



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**Efecto del silenciamiento de los genes que codifican a bombas de eflujo  
(*Rv3756C*, *Rv1667C* y *Rv3008*) en el eflujo de ácido pirazinoico y en la  
susceptibilidad a pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis***

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Kiara Beatriz Aricoche Del Campo

Asesora:

Dra. Patricia Sheen Cortavarria

Co-asesora:

Mg. Maura Stefany Quiñones Garcia

Lima, Perú

2025

**Jurado calificador**

**Presidente:** Dra. Manuela Renee Verastegui Pimentel

**Vocal:** Dr. Pablo Tsukayama Cisneros


**Secretario:** Dr. Holger Maita Malpartida

Feedback Studio - Google Chrome  
ev.turnitin.com/app/carta/es/?s=1&ro=103&lang=es&u=1165482885&o=2664668810

turnitin

1 de 1: Uigict FACI FAVEZ  
Efecto del silenciamiento de los genes que codifican a bomb...

Similitud 13% Marcas de alerta 1



**UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA**

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**Efecto del silenciamiento de los genes que codifican a bombas de eflujo (Rv3756C, Rv1667C y Rv3008) en el eflujo de ácido pirazinoico y en la susceptibilidad a pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis***

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:  
Kiara Beatriz Aricoche Del Campo

Asesora:  
Dra. Patricia Sheen Cortavarria

Co-asesora:  
Mg. Maura Stefany Quiñones Garcia

Lima, Perú  
2025

Página 1 de 92 19938 palabras 131%

Informe estándar  
Informe en inglés no disponible Más información

**13% Similitud estándar** Filtros

67 Exclusiones →

Fuentes  
Mostrar las fuentes solapadas

- 1 Internet repositorio.upch.edu.pe 7%  
134 bloques de texto 1403 palabra que coinciden
- 2 Internet hdl.handle.net <1%  
23 bloques de texto 19 palabra que coinciden
- 3 Internet www.coursehero.com <1%  
6 bloques de texto 56 palabra que coinciden
- 4 Internet eprints.uanl.mx <1%

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, William Aricoché e Iris Del Campo, y a mi hermana Jhassmin, quienes con sus palabras de aliento y amor han sido mi motor a lo largo de este camino. Su apoyo me ha dado la fuerza para perseverar y a creer en mi capacidad para realizar este proyecto.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco profundamente a Dios, por ser mi guía, fuente de fe y fortaleza en cada etapa académica y personal.

A mis padres, William Aricoché e Iris Del Campo, por ser el soporte emocional y de amor que me ha sostenido a lo largo de mis estudios, dándome aliento y confianza. A mi hermana Jhassmin, por ser mi guía académica y personal, quien siempre ha creído en mí, empoderándome para confiar en mis capacidades. Un agradecimiento especial a mi abuelito Tomás, quien, con su ejemplo y cercanía, me ha llevado más cerca de Dios.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los Dres. Patricia Sheen y Mirko Zimic, quienes no solo me han brindado su apoyo constante y sabiduría académica, sino que me ofrecieron un segundo hogar en el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular.

A mis amigas Nayeli, Daniela, Lucía, Macarena y Melina, gracias por ser mi refugio emocional, por sus palabras de ánimo, su compañía y por hacer que este camino sea más alegre.

A mis guías del laboratorio y amigos, María De Grecia, Candy León, Stefany Quiñones y Alonso Flores; quienes me han permitido no solo aprender los aspectos técnicos de la investigación, sino también enfrentar los errores y desafíos propios del trabajo científico. Gracias por el cariño, paciencia y enseñanzas.

Al Dr. Jorge Coronel, Nataly Bailón y Walter Solano, por sus enseñanzas y apoyo, en el laboratorio BSL3, con el análisis de mis resultados con MTB y brindarme de sus experiencias para aprender de ellas.

Finalmente, agradezco a todos mis amigos del laboratorio que me acompañaron en este proceso: Violeta, Kensy, David, Renato, Rosa, Brigitte, Kevin, Jimena y a todos los chicos del laboratorio que me han brindado su afecto y buenos deseos a lo largo de estos años.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue financiado por el CONCYTEC-PROCIENCIA en el marco del concurso “Tesis de Pregrado y Postgrado en Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica 2023”. Número de contrato: PE501085418-2023

International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB)

SIDISI N° 211557

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.1. Antecedentes generales.....	4
1.1.1. Características de la bacteria <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y niveles de clasificación de resistencia .....	4
1.1.2. Mecanismo de acción de pirazinamida en <i>M. tuberculosis</i> .....	5
1.1.3. Resistencia a pirazinamida en <i>M. tuberculosis</i> .....	6
1.1.4. Bombas de eflujo .....	9
1.1.5. Relación entre el eflujo de POA y aumento de resistencia a PZA .....	11
1.1.6. Tecnología CRISPR/cas – CRISPRi .....	11
1.1.7. Uso de las técnicas de Wayne para detectar concentración de POA.....	12
1.1.8. Uso de TEMA para detectar resistencia a pirazinamida .....	13
<b>II. PREGUNTA .....</b>	<b>13</b>
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>14</b>
<b>IV. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
4.1. Objetivo Principal .....	14
4.2. Objetivos Específicos.....	14
<b>V. METODOLOGÍA.....</b>	<b>14</b>
5.1. Tipo de estudio.....	14
5.2. Aspectos éticos.....	15
5.3. Área de estudio.....	15
5.4. Material biológico .....	15
5.5. Procedimiento experimental.....	15
5.5.1. Diseño del estudio .....	15
5.5.2. Elección de genes que codifican para bombas de eflujo implicados en la resistencia a pirazinamida en <i>M. tuberculosis</i> .....	17
5.5.3. Clonación de un ARN guía (ARNg) en el plásmido pLJR965 .....	17
5.5.4. Transformación del producto ligado en <i>Escherichia coli</i> .....	19
5.5.5. Transformación en <i>M. tuberculosis</i> .....	20
5.5.6. Inducción de silenciamiento génico transcripcional (CRISPRi).....	23
5.5.7. Evaluación de silenciamiento individual de bombas de flujo .....	25
5.5.8. Cálculo del silenciamiento de la expresión génica, logaritmo de cambio de pliegue (LOG2FC) en cepas silenciadas y porcentaje de ARNm .....	27

5.5.9. Evaluación de crecimiento de las cepas transformadas.....	27
5.5.10. Velocidad de eflujo de POA mediante la técnica de Wayne.....	28
5.5.11. Susceptibilidad a PZA para cepas de <i>M. tuberculosis</i> (TEMA): Determinación de la mínima concentración inhibitoria (MIC) .....	30
5.5.12. Análisis estadístico .....	32
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
6.1. Clonación de un ARNg en el plásmido pLJR965 .....	33
6.2. Ligación de ARNg con el plásmido CRISPRi pLJR965.....	34
6.3. Verificación del plásmido pLJR965 con los ARNg por secuenciación .....	34
6.4. Transformación en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv con el plásmido pLJR965 recombinado .....	35
6.5. Inducción de silenciamiento génico transcripcional (CRISPRi).....	37
6.5.1. Integridad del ARN extraído .....	37
6.5.2. Evaluación de silenciamiento individual de bombas de flujo .....	38
6.6. Evaluación de crecimiento de las cepas transformadas .....	43
6.7. Evaluación de la concentración extracelular y velocidad de eflujo inicial de ácido pirazinoico en las cepas silenciadas y no silenciadas.....	44
6.7.1. Concentración extracelular de ácido pirazinoico mM en cepas silenciadas y no silenciadas.....	44
6.7.2. Velocidad inicial del eflujo de POA mM en cepas silenciadas y no silenciadas.....	45
6.8. Evaluación a la susceptibilidad a pirazinamida en cepas silenciadas y no silenciadas (TEMA).....	47
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias del DNA de MTB con el plásmido insertado .....	22
Tabla 2: Primers diseñados para realizar qPCR en los genes diana. ....	26
Tabla 3: Cebadores seleccionados para formar los ARNg del sistema de CRISPRi que se usará en los genes de interés .....	33
Tabla 4: Porcentaje de eficiencia de los primers evaluados .....	39
Tabla 5: Descripción estadística de los niveles de expresión de ARNm ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv silenciados (ATc+) y sin silenciar (ATc-) .....	40
Tabla 6: Silenciamiento de la expresión génica y LOG2FC de cada gen estudiado con las dos condiciones (ATc- y ATc +) de las cepas recombinantes: H37Rv/pLJR965 (control negativo), <i>Rv3756c</i> , <i>Rv1667c</i> y <i>Rv3008</i> . ....	41
Tabla 7: Porcentaje de ARNm disminuido en las cepas silenciadas .....	42
Tabla 8: Comparación de pendientes a partir de los valores de concentración acumulada de POA.....	45
Tabla 9: Comparación de pendientes a partir de los valores de la velocidad inicial del eflujo de POA .....	46
Tabla 10: Actividad de PZA y POA en MTB H37Rv bajo las condiciones de ATc+ y ATc- (A,B,C,D,E,F).....	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Flujograma de trabajo.....	16
Figura 2: Representación gráfica de la posición de los genes que codifican para las bombas de eflujo <i>Rv3756c</i> , <i>Rv1667c</i> y <i>Rv3008</i> . (Fuente: <a href="https://orca1.tamu.edu/mad/orthologs/pages/Rv3008.html">https://orca1.tamu.edu/mad/orthologs/pages/Rv3008.html</a> ).....	17
Figura 3: Digestión del plásmido pLJR965 por la enzima BsmBI.....	19
Figura 4: Proceso gráfico de inducción a CRISPRi.....	24
Figura 5: Proceso de obtención de sobrenadantes para su posterior aplicación en la técnica Wayne.....	30
Figura 6: Esquema de elaboración de la microplaca para los ensayos de TEMA. Fuente: elaboración propia.....	31
Figura 7: Electroforesis de agarosa al 0.8% con buffer TAE 1X del plásmido pLJR965 digerido. (1) Marcador 1kb plus DNA ladder, (2) Plásmido pLJR965 digerido con BsmBI (250 ng) y (3) Plásmido pLJR965 no digerido (250 ng).....	34
Figura 8: Clonación del sistema CRISPRi en <i>E. coli</i> NovaBlue. A. Control de auto-ligadura, B-D. <i>E. coli</i> NovaBlue pLJR965: <i>Rv3756c</i> , <i>Rv1667c</i> y <i>Rv3008</i> respectivamente. ....	34
Figura 9: Secuenciamiento de los plásmidos recombinantes. Comparación de las secuencias alineadas por el programa MEGA-X del ARN guía y el plásmido recombinante.....	35
Figura 10: Crecimiento de las colonias H37Rv transformadas con el plásmido pLJR965 con los ARNg específicos para cada gen en medio 7H10 con kanamicina. (1) Siembra en directo, (2) dilución 1/10 y (3) dilución 1/100. Nota: En el Anexo 3 se observa a mayor detalle las colonias seleccionadas con las cuales se realizaron los ensayos de CRISPRi. ....	36
Figura 11: Electroforesis en en 2% de agarosa en buffer TAE 1X de los productos de PCR. (1) Marcador de 100 pb (Invitrogen), (2) Control negativo (H37Rv/pLJR965), (3) <i>Rv3417</i> (control positivo de la clonación), (4) <i>Rv3756c</i> , (5) <i>Rv1667c</i> y (6) <i>Rv3008</i> .....	37
Figura 12: Electroforesis en 2% de agarosa en buffer TBE 1X con agua DEPC de 1 µg de ARN total de las cepas de MTB con el sistema CRISPRi. (1) Marcador de 100 pb; (1-3-5-7-9) Cepas tratadas con ATc, genes diana silenciados, (2-4-6-8-10) Cepas sin tratar con ATc, genes diana no silenciados, control. Y, se señalan los ARN ribosomales bacterianos 23S, 16S y 5S.....	38
Figura 13: Gráfico de dispersión para el cálculo de la eficiencia de los primers de qPCR. Nota: El eje Y del gráfico representa el número de ciclos de umbral (Ct) necesarios para detectar el ADN, mientras que el eje X muestra el logaritmo de la dilución de las muestras. ....	39
Figura 14: Niveles de ARNm relativo para cepas silenciadas en comparación de la cepa no silenciada .....	40

