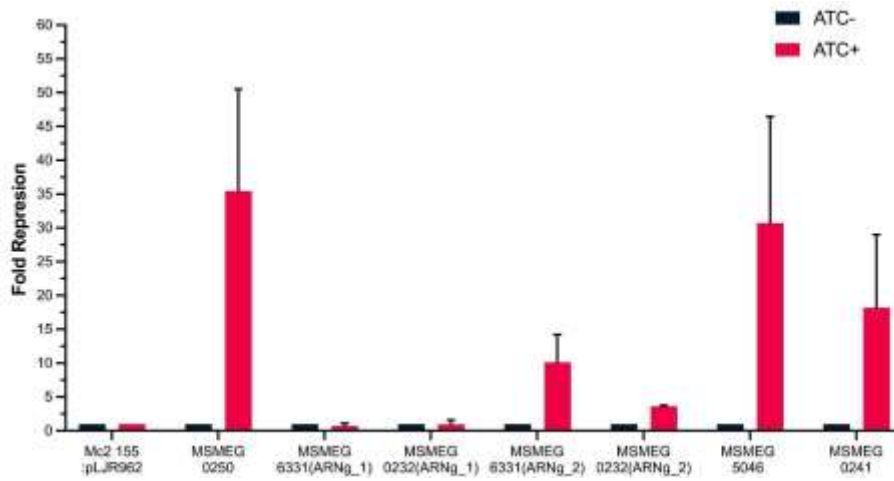
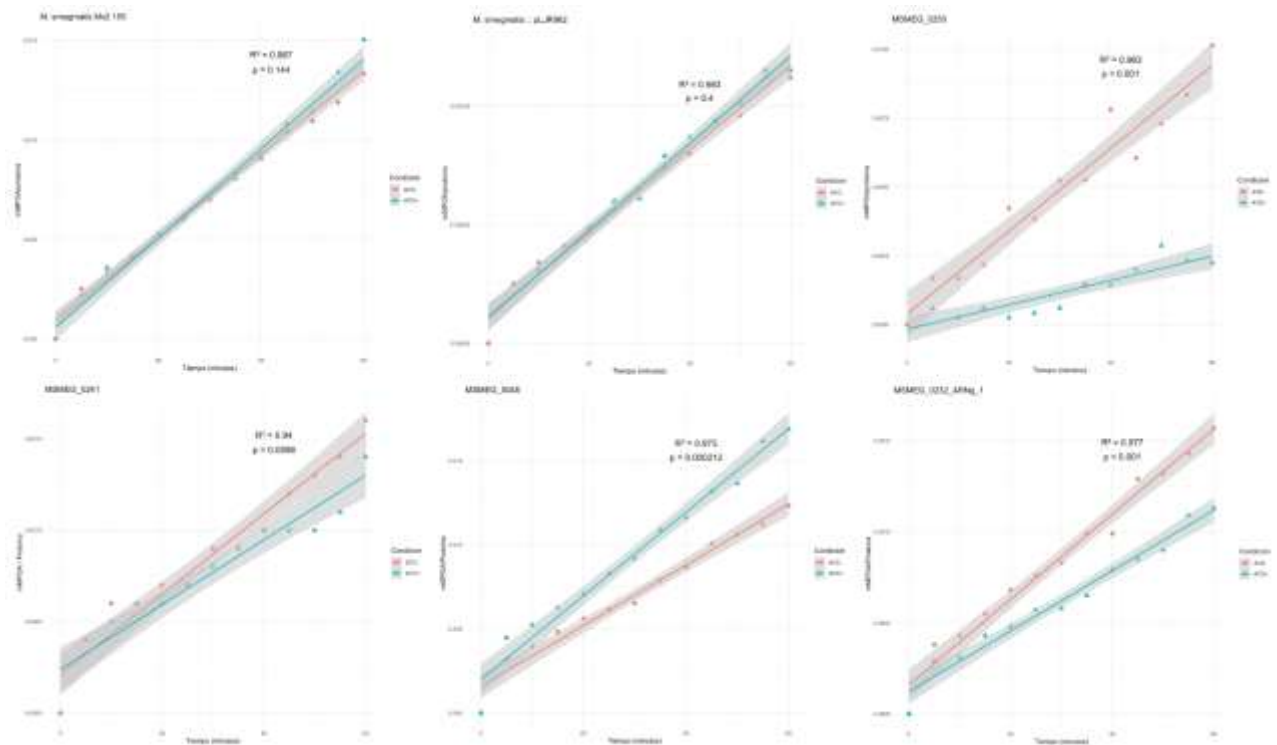