Figura 15. Silenciamiento de la expresión transcripcional de los genes silenciados en comparación de la cepa H37Rv/pLJR965 .....	41
Figura 16. LOG2FC para las cepas silenciadas en comparación de H37Rv/pLJR965...	42
Figura 17: Crecimiento de las cepas silenciadas (ATc+) y no silenciadas (ATc-) durante desde las 72 h – 144 h. Nota: En ambos casos, se realizaron 3 réplicas biológicas (RB) y se calculó el promedio por cada hora.....	44
Figura 18: Concentración extracelular de POA en cepas con silenciamiento y sin silenciamiento. A-D. Regresión lineal simple de la acumulación de POA en la cepa H37Rv/pLJR965, <i>Rv3756c</i> , <i>Rv1667c</i> y <i>Rv3008</i> en condiciones ATc+ y ATc. Nota: los valores de R <sup>2</sup> , p<0.05 entre ATc+ y ATc- están en la Tabla 9.....	45
Figura 19: Dinámica de la velocidad inicial de eflujo de POA en cepas con silenciamiento y sin silenciamiento. A-D. Regresión lineal simple de velocidad inicial de eflujo de POA en la cepa H37Rv/pLJR965, <i>Rv3756c</i> , <i>Rv1667c</i> y <i>Rv3008</i> en condiciones ATc+ y ATc-. Nota: los valores de R <sup>2</sup> , p<0.05 entre ATc+ y ATc-, pendiente y la ecuación de la recta se encuentran en la Tabla 10.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

**MTB:** *Mycobacterium tuberculosis*

**TB:** Tuberculosis

**H37Rv WT:** H37Rv *Wild Type*

***E. coli:*** *Escherichia coli*

**CRISPRi:** CRISPR de interferencia

**dCas9sth1:** dCas9 *Streptococcus thermophilus*

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**OD600:** Densidad óptica a 600 nm

**ARNg:** ARN guía

**pb:** Pares de bases

**MIC:** Concentración mínima inhibitoria

**TEMA:** Ensayo directo en microplacas de tetrazolium o “Direct tetrazolium microplate assay”

**PZA:** Pirazinamida

**EMB:** Etambutol

**INH:** Isoniacida

**RIF:** Rifampicina

**SM:** Estreptomina

**PZAsa:** Pirazinamidasas

**POA:** Ácido pirazinoico

**POAH:** Ácido pirazinoico protonado

**ATc:** Anhidrotetraciclina

**OADC:** Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa

**MDR:** Multidrogoresistente

**XDR:** Extremadamente resistente a drogas

## RESUMEN

*Mycobacterium tuberculosis* es el agente causante de la tuberculosis, enfermedad que provocó 1,8 millones de muertes en el 2023. La pirazinamida es un fármaco esencial que permite acortar el tratamiento de la tuberculosis a seis meses. Sin embargo, el aumento de cepas resistentes representa una amenaza para el control de la enfermedad. El principal mecanismo de resistencia a pirazinamida se atribuye a mutaciones en el gen *pncA*, que codifica la enzima pirazinamidasa, encargada de convertir pirazinamida en su forma activa, el ácido pirazinoico (POA).

Estudios recientes han sugerido que la velocidad de eflujo de POA también influye en la resistencia a pirazinamida. Se ha demostrado que la sobreexpresión de genes que codifican bombas de eflujo, como *Rv0191*, *Rv3756c*, *Rv3008* y *Rv1667c*, puede generar resistencia. Además, una mutación puntual (S292L) en la bomba *Rv1258c* incrementa el eflujo de POA y la resistencia a pirazinamida, efecto que puede revertirse mediante inhibidores como la piperina.

Este estudio evaluó el efecto del silenciamiento transcripcional individual de los genes *Rv3756c*, *Rv3008* y *Rv1667c* mediante CRISPRi en *M. tuberculosis*. Se analizó la velocidad de eflujo de POA utilizando la técnica de Wayne y la susceptibilidad a PZA mediante el ensayo “Tetrazolium Microplate Assay” (TEMA). Los resultados mostraron una reducción significativa en los niveles de expresión de *Rv3756c* y *Rv1667c*, aunque sin cambios en la velocidad de eflujo de POA ni en la susceptibilidad a pirazinamida, lo que sugiere la posible existencia de mecanismos compensatorios o redundantes en el sistema de eflujo.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, resistencia, pirazinamida, CRISPRi

## ABSTRACT

*Mycobacterium tuberculosis* is the causative agent of tuberculosis, a disease responsible for 1.8 million deaths in 2023. Pyrazinamide is an essential drug that shortens tuberculosis treatment to six months. However, the rise of drug-resistant strains poses a serious threat to disease control. The main mechanism of resistance to PZA is attributed to mutations in the *pncA* gene, which encodes the enzyme pyrazinamidase, responsible for converting pyrazinamide into its active form, pyrazinoic acid (POA).

Recent studies have suggested that POA efflux rate also plays a role in resistance to pyrazinamide. Overexpression of efflux pump genes such as *Rv0191*, *Rv3756c*, *Rv3008*, and *Rv1667c* has been shown to confer resistance. In addition, a point mutation (S292L) in the *Rv1258c* efflux pump increases POA efflux and pyrazinamide resistance, an effect that can be reversed using efflux pump inhibitors such as piperine. This study evaluated the effect of individual transcriptional silencing of the *Rv3756c*, *Rv3008*, and *Rv1667c* genes via CRISPR interference (CRISPRi) in *M. tuberculosis*. POA efflux rate was analyzed using the Wayne assay, and pyrazinamide susceptibility was assessed using the Tetrazolium Microplate Assay (TEMA). The results showed a significant reduction in the expression levels of *Rv3756c* and *Rv1667c*, although no changes were observed in POA efflux rate or pyrazinamide susceptibility. These findings suggest the possible existence of compensatory or redundant mechanisms within the efflux system.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, resistance, pyrazinamide, CRISPRi

## I. INTRODUCCIÓN

La bacteria o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) causa la enfermedad infectocontagiosa llamada tuberculosis (TB). En el año 2023 se diagnosticaron 10.8 millones de personas con TB, siendo la mayor cifra que se ha registrado en todos los años desde 1995 que la OMS comenzó a hacer el seguimiento a la enfermedad. Sin embargo, a comparación del año 2022, la cifra aumentó en 1 millón, lo cual indicaría que después de la pandemia del COVID-19, que generó un retraso en el diagnóstico en los centros de salud por la falta de acceso y tratamiento durante el estado de emergencia, se estaría estabilizando y disminuyendo las personas que se enferman (1).

La pirazinamida (PZA) es un componente fundamental del régimen terapéutico antituberculoso de primera línea debido a su capacidad única para eliminar bacilos latentes en condiciones ácidas, reduciendo significativamente la duración del tratamiento (2). Sin embargo, el entendimiento completo de su mecanismo de acción y de los determinantes moleculares de la resistencia sigue siendo limitado.

PZA es un profármaco que requiere conversión intracelular por la enzima pirazinamidasa (PZAsa) a su forma activa, el ácido pirazinoico (POA) (3). Tradicionalmente, las mutaciones en el gen *pncA* han sido consideradas el principal mecanismo de resistencia a PZA. No obstante, múltiples estudios recientes han evidenciado que esta explicación es insuficiente para comprender completamente la resistencia observada en cepas clínicas. Algunas de ellas presentan el gen *pncA* de tipo silvestre, con un bajo eflujo de POA, lo que ha redirigido la atención hacia otros mecanismos, particularmente los sistemas de eflujo bacteriano implicados en la expulsión activa de POA (4).

Las bombas de eflujo son componentes cruciales en la fisiología bacteriana y en la resistencia a diversos antibióticos, actuando como transportadores que reducen la concentración intracelular de fármacos (5). Estas bombas contribuyen a la resistencia mediante la extrusión activa de compuestos, entre ellos el POA, interfiriendo con su acumulación intracelular y, por tanto, con su eficacia. Investigaciones previas han demostrado que genes como *Rv0191*, *Rv1667c*, *Rv3008* y *Rv3756c* al ser sobreexpresados en la cepa H37Ra generó resistencia a PZA (6). Además, mutaciones

en genes como *Rv1258c* han mostrado afectar directamente la tasa de acumulación intracelular de POA, reforzando el papel central del sistema de eflujo en la resistencia a PZA (7).

Particularmente, en el estudio de Zimic y col. se ha observado que existe un rango de velocidad de eflujo de POA correlaciona con la susceptibilidad a PZA, mientras que una tasa elevada o muy baja, como en ciertas cepas resistentes, se asocia con una menor eficacia del fármaco (4). Esto sugiere que la medición del eflujo de POA podría constituir un biomarcador funcional de resistencia y un objetivo terapéutico relevante.

En este contexto, se resalta la importancia de estudiar genes codificantes de bombas de eflujo de POA en el mecanismo de resistencia a PZA. El desarrollo de herramientas genéticas de alta precisión, como la interferencia de CRISPR (CRISPRi), ha permitido una manipulación específica y regulada de la expresión génica en micobacterias (8). La tecnología CRISPRi, utiliza una nucleasa mutada (dCas9) acoplada a ARN guías específicos, que permite silenciar transcripcionalmente genes objetivo sin introducir deleciones permanentes, ofreciendo una vía ideal para analizar la contribución funcional de genes individuales a procesos como el eflujo de antibióticos (8).

Por ello, esta tesis se centra en evaluar el impacto del silenciamiento génico individual dirigido por CRISPRi de los genes *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008*, previamente asociados a mecanismos de eflujo de POA, en la resistencia a PZA en *M. tuberculosis*. Se propone como una estrategia innovadora para profundizar en la comprensión del mecanismo de acción de la PZA, así como en las vías alternativas de resistencia, con el potencial de aportar nuevas bases para el diseño de terapias más efectivas contra TB farmacorresistente.

## **1.1. Antecedentes generales**

### **1.1.1. Características de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* y niveles de clasificación de resistencia**

Las micobacterias son bacilos alcohol ácidos resistentes con un tamaño de 0.2-0.7x 1-10 micras ( $\mu\text{m}$ ), presentan un crecimiento lento por lo que requieren de 10 a 20 días para proliferar a 37°C en condiciones óptimas (9). Esta bacteria se transmite vía aérea

cuando la persona expulsa las bacterias de los pulmones o de la garganta al toser, estornudar o escupir (10).

Los fármacos que se usan para tratar a la TB se diferencian en su actividad bactericida (11). La bacteria puede encontrarse en dos estados: activa o latente, es decir, cuando la persona se encuentra asintomática pero aun así albergar bacterias que pueden activarse cuando el hospedador baje sus defensas (12). Para poder eliminar a las bacterias en estado latente, se usa la PZA, una prodroga de primera línea, sin embargo, existen cepas clínicas que han mostrado resistencia a este fármaco y ello ha generado una preocupación en la salud pública (2). La definición de TB resistente a medicamentos (TB DR) según la Organización Panamericana de la Salud es de la siguiente manera: Multidrogoresistente (TB MDR), resistente a isoniacida y rifampicina o drogas de primera línea, y TB extensamente resistente (TB XDR), es una cepa MDR resistente a fluoroquinolonas e inyectables de segunda línea (kanamicina, capreomicina, etc) (13).

### **1.1.2. Mecanismo de acción de pirazinamida en *M. tuberculosis***

Zhang et. al plantearon un modelo de acción de la PZA en la que el pH ácido del medio extracelular permite la actividad bactericida de POA (3). El ingreso de PZA a MTB es por difusión pasiva; dentro de la micobacteria, la PZA es hidrolizada en ácido pirazinoido (POA) por la enzima pirazinamidasa (PZA<sub>sa</sub>), que es una amidasa micobacteriana y es codificada por el gen *pncA*. El POA es la forma activa de la droga y a través de las bombas de eflujo, el POA<sup>-</sup> es expulsado al medio extracelular. En un medio extracelular ácido el POA se protona formando el HPOA, para que luego reingrese a la bacteria y se desprotona, generando una acumulación de H<sup>+</sup> en el interior de MTB. La acumulación de H<sup>+</sup> desequilibra el potencial de membrana de la bacteria y el citoplasma se acidifica, finalmente la bacteria muere (3).

Peterson et. al encontraron que el pH ácido no es la única condición en la que la PZA tiene actividad bactericida; mostraron que la sobreexpresión de la enzima PZA<sub>sa</sub> en condiciones neutras y alcalinas y la limitación de nutrientes a un pH neutro generan actividad bactericida de la PZA. Asimismo, demostró que POA no altera significativamente el potencial de membrana en pH ácido lo que indica que la forma activa de POA no funciona como un protonóforo robusto en este contexto (14).

### **1.1.3. Resistencia a pirazinamida en *M. tuberculosis***

La resistencia a PZA se le atribuye en un 70% a las mutaciones del gen *pncA* (2), y el 30% se le atribuye a otras posibles causas como blancos de unión de PZA y POA dentro de MTB o mutaciones en las bombas de eflujo. En el estudio de Stoffels K. et al 2012 (15), se registró una alta frecuencia de ausencia de mutaciones en *pncA* relacionada con la resistencia a la PZA en pH 6,0. dando una idea sobre mecanismos alternativos de resistencia. Aproximadamente el 43% de los aislados clínicos de TB-MDR mostraron resistencia a la PZA. Además, detectaron ocho nuevas sustituciones en *pncA*, de las cuales algunas no resultaron en resistencia. Esto destaca la complejidad de correlacionar todas las mutaciones de *pncA* con el fenotipo de resistencia a la PZA; sin embargo, se necesitan más estudios para mejorar la evaluación de la susceptibilidad de *pncA* a través de enfoques más precisos con base molecular y fenotípicos, especialmente considerando la desestabilización de proteínas como un posible mecanismo (2).

Por otro lado, se ha encontrado que PZA puede unirse al ácido graso sintasa I (FasI), y POA puede unirse a *panD* y en algún momento se encontró que podía unirse a la proteína ribosomal (RpsA) (16); sin embargo, Dillon et al., 2017 y Vallejos et al., 2020; confirmaron lo contrario; por lo que no hay relación de las mutaciones en el gen *RpsA* con la resistencia a PZA (17,18).

#### **1.1.3.1. Mutaciones en el gen *pncA***

El principal mecanismo de resistencia a PZA es la presencia de mutaciones en el gen *pncA*. Hirano y col. (19), constataron que las mutaciones en el gen *pncA*, en la región del marco de lectura abierto en la posición 561 bp o en la región flanqueante 82 bp, es el responsable de generar la resistencia a PZA en un 70 a 97%, sobre todo en los sitios activos de PZAsa como Asp8, Ile133, Ala134 y Cys138 (20). Otro efecto, son las mutaciones R123P, T76P, G150A y H71R que alteran el volumen del sitio de unión y afectan la complementariedad de forma entre la PZA y la PZAsa (21).

En ese sentido, un estudio reveló una alta frecuencia de mutagénesis hacia la resistencia a PZA en pH 6.0 ( $10^{-5}$  UFC/ml), con un 12% de los mutantes sin mutaciones en *pncA*, sugiriendo mecanismos alternativos de resistencia. Además, el 43% de los aislados de TB-MDR también fueron resistentes a PZA, y se identificaron

ocho nuevas sustituciones en *pncA*. La desestabilización proteica podría explicar algunos patrones de resistencia, y se requiere más investigación para correlacionar mutaciones de *pncA* con el fenotipo resistente y mejorar las pruebas de susceptibilidad molecular (15).

### **1.1.3.2. Inhibición de la sintasa de ácidos grasos tipo I (FASI)**

El análogo de la PZA llamado 5-Cloropirazinamida (5-Cl-PZA) mostró una amplia actividad contra MTB y resistencia en *M.smegmatis* (MSMEG). Los resultados sugieren que la 5-Cl-PZA y la PZA inhiben a la enzima sintasa de ácido graso I (FASI) en MTB, dado que los compuestos compiten o actúan como sustitutos de NADPH en su sitio de unión a FASI (22). De la misma manera, los resultados del estudio revelaron que el aumento en la expresión de la PZAsa de MSMEG confiere resistencia al 5-Cl PZA y, al mismo tiempo, susceptibilidad a la PZA en MTB y *M. bovis*. Este hallazgo fue significativo, ya que esto demuestra la especificidad de PZA a MTB-PZAsa lo cual la hace susceptible y en contraste, MSMEG-PZAsa, que no se une a PZA, genera resistencia. (23)

### **1.1.3.3. Bloqueo de la síntesis de coenzima A por parte de ácido pirazinoico**

Se han realizado estudios que han identificado una relación clave entre la PZA y la enzima l-aspartato descarboxilasa, codificada por el gen *panD* (*Rv3601c*) en MTB. En estos estudios, se aislaron cepas resistentes a la PZA y se encontraron mutaciones en el gen *pncA* en la mayoría de ellas. Sin embargo, algunas cepas que tenían el gen *pncA* de tipo salvaje y eran resistentes a la PZA, se sometieron a un análisis más detallado del genoma, lo que reveló mutaciones en el gen *panD* (2). El gen *panD* es responsable de la síntesis de l-β-alanina, necesaria para la vía biosintética de la coenzima A (CoA), la cual es importante para el ciclo de Krebs o oxidación de ácidos grasos. En el estudio de Gopal, 2017 (24), muestran datos de metabolómica que revelan que el ácido pirazinoico (POA) interrumpe la vía de biosíntesis de la coenzima A al bloquear el paso catalizado por la aspartato descarboxilasa *panD*, lo que sugiere que *panD* es el objetivo directo de POA. Los experimentos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) demuestran que POA se une a la proteína *panD* de tipo salvaje con una afinidad significativa, mientras que el profármaco PZA no muestra tal interacción. Además, mutaciones en *panD* que confieren resistencia a POA abolen

la unión de POA a *panD*, respaldando la idea de que la inhibición de la biosíntesis de coenzima A es el mecanismo de acción de PZA/POA (24).

#### **1.1.3.4. Resistencia a pirazinamida a través de las bombas de eflujo**

Cuatro bombas de eflujo *Rv0191c*, *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* que específicamente se unieron a POA fueron identificadas mediante un microarray de proteoma en el estudio de Zhang; posteriormente, la sobreexpresión de estas bombas, fueron asociadas a la resistencia a PZA y a POA (6). Asimismo, se mostró que mutaciones puntuales (S292L y V219A) en la bomba *Rv1258c* (también conocida como Tap o P55) en aislados clínicos de MTB de cepa H37Ra estaban relacionadas con la resistencia a isoniacida (INH), pirazinamida (PZA) y estreptomina (SM) (7).

La sobreexpresión de estos genes en MTB demostró causar una alta resistencia a la PZA y POA, sin afectar la resistencia a otros fármacos antituberculosos, (PZA MIC > 200 µg/ml y POA a 25 µg/ml). Además, se observó que la adición de inhibidores de bombas de flujo como reserpina, piperina y verapamilo aumentaba la susceptibilidad a la PZA en las cepas con sobreexpresión de los genes mencionados. La resistencia solo fue para PZA y no para otros medicamentos de primera línea como isoniazida y etambutol o medicamentos de segunda línea como estreptomina, amikacina, etc (6). Esta resistencia también pudo ser conferida por mutaciones en codones de otros genes como el gen *Rv0191* el cual contó con mutaciones no sinónimas en el codón 213 (GCT/ACT) y mutaciones sinónimas en el codón 66 (GCC/GCT), el gen *Rv3756c* en el codón 78 (GTT/GTG) y el gen *Rv1667c* en el codón 136 (CCG/CCT). Este último tipo de mutación, de acuerdo a los resultados, no generó algún efecto en los aminoácidos de las proteínas sin embargo otros estudios sí están relacionadas a la carcinogénesis. (6)

El gen *Rv1258c*, la mutación S292L en *Rv1258c* causó una alta resistencia a la INH y a PZA, mientras que la mutación V219A causó una resistencia más baja a estos medicamentos (7). La resistencia a la PZA también se asoció con una disminución en la acumulación de POA, en las cepas mutantes. Además, se demostró que el inhibidor de la bomba de eflujo piperina pudo reducir la resistencia a la INH y la PZA en la cepa mutante *Rv1258c* - S292L, lo que sugiere que esta resistencia está relacionada con una mayor actividad de eflujo de la proteína mutante *Rv1258c*.

Por otro lado, en *M. tuberculosis* H37Rv, se identificaron los genes *Rv0191* y *Rv1258c* como factores clave en la resistencia a la PZA, debido a su rol en el eflujo del POA. A través de la deleción génica empleando ORBIT y el silenciamiento individual mediante CRISPRi, se evidenció una reducción significativa en la concentración acumulada y la velocidad de eflujo de POA. En cepas delecionadas para *Rv1258c*, la concentración de POA se redujo hasta 1.03 mM a las 140 horas, comparado con 1.95 mM de la cepa control, mientras que la velocidad de eflujo disminuyó a 0.0059 mM/OD600 x h, lo que representó una reducción del 58.4%. En el caso del silenciamiento génico individual por CRISPRi, la velocidad de eflujo de POA en *Rv1258c* disminuyó un 65.4%, con una velocidad de 0.0049 mM/OD600 x h. Sin embargo, para las cepas modificadas por ORBIT, se mostró un incremento de la resistencia a PZA, siendo capaces de crecer en concentraciones de hasta 1600 µg/ml de PZA (25). Estos resultados sugieren que la alteración en la concentración y velocidad del eflujo de POA en las bombas de eflujo (*Rv0191* y *Rv1258c*) juega un papel crucial en la resistencia a PZA (25).