Figura 12: Niveles de fold repression en cepas de *M. smegmatis* en condiciones ATC⁻ y ATC⁺. El fold repression se calculó como ATC⁻/ATC⁺ (equivalente a $1/2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ cuando ATC⁻ = 1). Se muestran promedios de n = 3 réplicas biológicas ± SD. En esta figura, ATC⁻ se muestra en barras negras y ATC⁺ en barras rojas.



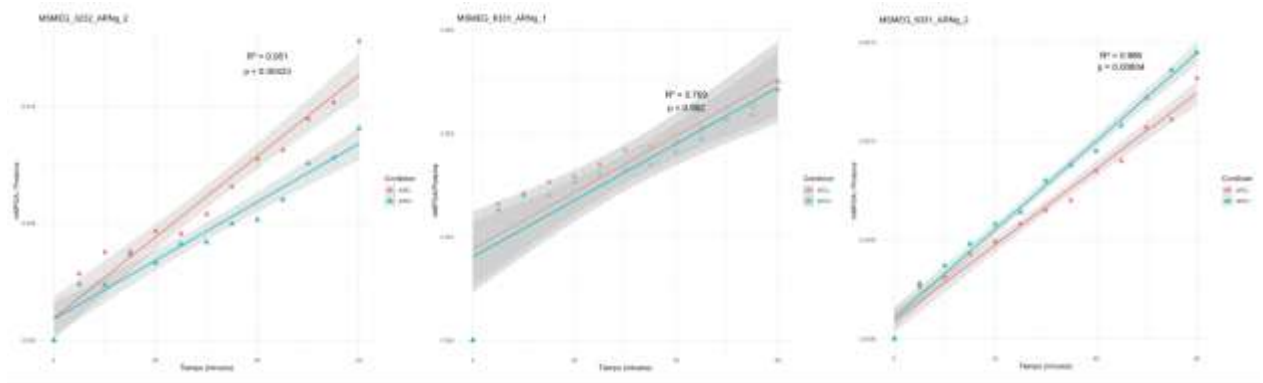


Figura 13: Gráficas de regresión lineal con interacción tiempo×condición (\pm ATC) para la cuantificación de POA normalizado (mM POA/mg proteína) desde 0 a 60 min en intervalos de 5 min en la cepa silvestre (*mc²155*), control negativo (*mc²155::pLJR962*), control positivo (*MSMEG_0250*) y genes estudiados (*MSMEG_0241*, *MSMEG_5046*, *MSMEG_0232* y *MSMEG_6331*). El valor de p corresponde al término de interacción tiempo×condición (diferencia de pendientes entre ATC+ y ATC-). Las bandas grises representan el IC 95%

Locus	cobertura	Identidad	Gen Homólogo	Número de accesoión	E value
<i>Rv3756c</i>	82%	77.38%	<i>MSMEG_6331</i>	Query_4213067	9e-96
<i>Rv0191</i>	96%	59.65%	<i>MSMEG_0232</i>	Query_5110615	5e-143
<i>Rv1250</i>	89%	63.94%	<i>MSMEG_5046</i>	Query_5066087	0.0
<i>Rv0202c</i>	100%	69.04%	<i>MSMEG_0241</i>	Query_4247993	0.0

Tabla 1. Resultados del alineamiento BLASTp de genes seleccionados de *M. tuberculosis* y sus ortólogos en *M. smegmatis*, mostrando porcentaje de cobertura, identidad y valores de e-value. La columna “Número de accesoión” corresponde al ID del hit/alineamiento reportado por BLAST

Gen <i>M. tuberculosis</i>	Gen <i>M. smegmatis</i>	Similitud
<i>Rv3756c</i>	<i>MSMEG_6331</i>	73.9 %
<i>Rv0191</i>	<i>MSMEG_0232</i>	71.2 %
<i>Rv1250</i>	<i>MSMEG_5046</i>	67.4 %
<i>Rv0202c</i>	<i>MSMEG_0241</i>	80.6 %

Tabla 2. Resultados del alineamiento global (EMBOSS Needle) y porcentaje de similitud entre genes seleccionados de *M. tuberculosis* y sus homólogos en *M. smegmatis*.