En el estudio de Zimic y col. (4) se investigó la resistencia a PZA en cepas de MTB y *M. smegmatis*, revelando que la velocidad de expulsión de POA desempeña un papel crucial. Se encontró que las cepas susceptibles a la PZA mantienen tasas específicas de expulsión de POA, mientras que las cepas resistentes mostraban tasas más bajas, independientemente de la actividad de la enzima PZAsa. Esto sugiere que la resistencia a la PZA no se debe solo a mutaciones en el gen *pncA* o la actividad de PZAsa, sino también a la velocidad de expulsión de POA. Los resultados mostraron que tanto las cepas sin mutaciones en *pncA* presentaban un bajo flujo de POA, a pesar de no presentar mutaciones en otros genes (4). Los dos estudios analizan la resistencia a PZA en MTB, y sus hallazgos parecen complementarse en ciertos aspectos.

#### **1.1.4. Bombas de eflujo**

En este estudio, se están evaluando a las bombas *Rv3756c* y *Rv1667c* que pertenecen a la familia ABC (glicina betaína/carnitina/colina/L-prolina ABC permeasa transportadora), y a la bomba *Rv3008* que es una proteína de membrana no caracterizada YhiD, implicada en resistencia a los ácidos (Mycobrowse: <https://mycobrowser.epfl.ch/>).

Las bombas de eflujo son proteínas que permiten el intercambio de sustancias tóxicas, nutrientes y mantienen la homeostasis en los microorganismos procariotas y eucariotas (5). Cinco familias universales de expulsión de fármacos identificadas son: La superfamilia de unión a ATP (ABC), la superfamilia de facilitadores principales (MFS), la familia de extrusión de compuestos tóxicos y multidrogas (MATE), la familia de resistencia a multidrogas pequeña (SMR) y la superfamilia de resistencia modulada (RND), y una familia específica de eucariotas (MET), las cuales desempeñan un papel crucial en estos procesos de expulsión de drogas (26). Asimismo, las bombas de eflujo fueron clasificadas como transportadores (TC system) basado en la función y la filogenia. El estudio de las bombas de eflujo mostró una brecha importante en la comprensión de los procesos de expulsión (efflux) en comparación con los de captación (uptake) en los sistemas de transporte. Solo unas pocas familias de transportadores han sido identificadas como catalizadoras de la expulsión de fármacos; los esfuerzos para comprender la resistencia a múltiples fármacos se han centrado en miembros de las superfamilias MFS y ABC (26).

Estos transportadores se dividen en importadores y exportadores según la dirección del transporte de los sustratos. Los importadores, presentes solo en procariotas, captan moléculas extracelulares y se asocian con una proteína de unión al sustrato (SBP), que se encuentra en el periplasma de bacterias Gram-negativas o anclada en la membrana de Gram-positivas. Los exportadores, presentes tanto en procariotas como en eucariotas, transportan moléculas fuera del citoplasma como proteínas, antibióticos y polisacáridos (27).

En ese sentido, el transporte de sustratos puede ser específico o variado en cuanto a las sustancias químicas que pasan a través de ella, es por eso que existe el problema de *Multiple Drug Resistance* (MDR) el cual hace menos susceptible a la bacteria a los tratamientos que se hacen con los diferentes antibióticos, ya que puede expulsar distintos fármacos a través de una sola bomba (26).

En otro estudio, se evaluó la expresión de los genes que codifican las bombas de eflujo pertenecientes a las familias MFS, ABC y RND en cepas H37Rv de MTB expuestas a diferentes concentraciones de fármacos como INH, EMB, RIF y SM. Se observó que las bombas de eflujo responden de manera distinta según la concentración subinhibitoria a la que se enfrentan o el gen se sobreexpresa en respuesta a más de un

fármaco (28). Por esa razón, evaluar el efecto de la velocidad de eflujo del ácido pirazinoico (POA) ayudaría a comprender la susceptibilidad de MTB, que como se ha descrito, puede depender de los siguientes factores: Actividad de la PZAsa, la concentración intracelular de PZAsa y la eficiencia de la bomba de expulsión (4).

#### **1.1.5. Relación entre el eflujo de POA y aumento de resistencia a PZA**

En el estudio de Zhang., se resalta la importancia de la sobreexpresión de los genes como causantes de la resistencia a PZA en MTB (6). Y, en el estudio de Zimic y col. se centra en la velocidad de expulsión de POA en las cepas de MTB, señalando que las cepas susceptibles a PZA mantienen rangos de tasas de eflujo específicas de expulsión de POA, mientras que las resistentes tienen velocidades muy altas o bajas (4). Si se confirma que la baja velocidad de expulsión del POA es un factor clave en la resistencia, esto podría proporcionar una comprensión más profunda del mecanismo de acción de la PZA en MTB, lo que a su vez podría llevar al desarrollo de terapias específicas para abordar esta enfermedad. Por consiguiente, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué efecto genera el silenciamiento génico transcripcional individual de los genes *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* que codifican para bombas de eflujo involucradas en la resistencia a PZA sobre la velocidad de eflujo de ácido pirazinoico (POA) en *M. tuberculosis*?

#### **1.1.6. Tecnología CRISPR/cas – CRISPRi**

Las siglas CRISPR corresponde a repeticiones palindrómicas agrupadas regularmente interespaciadas de un tamaño de 21 a 47 pares de bases presentes en el genoma de las bacterias y arqueas (29). Este sistema CRISPR/Cas es un método inmune adaptativo que permite a los microorganismos defenderse de los ataques de patógenos. Por ejemplo, cuando una bacteria sobrevive del ataque de un virus, esta llega a guardar en su genoma información genómica del virus, de tal manera que, si vuelve a atacar, la información ya guardada le permitirá eliminar al virus (30). Debido a que las regiones flanqueantes codifican proteínas asociadas a CRISPR (cas) entonces se llegan a transcribir pequeños ARN de CRISPR (crRNA) y un complementario parcial trans-acting RNA (tra crRNA) que permiten tener la inmunidad a bacteriófagos por el mecanismo que hay entre los espaciadores y los fagos objetivos (31). De esa manera, se hace uso de esta tecnología en *Staphylococcus epidermidis* y en *E. coli* que les permitió generar un complejo con los crRNA generados y la proteína Cas,

para evitar la proliferación de fagos (30). El sistema de CRISPR de interferencia (CRISPR), permite el silenciamiento individual de genes de MTB, debido a dos mutaciones, en los dominios nucleasa HNH y RuvC, que presenta su enzima dCas9 derivada de *Streptococcus thermophilus* (8). Ya que en CRISPR convencional se hace uso de la enzima Cas9, derivada de *S. pyogenes*, la cual tiene actividad nucleasa y toxicidad en *Mycobacterium smegmatis* y *M. Tuberculosis*. En cambio, dCas9 no presenta dichas condiciones y se une al ARNg para después unirse a la secuencia de ADN objetivo. La especificidad a la que se una dCas9 con ARNg dependerá del motivo adyacente de protoespaciador (PAM) el cual está dentro del ADN diana. Esta secuencia PAM es de 2 a 8 nucleótidos aguas abajo de la secuencia objetivo de sgRNA (8).

#### **1.1.7. Uso de las técnicas de Wayne para detectar concentración de POA**

La resistencia a PZA no es determinada a través de las pruebas microbiológicas (DST) convencionales debido al requerimiento de pH ácidos y de pruebas moleculares debido a la variabilidad genética del gen *pncA* (32). La prueba clásica de Wayne es un método colorimétrico y económico para detectar la presencia de POA en el medio de cultivo de TB. La técnica se basa en la reacción que genera el sulfato de amonio ferroso (SAF) al unirse a POA, y generar un cambio en la intensidad del color rojo de acuerdo a la concentración de POA. Si se trata de una cepa susceptible como H37Rv, se observará un aumento en la intensidad del color rojo al pasar los días, caso contrario, una actividad negativa indica generalmente resistencia a PZA (7).

La prueba clásica de Wayne, aunque económica, presenta sensibilidad variable (75,6% a 95,7%) y especificidad (88,7% a 97%), dependiendo de la concentración de POA. Para mejorar estos aspectos, se desarrolló una variante cuantitativa de Wayne y la prueba MODS-Wayne, que a 800 µg/ml de PZA mostró una sensibilidad del 92% y una especificidad del 99,3%. MODS-Wayne permite discriminar eficazmente entre cepas resistentes y susceptibles a PZA, especialmente en aislados con actividad débil positiva, mientras que la prueba Wayne cuantitativa logró una sensibilidad superior al 96% en concentraciones de 400 y 800 µg/ml (32, 33).

### 1.1.8. Uso de TEMA para detectar resistencia a pirazinamida

El método TEMA (Tetrazolium Microplate Assay) es una alternativa que permite detectar la mínima concentración inhibitoria (MIC) a diferentes drogas en cepas clínicas, además, es más económica y fácil de leer que MABA (Microplate Alamar Blue assay) para determinar la susceptibilidad antibiótica en MTB (34). La concentración mínima inhibitoria (MIC) se detecta observando los cambios de color en las microplacas tras la incubación de 5 días a 37°C, proporcionando un método rápido y rentable para la detección de cepas resistentes (34). El MIC se calcula por el cambio de color morado a amarillo y según reportes previos para determinar la susceptibilidad de la cepa es 100 *ug/ml* para PZA a pH de 6 (35) y 100 *ug/ml* para POA (36).

Esta técnica se basa en el cambio de color del bromuro de tetrazolio [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difenil-tetrazolio] (MTT) a púrpura cuando es reducido por bacterias viables (37). La reducción de MTT en las células ocurre principalmente en vesículas intracelulares, como los endosomas y lisosomas, mediante la endocitosis. El MTT no es permeable a la membrana plasmática, por lo que se internaliza a través de la endocitosis y se reduce por la acción de una oxidasa de flavina sensible a NEM (N-Etilmaleimida), que se utiliza comúnmente para inhibir oxidoreductasas y otras enzimas que contienen grupos tiol. Una vez reducido, el formazán se acumula en vesículas y es exocitado a la superficie celular, formando cristales en forma de aguja. Este proceso de reducción está influenciado por factores como la disponibilidad de NADH, ATP; por ejemplo, NADH es un cofactor clave en las reacciones de reducción-oxidación (redox) que ocurre dentro de las células, proporcionando los electrones necesarios para reducir el MTT a formazán. Por otra parte, el ATP es fundamental para procesos energéticos como la endocitosis, que es el mecanismo mediante el cual el MTT ingresa a las vesículas intracelulares donde se lleva a cabo su reducción (37).

## II. PREGUNTA

¿Qué efecto genera el silenciamiento transcripcional individual de los genes *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* que codifican para bombas de eflujo involucradas

en la resistencia a pirazinamida (PZA) sobre la velocidad de eflujo de ácido pirazinoico (POA) y su susceptibilidad a PZA de *M.tuberculosis*?

### **III. HIPÓTESIS**

La disminución de la expresión transcripcional de los genes *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* que codifican para bombas de eflujo disminuirán la velocidad de eflujo de POA y ello aumentará la resistencia a PZA.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo Principal**

- Determinar el efecto del silenciamiento génico transcripcional individual mediante CRISPRi en los genes que codifican bombas de eflujo para *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* en el eflujo de POA y la susceptibilidad a PZA en *M. tuberculosis*.

#### **4.2. Objetivos Específicos**

- Determinar el nivel del silenciamiento transcripcional individual de los genes *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* mediante método *Livak*.
- Evaluar el efecto del silenciamiento transcripcional individual de los genes *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv
- Evaluar el efecto del silenciamiento transcripcional individual de los genes *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* en la velocidad de eflujo del ácido pirazinoico mediante la técnica Wayne.
- Evaluar el efecto del silenciamiento transcripcional individual de los genes *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* en la susceptibilidad a PZA y POA mediante TEMA.

### **V. METODOLOGÍA**

#### **5.1. Tipo de estudio**

Estudio de carácter exploratorio y correlacional, con un enfoque experimental y analítico.

## **5.2. Aspectos éticos**

Proyecto aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Número de registro: CAR-DUARI-351-23

## **5.3. Área de estudio**

Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular que pertenece a los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), de la Facultad de Ciencias e Ingeniería (FACI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Laboratorio de Micobacterias (Área de bioseguridad P3) LID.

## **5.4. Material biológico**

El material biológico usado en el presente proyecto de investigación es la cepa de *M. tuberculosis*. Las cepas bacterianas provienen de “American Type Culture Collection” (ATCC) H37Rv - 27294 y los plásmidos provienen de donación del “Laboratory of Host-Pathogen Biology” del Dr. Jeremy Rock. Los reactivos empleados en esta investigación no representan ningún riesgo para la salud de las personas ni para el medio ambiente. La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (riesgo nivel 3) se manipularon siguiendo estrictos protocolos de bioseguridad nivel 3, los cuales incluyen capacitación y aprobación de un examen por parte del responsable del área de cultivo.

- Las cepas fueron guardadas en la congeladora de -70°C.

En el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular se realizó la primera y última parte del proyecto, donde no se trabaja con agentes biológicos de riesgo. Y en el área de Mycobacterium que comprende de 2 ambientes:

- Ambiente exterior o área limpia, donde NO se manipula ni procesa material biológico.
- Ambiente aislado o ambiente de bioseguridad P3, el cual está equipado adecuadamente para manipular material biológico (Anexo 1).

## **5.5. Procedimiento experimental**

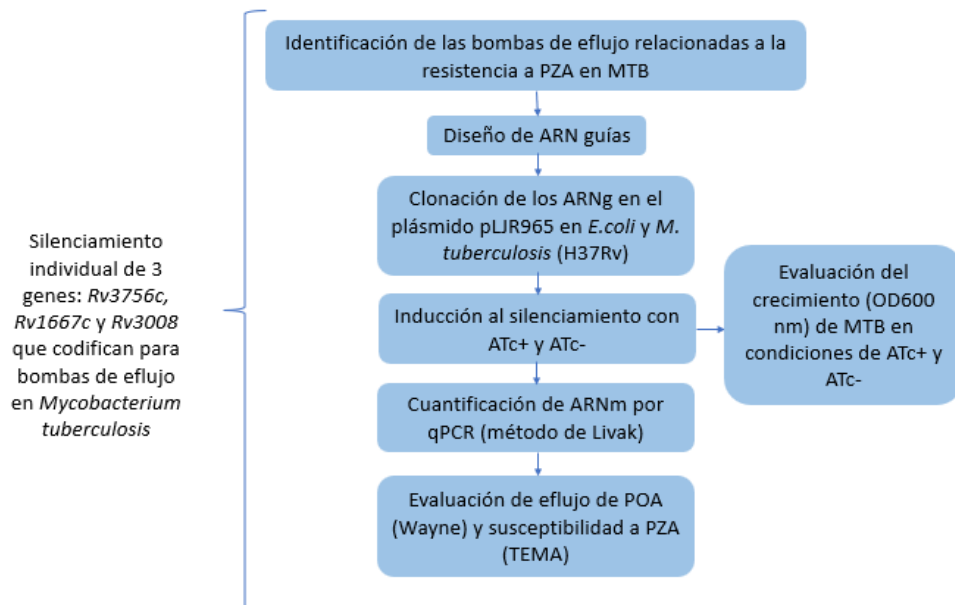
### **5.5.1. Diseño del estudio**

Se trabajó con los genes (*Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008*) que codifican para bombas de eflujo en MTB, que, según reportes previos, se han visto relacionadas a la

resistencia de PZA. A cada gen se le realizó **silenciamiento de manera individual**. Como control negativo se usó la cepa de MTB H37Rv con el plásmido pLJR965 (H37Rv/pLJR965), sin ARN guía (ARNg), por lo que no flanqueó a ningún gen.

Mediante el silenciamiento génico a través de CRISPRi, se evaluó la velocidad de flujo de POA (Wayne) a las cepas H37Rv *Wild Type* que portan el plásmido y el ARN guía que flanquea al gen diana: pLJR965:*Rv3756c*, pLJR965:*Rv1667c* y pLJR965:*Rv3008* en las condiciones silenciadas (ATc+) y sin silenciamiento (ATc-).

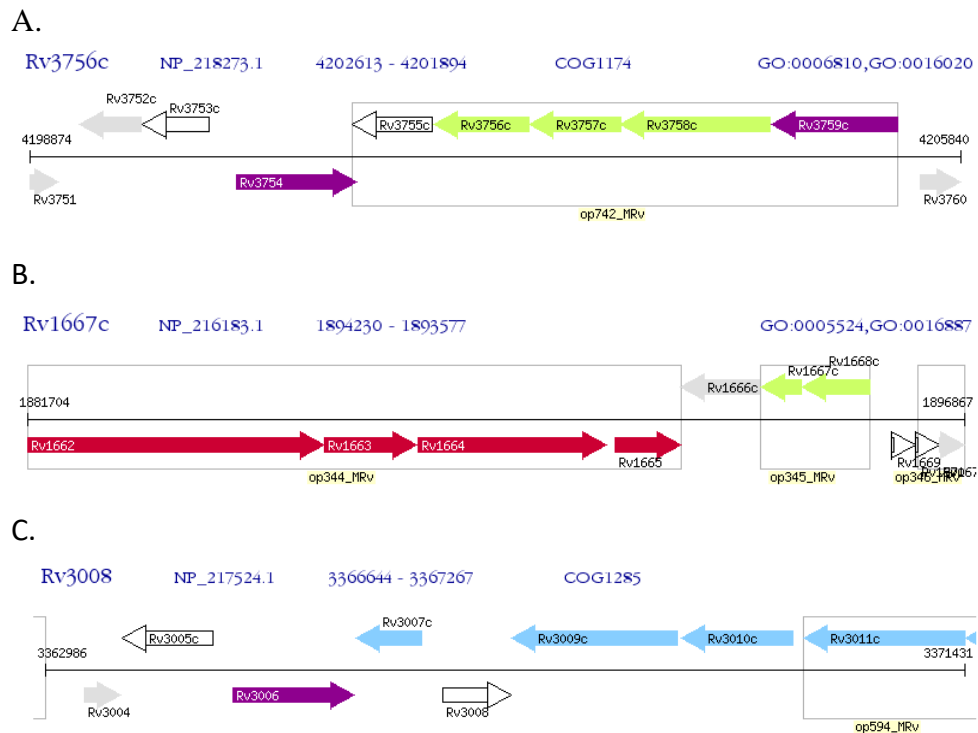
Finalmente, se realizó la prueba de susceptibilidad a PZA (TEMA) en microplacas de 96 pocillos, bajo las dos condiciones ATc+ y ATc-, para las diferentes cepas de MTB, cepa H37Rv *Wild Type* (pH=6.2 y 6.8), H37Rv/pLJR965 y a las cepas que portan pLJR965:*Rv3756c*, pLJR965:*Rv1667c* y pLJR965:*Rv3008* (pH=6.2). Para todos los ensayos se realizaron 3 réplicas biológicas con 3 ensayos en cada réplica (Ver figura 1).



**Figura 1:** Flujograma de trabajo

### 5.5.2. Elección de genes que codifican para bombas de eflujo implicados en la resistencia a pirazinamida en *M. tuberculosis*

En estudios previos de Flores. 2024, identificó a los genes que codifican a las bombas de eflujo involucrados a la resistencia de PZA usando los datos de *Mycobrowser* (<https://mycobrowser.epfl.ch/>); además de seleccionar las bombas de eflujo basadas en literaturas previas (25). La ubicación de los genes diana del presente estudio en el genoma de MTB se muestra en la Figura 2.



**Figura 2:** Representación gráfica de la posición de los genes que codifican para las bombas de eflujo *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008*. (Fuente: <https://orca1.tamu.edu/mad/orthologs/pages/Rv3008.html> )

### 5.5.3. Clonación de un ARN guía (ARNg) en el plásmido pLJR965

#### 5.5.3.1. Diseño de cebadores del ARNg en genes blancos

La selección de cebadores para el diseño de ARN guía (ARNg), se realizó usando un software de la Universidad de Rockefeller (<https://pebble.rockefeller.edu/tools/sgRNA-design/>) la cual cuenta con un banco de secuencias de ARNg ordenadas de acuerdo a la fuerza de unión que tienen con la secuencia diana en base a la longitud de su secuencia, el contenido de guanina y citosina (%GC) y una secuencia corta de 2 a 6 pb llamada “motivo adyacente del proto-espaciador” (PAM). Los ARNg que presentaban una fuerza predictiva

(*predicted\_strength*) cercana a 1 (0= fuerza débil y 1 = fuerte) fueron elegidos, además se obtuvieron valores del logaritmo de cambio de pliegue (LOG2FC) y el índice de vulnerabilidad (35).

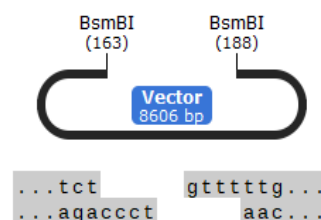
La secuencia de nucleótidos del ARNg obtenida fue sintetizada para su posterior clonación en el vector de clonación pLJR965, que cuenta con el marcador resistente a kanamicina. Los cebadores contienen regiones de reconocimiento para la enzima de restricción *BsmBI* (NEB) en el extremo 5'; los cebadores directos contienen la secuencia GGGA, y los cebadores reversos contienen la secuencia AAAC cebadores contienen a estas secuencias en el extremo 5'.

### 5.5.3.2. Hibridación de oligonucleótidos del ARNg

Se homogenizó un volumen de 2µl (100 µM) de cada cebador con 46 µl de buffer de hibridación (50 mM de TRIS pH 7.5, 50 mM NaCl y 1mM de EDTA). La hibridización se realizó a 96°C por 2 minutos, disminuyendo su temperatura a 25°C a una tasa de 0.1°C/segundo.