PAM Table

PAM	Fold repression	SD
5'-NNAGAAG-3'	216.7	10.0
5'-NNAGAAT-3'	216.2	10.4
5'-NNAGAAA-3'	158.1	22.8
5'-NNGGAAG-3'	145.2	5.3
5'-NNAGAAC-3'	120.5	7.9
5'-NNGGAAA-3'	110.5	26.4
5'-NNAGCAT-3'	84.6	5.2
5'-NNAGGAG-3'	82.2	9.2
5'-NNAGGAT-3'	64.7	8.7
5'-NNAGCAA-3'	53.4	9.9
5'-NNGGAAC-3'	51.5	6.2
5'-NNGGAA-3'	47.3	3.3
5'-NNAGCAG-3'	42.2	7.0
5'-NNAGGAA-3'	38.5	5.2
5'-NNAGGAC-3'	25.5	0.8
5'-NNGGGAG-3'	24.7	1.9
5'-NNGGGAT-3'	24.2	3.4
5'-NNGGGAA-3'	12.3	0.8
5'-NNAGCAC-3'	11.9	1.2
5'-NNGGGAC-3'	7.9	1.0
5'-NNGGCAT-3'	6.7	0.9
5'-NNGGCAG-3'	4.0	0.3
5'-NNGGCAA-3'	3.3	0.3
5'-NNGGCAC-3'	2.7	0.3
ctrl sgRNA	1.3	0.1

Tabla 3: Secuencias PAM para dCas9sthl1 ordenadas de mayor a menor fold represión

	Gen	Oligonucleotido	ARNg	PAM seq	Predicted strength	Alpha L	Beta L	Gamma ref	Beta E	Predicted log2FC	
CRISPRi protocol	MSMEG_0250	Top	5' GGGAGCGACAGACTGGCTGCCCTGCTC 5'	5' GCGACAGACTGGCTGCCCTGCTC 5'	GTAGAAA	0.99	-0.1	0.85	3.85	-1.02	-18.42
		Bot	3' AAACBADGADGGGACGCCAGTCTGTCC 3'								
	MSMEG_6331.1	Top	5' GGGAGAGCGGCACCCGATCAGGC 3'	5' GAGCGGCACCCGATCAGGC 3'	CGAAGAG	0.93	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Bot	3' AAACGCGCTGATGCGGGTCCGCTC 3'								
	MSMEG_0232.1	Top	5' GGGAGATCACGGACCGCGCCGACCG 3'	5' GATCACGGGACCGCGCCGACCG 3'	GGAGGAT	0.79	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Bot	3' AAACCGTGGCGCGCTGCCCTGATC 3'								
MSMEG_0281	Top	5' GGGAGCAAGCGGTGATGCGCCCTGGTC 3'	5' GCAAGCGGTGATGCGCCCTGGTC 3'	GGGGAAG	0.94	0.19	0.06	10.2	-0.01	0.61	
	Bot	3' AAACGATCAGGGCCCATCACCGCTTGC 3'									
MSMEG_5040	Top	5' GGGAAATCCGACGGGACGTTGAC 1'	5' ATGCCACGGGACGTTGAC 1'	GAAGAAG	0.85	-0.08	0	29.04	-0.51	0.05	
	Bot	3' AAACGTCAACGTCGCCGTGCGCAT 3'									
sgRNA tool program	MSMEG_6331.2	Top	5' GGGAGCGCAGCGGCACCCGATCAGGC 3'	5' GCGAGCGGCACCCGATCAGGC 3'	CGAAGAG	0.94	-0.11	0.03	15	-0.03	-0.81
		Bot	3' AAACCGCTGATCGCGTCCGCTGAC 3'								
	MSMEG_0232.2	Top	5' GGGAAATGAGCTCAGCAGCGACAAC 3'	5' ATGAGCTCAGCAGCGACAAC 3'	TGAGAAG	0.95	-0.17	0.02	10.2	-0.02	-0.15
		Bot	3' AAACGTTGTGCTGCTGAGGCTCAT 3'								

Tabla 4: Oligonucleotidos seleccionados a partir del programa para el diseño de ARNg para el uso de CRISPRi en micobacterias.