### 5.5.3.3. Digestión y ligación del plásmido pLJR965 con la endonucleasa de restricción *BsmBI*

Un microgramo del vector pLJR965 fue digerido con 10 U de enzima *BsmBI* (NEB: 10U/µl) en 1X de buffer 3.1 (NEB:10X) y agua PCR en un volumen de 50 µl, a 55°C por 12 horas. Cabe destacar que el plásmido no se incubó con fosfatasa alcalina (1U/µl) a 37°C por un tiempo de 30 minutos, que evita o disminuye la cantidad de plásmidos autoligados, ya que las secciones en que corta la enzima *BsmBI* no son complementarios (Figura 3). Para comprobar la presencia del plásmido linealizado, se realizó electroforesis durante 1 hora a 96V en gel de agarosa (0.8%) con *SYBR safe DNA gel stain* (1X). El plásmido linealizado fue purificado con el kit Zymoclean gel DNA recovery kit.



### **Figura 3:** Digestión del plásmido pLJR965 por la enzima BsmBI

Los oligonucleótidos hibridados de ARNg, fueron diluidos 1:100 en agua PCR para luego ligarlos con el plásmido pLJR965 digerido a 16°C por 16 horas.

#### **5.5.4. Transformación del producto ligado en *Escherichia coli***

##### **5.5.4.1. Preparación de células competentes *E. coli* Novablue**

Para la preparación de células competentes se empleó una colonia de la cepa *E. coli* (Nova blue) a partir de una placa de Luria Bertani (LB) -agar, Miller (HIMEDIA) con tetraciclina 10 µg/ml y se prosiguió con la técnica de cloruro de calcio, para preparar células competentes siguiendo el protocolo de Sambrook et al. (38). Finalmente, se prepararon alícuotas de 50 µl de la suspensión, en tubos de 1.5 ml, los cuales se almacenaron en gradillas con alcohol y se congelaron a -70°C para su conservación a largo plazo.

##### **5.5.4.2. Transformación química en *E. coli* Novablue competentes**

Cincuenta µl de células competentes de *E. coli* novablue fueron transformadas con 5 µl del producto ligado mediante shock térmico. Para el control negativo se usó 50 µl de células competentes y se transformó con 5 µl del plásmido pLJR965. Y como control de plásmidos autoligados, se usó 50 µl de células competentes con 5 µl del plásmido digerido pLJR965.

La mezcla fue incubada 30 minutos en hielo, luego en un baño maría a 42°C por 1 minuto; se retiró y se dejó en hielo por 2 minutos, donde inmediatamente se le agregó 1 ml de medio SOC (Super Optimal Broth + Catabolic repressor). Estos tubos fueron incubados durante 1 hora a 37°C en agitación y centrifugados a 3500 g por 5 minutos. El sedimento fue resuspendido con 100 µl de medio SOC y 100 µl fue sembrado en medio agar LB con kanamicina (40 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml) de manera directa con ayuda del asa Driglasky; finalmente, se incubó entre 16 y 18 horas a 37°C.

A 3 colonias se les extrajo el plásmido con el kit ZymoPureT, Plasmid miniprep (Zymo Research). La presencia de las secuencias ARNg en el plásmido fue verificado mediante el secuenciamiento de nanopore GridION (GRD - X5B003).

Los datos fueron analizados con el software MEGA y Snapgene. Estos plásmidos recombinantes fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% durante 55 minutos a 90 V.

#### **5.5.5. Transformación en *M. tuberculosis***

Una colonia de MTB H37Rv fue inoculada en 5 mL de caldo 7H9 con 0.2% de glicerol, enriquecido con 10% de OADC (Ácido oleico, Albúmina, Dextrosa y Catalasa) y Tween 80 al 0.05%. La mezcla se sometió a vórtex y se incubó a 37°C durante 10 a 15 días, hasta alcanzar una densidad óptica (OD) en el rango de 0.8 a 1. Posteriormente, 2 mL del cultivo inicial fue transferido a 50 mL de caldo 7H9-OADC y Tween 80 en un matraz de 250 mL hasta llegar a un OD entre 0.12 y 0.15. Este medio fue controlado por 24 horas para verificar la ausencia de contaminación. El cultivo fue incubado a 37°C y 100 rpm en el shaker hasta lograr un OD<sub>600</sub> de 0.6 a 0.8; luego se añadió 5 ml de glicina 2M en una proporción de 0.1 volúmenes. Los micobacterios fueron incubados de 16 a 24 horas y cosechados mediante centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 17°C. Las células fueron lavadas dos veces con 30 mL de glicerol al 10% a temperatura ambiente seguido de una centrifugación entre cada lavado. Las células se resuspendieron en 1 mL de glicerol al 10%.

Doscientos microlitros de células competentes fueron transformados con 200 ng a 400 ng del plásmido pLJR965 con los ARNg un volumen de 5 µl, mediante electroporación. La suspensión celular fue transferida a una cubeta de electroporación (BTX™ Electroporation Cuvettes Plus™) y electroporado con un pulso de 2.5 kV, 25 µF, y resistencia pulso-controlador de 1000 ohms. Los tiempos constantes de pulso óptimo se establecieron entre 15 y 25 ms. La suspensión celular fue recuperada en 5 mL de medio 7H9-OADC y Tween 80, sin antibiótico, y se incubó a 37°C durante 18 horas en el shaker.

Posteriormente, las células fueron cosechadas por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos. Cuatrocientos microlitros de medio 7H9- OADC + Tween 80 fueron agregados y homogenizado por pipeteo. Para obtener colonias aisladas se diluyó el cultivo, antes de sembrar, 1:10 y 1:100 en medio 7H9-OADC y Tween 80. Luego se sembró 70 µl en placas 7H10 suplementadas con OADC y kanamicina

(Cf: 25 µg/ml). Como control de contaminación, las células competentes sin plásmido fueron sembrados en el mismo medio. (Anexo 2)

Las colonias conteniendo el plásmido recombinante fueron seleccionadas del cultivo en medio 7H9-OADC con kanamicina (25 µg/µl).

#### **5.5.5.1. Extracción del ADN genómico de *M. tuberculosis***

El ADN de las colonias de MTB transformadas fue extraído por el método de “Digestión con Proteinasa K”. Cuatro mililitros de cultivo bacteriano a un OD600 entre 0.8 - 1.2 fueron centrifugados a 3000 g por 15 minutos. El pellet fue diluido en 500 µl de buffer TE y se trasladó a un tubo que contenía beads de zirconia de 2mm. Luego se calentó a 80°C durante 20 minutos. Posteriormente, se agregó 50 µl de lisozima (10 mg/ml), seguido de una incubación durante toda la noche a 37°C para promover la lisis celular. Luego, se agregaron 75 µl de 10% SDS y 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó a 65°C durante 3 horas con homogenización mediante vórtex cada 20 minutos para asegurar la completa lisis celular. Luego, se agregó 100 µl de 5M NaCl y 100 µl de solución CTAB/NaCl para luego incubarlo a 65°C durante 10 minutos. 700 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) fue agregado a la muestra digerida y luego centrifugada a 9600 g por 5 minutos. El sobrenadante fue recuperado y se transfirió a otro tubo al que se le agregó 600 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a las mismas condiciones. El sobrenadante se transfirió a un nuevo envase y se agregó 1 ml de alcohol absoluto frío y se enfrió a -70°C durante 30 minutos, seguido de una centrifugación a 9600 g durante 8 minutos para precipitar el ADN. El pellet de ADN fue lavado con 1 ml de alcohol al 70% frío, seguido de una centrifugación a 9600 g durante 3 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el ADN se secó a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente, el ADN se resuspendió en 20 µl de buffer EB.

#### **5.5.5.2. Amplificación del plásmido pJIR965 con un ARNg clonado en el genoma de *M. tuberculosis***

Las colonias transformadas fueron verificadas por PCR con los cebadores Fw 2433 (5'-TCT GAC CAG GGA AAA TAG CC-3') y Rv 2438 (5'-CTG CGT TAT CCC CTG ATT CTG-3'), que flanquean nucleótidos antes y después del sitio de

clonación de los ARNg en el plásmido integrativo pLJR965 con un producto aproximado de 330 pb. Como control positivo de la reacción de PCR, se usó a la cepa H37Rv que solo contenía el plásmido pLJR965 (H37Rv/pLJR965) y la cepa H37Rv/pLJR965:Rv3717c, el cual se ha usado en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular en estudios previos. (Tabla 1)

Un  $\mu$ l de 50 ng/ $\mu$ l ADN, 1X de ADN polimerasa DreamTaq (Thermo Scientific), 1X DreamTaq Buffer, 0,2mM dNTP Mix, 1 uM de *primers* forward y reverse fueron usados en un volumen final de 50  $\mu$ l. El ciclaje fue de 2 minutos de denaturación inicial a 95°C, 35 ciclos de 30 segundos de denaturación de 95°C, 30 segundos de hibridación a 57°C, 1 minuto de extensión inicial a 72°C y 10 minutos de extensión final a 72°C.

El tamaño de los amplicones fue de aproximadamente 330 pb (Tabla 1), los cuales fueron verificados en un gel de agarosa al 2% a 90 V durante 40 minutos.

**Tabla 1:** Secuencias del DNA de MTB con el plásmido insertado

Gen flanqueado	Secuencia
<b>Control negativo:</b> <b>H37Rv/pLJR965 (331 pb)</b>	5'aataaacgaaaggctcagtcgaaagactggcccttcgtttatctgtgtttgaaaaaaaaaagcgcgcaactgcggcgctttttttgaattctctgaccagggaataatagccctctgacctggggatttgcgatccctatcagtgatagatataatctgggaggagacgattaatgcgtctcggttttgtactcgaagaagctacaagataaggctcatccgaaatcaacacctgtcattttatggcagggtgtttttttgtcgactggggaccctagaggccccctttttttttttggatgaagagcattatcaatggctcttcacaggaagcttaaaaaaaaaagccccgattgcggggccttttttaatacggttatccacagaatcaggggataaacgcaggaaagaacatgtgagcaaaagccagcaaaagccaggaaccgtaa aaagcccgcttgcgtgctgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaacccgacagg
<b>H37Rv/pLJR965: Rv3756c (328 pb)</b>	Aataaacgaaaggctcagtcgaaagactggcccttcgtttatctgtgtttgaaaaaaaaaagcgcgcaactgcggcgctttttttgaattctctgaccagggaataatagccctctgacctggggatttgcgatccctatcagtgatagatataatctgggaatcgcaccgaccagagcgatggttttgtactcgaagaagctacaagataaggctcatccgaaatcaacacctgtcattttatggcagggtgtttttttgtcgactggggaccctagaggccccctttttttttttggatgaagagcattatcaatggctcttcacaggaagcttaaaaaaaaaagccccgattgcggggccttttttaatacggttatccacagaatcaggggataaacgcaggaaagaacatgtgagcaaaagccagcaaa
<b>H37Rv/pLJR965: Rv1667c (327 pb)</b>	5'cgatatcaataaacgaaaggctcagtcgaaagactggcccttcgtttatctgtgtttgaaaaaaaaaagcgcgcaactgcggcgcttttttttgaattctctgaccagggaataatagccctctgacctggggatttgcgatccctatcagtgatagatataatctgggagcaggtccgcaaccggctatgttttgtactcgaagaagctacaagataaggctcatccgaaatcaacacctgtcattttatggcagggtgtttttttgtcgactggggaccctagaggccccctttttttttttggatgaagagcattatcaatggctcttcacaggaagcttaaaaaaaaaagccccgattgcggggccttttttaatacggttatccacagaatcaggggataaacgcaggaaagaacatgtgagcaaaagccagcaaaagccaggaaccgt aaaaagcccgcttgcgtgctgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaa
<b>H37Rv/pLJR965: Rv3008 (327 pb)</b>	5'aataaacgaaaggctcagtcgaaagactggcccttcgtttatctgtgtttgaaaaaaaaaagcgcgcaactgcggcgctttttttgaattctctgaccagggaataatagccctctgacctggggatttgcgatccctatcagtgatagatataatctgggagcgtcggaccgttctcggccgttttgtactcgaagaagctacaagataaggctcatccgaaatcaacacctgtcattttatggcagggtgtttttttgtcgactggggacc

	ctagaggtccccttttttttttggatgaagagcattatcaatggctcttcacaggaagcttaaaaaaaagccccgcgattgccccctttttt ttaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccag
--	---

Nota: Las secuencias en amarillo, son las zonas donde corta la enzima BsmBI y las zonas en negrita resaltan la ubicación de los primers *forward* y *reverse*. Lo coloreado en azul, señala los ARNg.