	Predictor	Coefficient	Error	Valor T	Valor p
A	Intercepto	$\beta_0 = 4.416e-04$	2.480e-04	1.654	0.09160
	Tiempo	$\beta_1 = 2.852e-03$	6.076e-06	34.226	$< 2e-16$
	Condición ATC+	$\beta_2 = -3.405e-04$	3.783e-04	-0.899	0.37034
	Tiempo Condición	$\beta_3 = 1.392e-05$	1.091e-05	1.306	0.14435
B	Intercepto	$\beta_0 = 8.001165$	2.550e-03	4.811	0.00128
	Tiempo	$\beta_1 = 1.751e-05$	7.145e-07	24.515	$< 2e-16$
	Condición ATC+	$\beta_2 = -8.352e-06$	3.575e-03	-0.234	0.817322
	Tiempo Condición	$\beta_3 = 8.831e-07$	1.014e-06	8.659	0.00028
C	Intercepto	$\beta_0 = 8.000304$	8.000132	1.251	0.223
	Tiempo	$\beta_1 = 8.001165$	8.550e-06	16.962	4.06e-14
	Condición ATC+	$\beta_2 = -0.000309$	8.000429	-1.253	0.223
	Tiempo Condición	$\beta_3 = -0.000301$	1.253e-03	-0.473	2.25e-08
D	Intercepto	$\beta_0 = 0.00352$	0.001031	4.155	0.000413
	Tiempo	$\beta_1 = 0.001100$	1.894e-05	16.655	0.25e-14
	Condición ATC+	$\beta_2 = 0.000411$	0.000542	0.759	0.44945
	Tiempo Condición	$\beta_3 = -4.750e-05$	1.131e-05	-4.228	0.000212
E	Intercepto	$\beta_0 = 8.000278$	5.102e-03	4.01	0.00039
	Tiempo	$\beta_1 = 2.165e-05$	1.466e-06	34.972	5.1e-13
	Condición ATC+	$\beta_2 = 2.846e-05$	7.126e-03	0.388	0.701479
	Tiempo Condición	$\beta_3 = -0.077e-06$	2.073e-06	-1.997	0.04901
F	Intercepto	$\beta_0 = 8.001689$	3.315e-05	4.572	0.00049
	Tiempo	$\beta_1 = 2.341e-03$	6.931e-07	23.017	$< 2e-16$
	Condición ATC+	$\beta_2 = -1.791e-05$	4.977e-05	-0.362	0.454264
	Tiempo Condición	$\beta_3 = -0.033e-06$	1.496e-06	-4.84	7.76e-05
G	Intercepto	$\beta_0 = 5.546e-04$	1.760e-04	2.03	0.0393
	Tiempo	$\beta_1 = 1.756e-04$	1.803e-05	16.208	9.49e-14
	Condición ATC+	$\beta_2 = -4.576e-05$	3.537e-04	-0.182	0.91539
	Tiempo Condición	$\beta_3 = 4.796e-05$	1.504e-05	-3.190	0.0021
H	Intercepto	$\beta_0 = 8.000014$	8.001604	3.3	1.54e-05
	Tiempo	$\beta_1 = 7.749e-05$	4.556e-05	6.052	0.31e-08
	Condición ATC+	$\beta_2 = -7.571e-05$	8.000208	-0.174	0.742
	Tiempo Condición	$\beta_3 = -1.479e-07$	4.416e-06	-0.022	0.982
I	Intercepto	$\beta_0 = 9.132e-05$	2.670e-03	1.493	0.00237
	Tiempo	$\beta_1 = 1.916e-03$	5.526e-07	23.315	$< 2e-16$
	Condición ATC+	$\beta_2 = 1.426e-05$	1.760e-03	0.403	0.68951
	Tiempo Condición	$\beta_3 = 1.496e-06$	1.962e-06	-3.914	0.00004

Tabla 5: Valores correspondientes para los coeficientes de cada regresión lineal A) Mc2 155, B) Mc2 155::pLJR962, C) *MSMEG_0250*, D) *MSMEG_5046*, E) *MSMEG_0241*, F) *MSMEG_0232* (ARNg_1), G) *MSMEG_0232* (ARNg_2), H) *MSMEG_6331* (ARNg_1), I) *MSMEG_6331* (ARNg_2)