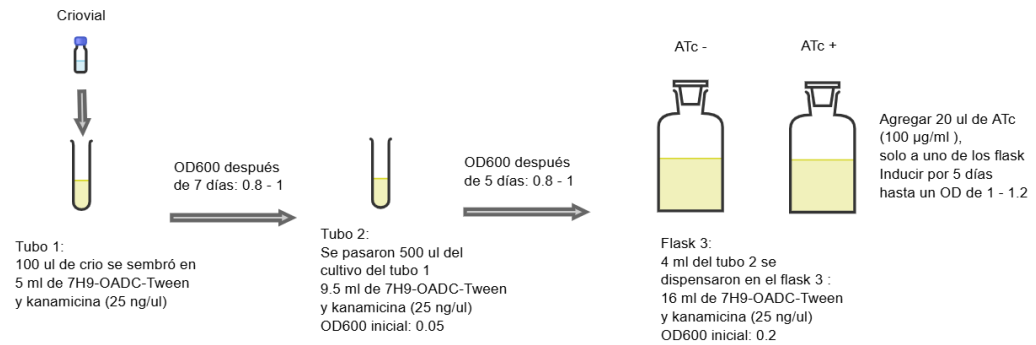
### **5.5.6. Inducción de silenciamiento génico transcripcional (CRISPRi)**

#### **5.5.6.1. Criopreservación de cepas transformadas**

Las colonias de MTB conteniendo los plásmidos con los ARNg fueron sembradas en 5ml de caldo 7H9-OADC, 0,2% de glicerol, 0.05% de Tween 80 y kanamicina (25 µg/µl). El cultivo fue criopreservado cuando el crecimiento fue logarítmico (OD: 0,8 - 1); 500 µl de cultivo fue mezclado con 500 µl de glicerol al 50% y alicuotado en crioviales de 1.2 ml y almacenados a -70°C.

#### **5.5.6.2. Proceso de inducción del sistema CRISPRi**

Cien µl de cepa bacteriana criopreservada fue sembrada en 5 ml de caldo 7H9-OADC, 0,2 % de glicerol, 0.05% de Tween 80 y con el antibiótico kanamicina (25 µg/µl). Cuando el OD fue 0,8 a 1, se transfirió el volumen necesario del cultivo a un segundo tubo de 9 ml de 7H9- OADC, Tween 80 y kanamicina hasta alcanzar un OD de 0.05. El cultivo fue incubado 5 días hasta alcanzar un OD entre 0.8 y 1.0; 4.5 ml fue transferido a un *flask* con un volumen inicial de 16 ml de medio 7H9-OADC, Tween 80 y kanamicina hasta alcanzar un OD de 0.2. 20 µl de anhidrotetraciclina (ATc) fue agregado para obtener una concentración final de 100 µg/ml (ATc+), y como control de cada gen se tuvo otro flask donde no se adicionó ATc (ATc-). Los flasks fueron incubados en un shaker a 37°C a 100 rpm durante 5 días (OD: 0.8 a 1.3) (8). Al quinto día se realizó la extracción de ARN por kit (Zymo Research) (Figura 4).



**Figura 4:** Proceso gráfico de inducción a CRISPRi

### 5.5.6.3. Extracción de ARN de *M. tuberculosis*

Los cultivos de MTB inducidos y no inducidos con un OD 600 entre 0.8 A 1.2 fueron centrifugados a 3000 g por 20 minutos a 4°. El pellet fue resuspendido con 7 ml de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8) y centrifugado a 3000 g por 20 minutos a 4°C. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 1000  $\mu$ l de TRI reagent (Zymo Research) y transferido a un tubo de 1.5 ml con tapa rosca con 0.5 ml de perlas de zirconio (0.1 mm). Las células fueron lisadas usando el equipo Fast Prep (MP Biomedicals) a 6.5 m/s por 30 segundos, 2 veces con un descanso de 3 minutos en hielo entre cada lisado.

Las muestras lisadas fueron centrifugados a 1500 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado; 200  $\mu$ l de cloroformo fue agregado y homogenizado. La muestra fue incubada por 5 minutos en hielo y centrifugada a 1500 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado; el mismo volumen de etanol absoluto frío fue agregado y transferido a columna Directzol RNA kit (Zymo Research). La muestra conteniendo el ARN en la columna fue centrifugada a 12000 g durante 30 segundos a 4°C. El ARN fue lavado con 400 y 700  $\mu$ l de Directzol RNA pre-wash con centrifugaciones a 1200 g por 30 segundos con los 400  $\mu$ l y por 2 minutos a 4°C con 1200 g los 700  $\mu$ l. El ARN fue suspendido con 37  $\mu$ l de agua libre de ARNasas y cuantificado usando el equipo Nanodrop. La integridad del ADN fue evaluada mediante una electroforesis a 90 V con gel de agarosa con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 1.5%, en la cual se usó un marcador de 100pb (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, MAN0013010).

### 5.5.6.4. Purificación del ARN

Tres  $\mu\text{g}$  de ARN fue tratado con 1  $\mu\text{l}$  de la enzima DNAsaI TURBO (ThermoFisher), 5  $\mu\text{l}$  de Buffer 10 X en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . El mix se incubó a 37°C por 30 minutos. 20  $\mu\text{l}$  de ARN fue purificado con el kit Purificación Kit Zymo RNA Clean, y eluido con 17  $\mu\text{l}$  de elution buffer. El ARN fue cuantificado usando nanodrop.

#### **5.5.6.5. Retro transcripción**

El ARN con ATc y sin ATc fue usado para generar una hebra de ADN (ADNc) con la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu\text{L}$ ) (SuperScript IV, Thermo Fisher Scientific). La retrotranscripción se realizó con dos condiciones, un control negativo de retrotranscripción, sin la enzima retro transcriptasa, y otro con la enzima retro transcriptasa. Inicialmente, 500 ng de ARN fue mezclado con 1  $\mu\text{l}$  de Hexámeros aleatorios (50  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de dNTPS 10 mM dNTP Mix (Invitrogen) y agua PCR para un volumen de 13  $\mu\text{l}$ . La reacción fue calentada a 65°C por 10 minutos en el termociclador (T100 Biorad) con el fin de generar la hibridación del primer hexámero en la hebra de RNA. Después, 4  $\mu\text{l}$  de buffer 5X First-Strand Buffer, 2  $\mu\text{l}$  de 100 mM DTT y 1  $\mu\text{l}$  de RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 units/ $\mu\text{L}$ ) fue agregado. La reacción fue incubada a 37°C por 2 minutos.

Finalmente, 0.5  $\mu\text{l}$  de M-MLV RT fue agregado a los tubos indicados y 0,5  $\mu\text{l}$  de agua PCR a los tubos control. Los tubos fueron incubados a 25°C por 10 minutos, 37°C por una hora, 72°C por 15 minutos y 4°C de manera infinita.

#### **5.5.7. Evaluación de silenciamiento individual de bombas de flujo**

##### **5.5.7.1. Diseño de primers**

Estos primers fueron diseñados usando el software Primer-BLAST de NCBI, ubicándolos justo después de la región flanqueante en el lado 3' de las secuencias complementarias de los ARNm de cada gen. Estudios previos del laboratorio de Biología Molecular trabajaron con los genes de *sigA*, por lo que se siguieron usando esos primers. (Tabla 2)

**Tabla 2:** Primers diseñados para realizar qPCR en los genes diana

Gen	Cadena líder	Sequence (5'→3')	Longitud	Tm °C	GC %
<i>Rv3756c</i>	Fw	TTGGCGTTGACCCTCGAC	18	59.97	61.11
	Rv	CTACCGTAGGGCGTGTC CA	19	61.05	63.16
<i>Rv1667c</i>	Fw	CACCGAAAAAGAGTTGG CCG	20	60.04	55.00
	Rv	GACACGTAGTTGCTGGG TCA	20	59.97	55.00
<i>Rv3008</i>	Fw	TCACCACCGAGCAATCT GTC	20	60.04	55.00
	Rv	GTTCATCACCGTCAGGG GAG	20	60.11	60.00
<i>SigA</i> (housekeeping)	Fw	CCATCCCGAAAAGGAAG ACC	20	59	55.00
	Rv	TCGAGGTCTGGTTCAGC GTC	20	61.60	60.00

**5.5.7.2. Eficiencia de primers**

La eficiencia se determinó con las concentraciones finales de 0.5 µM y 0.3 µM (stock 10 µM) para distintas diluciones de ADNc: Directo (25 ng), 1:10, 1:100 y 1:1000, por duplicado. Finalmente, se calculó el porcentaje de eficiencia usando la siguiente ecuación:

$$E = (10^{\frac{-1}{m}} - 1) \times 100$$

E: Eficiencia de amplificación

m: pendiente

**5.4.7.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)**

El ADNc fue usado para cuantificar los niveles de ARNm de los genes con silenciamiento individual y cepas sin silenciamiento mediante una amplificación usando SYBR Green. La mezcla maestra se preparó con 0.3 µM de cada primer (forward y reverse), 2.5 µl de SYBR Green, 4.5 µl de agua para PCR y 1 µl de ADNc de 25 ng/ µl, en un volumen de 10 µl.

La reacción fue realizada en el termociclador QuantStudio 5 (Applied Biosystems) con el siguiente ciclaje: a 50°C por 2 minutos, luego denaturación inicial 95°C por 10 minutos; PCR: 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto; una curva melting a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto y 95°C por 1 segundo y finalmente, 40°C por 10 minutos.