X. ANEXOS

Anexo 1: Transformación de *E. coli* con plásmido pET28a

- Agrega 5 microlitros del plásmido pET28a a un tubo que contenga células competentes. Permite que el tubo repose en hielo durante 30 minutos. Luego, se coloca los tubos Eppendorf en un baño de agua a una temperatura de 42°C durante 1 minuto y retíralos posteriormente, colocándolos nuevamente en hielo durante 2 minutos.
- Añade de manera inmediata 1000 microlitros de medio SOC o caldo LB estéril a los tubos y deja que incuben a una temperatura de 37°C con agitación durante una hora.
- Centrifugar los tubos a 6000 revoluciones por minuto durante 5 minutos. Desecha el líquido sobrenadante y resuspender el sedimento resultante utilizando 100 microlitros de caldo SOC. A continuación, siembra la suspensión en placas que contengan agar LB + Kanamicina (20 ug/ml) utilizando un asa de Drigalsky previamente desinfectada con etanol.
- finalmente dejar a incubar las placas a una temperatura de 37°C durante un período de 16 a 18 horas

Anexo 2: Preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis*

- El proceso comienza con la incubación de una colonia de *M. smegmatis* en 10 ml de caldo 7H9-T con 5% de OADC y Tween 80 (0.05%), a 37 °C y 300 rpm durante 3-5 días. Posteriormente, se transfiere 1 ml de este cultivo a 100 ml de caldo 7H9, diluyendo 1:100, y se incuba a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica (OD600) de 0.6-0.8.
- El cultivo se centrifuga a 8,000 rpm por 10 minutos a 4 °C para sedimentar las células, que luego se lavan tres veces con solución fría de glicerol al 10%-Tween 80: 20 ml en el primer lavado y 10 ml en los siguientes. Finalmente, las células se resuspenden en

10 ml de glicerol al 10%-Tween 80, se alicuan en volúmenes de 400 µl y se almacenan a -70 °C para su conservación a largo plazo.

Anexo 3: Transformación de *M. Smegmatis* por electroporación con plásmido.

Para poder realizar la transformación completa de las células electrocompetentes de *M. smegmatis*, el primer paso, se añade 5 microlitros de ADN plasmídico, con una concentración de 1 microgramo por microlitro, a una muestra de 400 microlitros de células electrocompetentes. Esta mezcla se deja en reposo durante 10 minutos a una temperatura en hielo. Posteriormente, se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación de 2mm previamente enfriada en hielo. La cubeta fue colocada en el electroporador (ECM630, BTX) y se configura los siguientes parámetros: un voltaje de 2.5 V, una capacitancia de 25 microfaradios y una resistencia de 1000 ohmios.

Una vez completada la electroporación, se transfirió la mezcla a tubos de vidrio que contenían 3 mililitros de caldo 7h9-T, y se deja incubar durante 3 horas a una temperatura de 37°C con agitación. Después de este periodo, se toma una muestra de 100 microlitros del cultivo incubado y se siembra en agar 7h10 con los antibióticos correspondientes, con un asa Drigalsky. Las placas se incuban a 37°C hasta que las colonias sean visibles, la cual ocurre en un lapso de 3 a 5 días. Estos pasos permiten llevar a cabo exitosamente la transformación de las células electrocompetentes de *M. smegmatis*.

Anexo 4:

Primera fase:

En la primera etapa se lleva a cabo la hibridación de los primers hexámero con el molde de ARN. Para que se lleve a cabo, se agrega 50 uM de hexámeros y 1 ul del mix de dNTPs,

posteriormente se le agrega 10 ul de ARN tratado con la DNasa Ambion y 1 ul de agua DEPC. La mezcla resultante se incuba a 65°C durante 5 minutos y posteriormente se enfría en hielo.

Segunda fase:

En esta segunda etapa ocurre la etapa de preparación para la reacción de retrotranscripción, en la cual se toma 4 ul de buffer de SuperScript IV a una concentración de 5x, 1ul de 100 mM de DTT, 1 ul de inhibidor de RNasa y por último 0.5 ul de RT SuperScript IV

La mezcla total de reacción se combina con la fase inicial y se incubará en el termociclador (modelo Benchmark TC 9639) a una temperatura de 23°C durante 10 minutos, seguido de una incubación a 55°C durante 10 minutos y finalmente a 80°C durante 10 minutos. Además, se realizará un control para detectar la existencia de ADN genómico, donde se excluirá la enzima SuperScript IV y el inhibidor de la RNasa