La cantidad relativa de ARNm fue calculada usando el método de Livak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (39). El gen housekeeping *SigA* fue usado como control de la expresión con ATc para inducir al silenciamiento y sin Atc para los controles negativos. Además, el número de veces en que se genera el silenciamiento, el LOG2FC y el porcentaje de ARNm fueron calculados usando de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de disminución de ARNm} = (1 - 2^{\text{LOG2FC}}) \times 100\%$$

Este método fue aplicado tanto a las cepas inducidas al silenciamiento y cepas no inducidas al silenciamiento. Además, se usó los valores de Ct del gen constitutivo *SigA* para normalizar los valores de Ct de los genes diana. El proceso se realizó para 3 réplicas biológicas y 3 ensayos en cada una.

#### **5.5.8. Cálculo del silenciamiento de la expresión génica, logaritmo de cambio de pliegue (LOG2FC) en cepas silenciadas y porcentaje de ARNm**

Para calcular el número de veces en que se genera el silenciamiento de cada gen, se dividieron los niveles de expresión de ARNm de los genes sin silenciamiento (ATc-) entre el los niveles de ARNm de los genes con silenciamiento (ATc+). El logaritmo de cambio de pliegue (LOG2FC) se calculó sacando el logaritmo en base 2 al cociente los niveles de ARNm de los cultivos silenciados (ATc+) entre los cultivos sin silenciar (ATc-). Y el porcentaje de ARNm se calculó haciendo uso del LOG2FC, como lo indica la fórmula mencionada en metodología.

#### **5.5.9. Evaluación de crecimiento de las cepas transformadas**

Durante el proceso de silenciamiento génico, el crecimiento de las cepas silenciadas y no silenciadas fue evaluado por 6 días a 37°C. Se llevó el crecimiento de fase logarítmica (OD: 0.8 - 1) para luego llevarlo a un OD de 0.2 con 7H9-OADC + tween en otro tubo, el cual fue inducido por ATc (100 µg/ml) (Por ejemplo: 20 ml de cultivo y 20 µl de ATc). Cada 24 horas se tomaron alicuotas de 1 ml de cultivo y el OD600 fue medido.

Los datos de OD 600 y el tiempo en horas, fueron ajustados a un modelo de regresión exponencial, donde se evaluó desde el día 3 (72 horas) hasta el día 6 (144 horas), porque durante ese tiempo las células se encuentran en crecimiento exponencial. Tanto en las condiciones silenciadas (ATc+) y sin silenciar (ATc-) se calculó la función exponencial  $y = a \cdot e^{bx}$ . En el cual los valores fueron:

Y= OD600 obtenido en un determinado tiempo

a= OD600 obtenido en el día 0 (a las 72 horas o 3 días)

e= Constante (2.71)

b = Tasa de crecimiento bacteriano por unidad de tiempo

x= tiempo en horas

Luego las funciones obtenidas se transformaron a regresiones lineales al multiplicarle el logaritmo neperiano a toda la ecuación.

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

$\ln(y)$ =Logaritmo neperiano de OD600 medido en una determinada hora

$\ln(a)$ = Logaritmo neperiano de OD600 a las 72 horas

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

x = tiempo en horas

Finalmente, se realizó una regresión lineal para cada una de las condiciones y se compararon las tasas de crecimiento bacteriano por unidad de tiempo (pendiente) obtenidas para saber si había diferencia significativa o no entre ellas ( $p < 0.05$ ).

#### **5.5.10. Velocidad de flujo de POA mediante la técnica de Wayne**

##### **5.5.10.1. Curva estándar de ácido pirazinoico**

Un cultivo de 50 ml MTB H37Rv con OD de 0.8 - 1 fue centrifugado a 5000 xg por 20 min. El sobrenadante fue esterilizado usando un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  y usado para construir la curva estándar de POA. (0; 0,05; 0,10; 0,50; 1,0; 2; 4; 6; 8 y 10

mM). La curva estándar permitió determinar el coeficiente de correlación y obtener la ecuación de la recta correspondiente.

De manera continua, se realizó el ensayo Wayne a cada una de las muestras preparadas para conocer los valores OD 450 nm. Se alicuotó 300  $\mu$ l de cada muestra estándar en un tubo de 1.5 ml y se le agregó 30  $\mu$ l de sulfato de amonio ferroso (SAF) al 10% y se homogenizó por vortex, después se centrifugó a 18800 g por 5 minutos. Finalmente, se tomó 100  $\mu$ l del sobrenadante y se agregó en una placa de 96 pocillos de fondo plano (SPL life science) por triplicado y se leyó en el espectrofotómetro (Spectra mMax 190). (Anexo 2)

A partir de la ecuación obtenida en mi curva estándar, se sustituyeron los valores de absorbancia en la variable “Y” y, despejando la incógnita “X”, se calculó la concentración de la muestra expresada en mM.

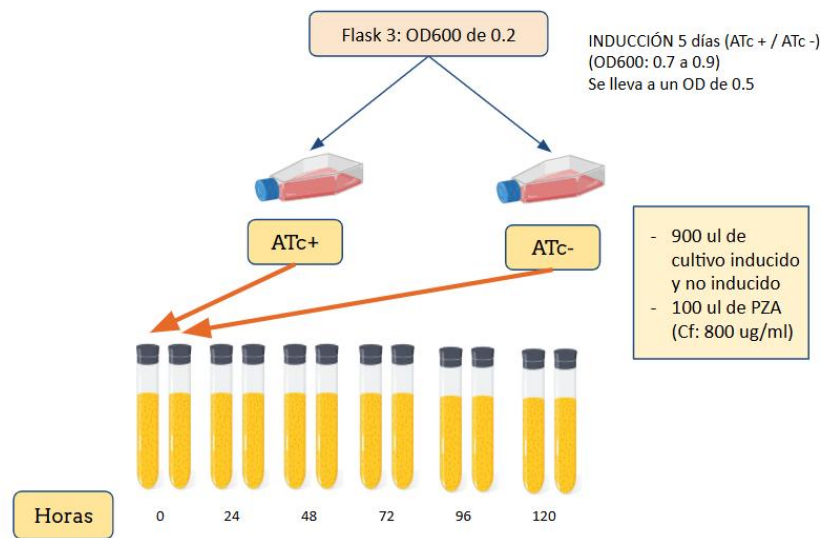
#### **5.5.10.2. Evaluación de eflujo de ácido pirazinoico en cepas silenciadas y no silenciadas**

Las cepas silenciadas y no silenciadas, con ATc y sin ATc (100 ng/ $\mu$ l), así como la cepa control H37Rv/pLJR965, que fueron cultivadas en el medio 7H9 suplementado con OADC, Tween-80 (0.05%) y kanamicina 25  $\mu$ g/ml hasta la fase logarítmica, fueron diluidas hasta llegar a un OD600 de 0.5 en caldo 7H9-OADC, Tween-80 (0.05%) y kanamicina 25  $\mu$ g/ml. Luego se agregó 100  $\mu$ l de PZA (Cf: 800  $\mu$ g/ml) con 900  $\mu$ l de cada cepa evaluada e incubados a 37°C. En cada uno de los siguientes intervalos de tiempos: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas; 800  $\mu$ l de cultivo fue retirado e inactivados por calor (100°C) a MTB y se usaron 100  $\mu$ l de cultivo para medir el OD600. Para ello se hizo una dilución 1:10 con medio 7H9, es decir 100  $\mu$ l de cultivo y 900  $\mu$ l de 7H9. Estas medidas de OD600 sirvieron para luego normalizar la producción de POA con la cantidad de bacterias presentes en el medio.

Para inactivar a MTB, se centrifugaron los 800  $\mu$ l de cultivo en un tubo de 1.5 ml a 10000 g por 10 minutos, el sobrenadante fue trasladado a otro tubo de 1.5 ml y se colocó en el termoblock a 100°C por 30 minutos, con el fin de eliminar a MTB. Estos procesos se repitieron para cada uno de los intervalos de tiempo (0h, 24h,

48h, 72h, 96h y 120h) y cada muestra fue almacenada a -20°C hasta su uso en el ensayo de Wayne (Figura 5).

Paralelamente, se mantuvieron en las mismas condiciones tubos de 1.5 ml con medio 7H9-OADC y PZA (Cf: 800 µg/ml) durante los 5 días del ensayo. Se tomó una muestra cada 24 horas y, al finalizar, se aplicó la técnica de Wayne. Esto se realizó con el propósito de generar un control diario y eliminar el ruido causado por la interacción entre el reactivo SAF y la PZA presente en el medio.



**Figura 5:** Proceso de obtención de sobrenadantes para su posterior aplicación en la técnica Wayne

### 5.5.11. Susceptibilidad a PZA para cepas de *M. tuberculosis* (TEMA): Determinación de la mínima concentración inhibitoria (MIC)

#### 5.5.11.1 Preparación del inóculo

El ensayo de susceptibilidad en microplacas de tetrazolium (TEMA) con PZA (1600 µg/ml), POA (1600 µg/ml) e isoniazida (INH) (34 µg/ml) fue realizado con las cepas silenciadas y cepas control. El silenciamiento individual se realizó con el mismo procedimiento realizado en el CRISPRi. Los cultivos fueron ajustados a una turbidez de OD600 de 0.25 con medio 7H9-OADC; luego el cultivo fue diluido 1/25 con medio 7H9-OADC (7.2 ml medio 7H9-OADC + 0.3ml cultivo). 7.5 µl de ATc fue agregado para mantener el silenciamiento génico, mientras que a los tubos controles no se le agregó ATc.

### 5.5.11.2. Preparación de la placa con las drogas e inoculación de la cepa

Para mantener las condiciones de humedad óptimas durante la incubación, todos los pozos periféricos de la placa se llenaron con 200  $\mu$ L de agua destilada estéril. Posteriormente, se dispensaron 100  $\mu$ L del medio de cultivo 7H9 enriquecido con OADC, Tween y ATc (1:1) en los pozos de las columnas 3 a 11 y de las filas B a D. Se repitió lo mismo para las filas E a G pero esta vez sin ATc. Además, se agregaron 200  $\mu$ l de las soluciones de drogas a doble concentración en los pozos de las columnas 2 (control de drogas); y 200  $\mu$ l en la columna 3, asignando cada fila a una droga distinta. Utilizando una multipipeta, se realizaron diluciones seriadas al 50% desde la columna 3 hasta la columna 10, mezclando el contenido de cada pozo cinco veces antes de trasladar 100  $\mu$ L a la siguiente columna. Se descartó el exceso en la multipipeta para asegurar que cada pozo mantuviera un volumen uniforme de 100  $\mu$ L. Se añadieron 100  $\mu$ L de la cepa bacteriana diluida 1/25 a todos los pozos desde la columna 2 hasta la 11, siendo la columna 11 designada como el control de crecimiento que solo contenía medio 7H9 y la cepa. La placa fue colocada en una bolsa zip plot semi-sellada para permitir el ingreso de oxígeno y se incubó a 37°C. En el quinto día de incubación, se agregaron 50  $\mu$ L de la mezcla Tetrazolium-Tween al pozo B11 y se incubó por 24 horas adicionales. Al siguiente día, dependiendo de la observación de un cambio de color de amarillo morado, se procedió a agregar el colorante a todos los pozos e incubar por otras 24 horas. Si no se observaba cambio de color en el día 5, el procedimiento se repetía en el pozo C11 al día 7. El MIC de la droga se determinó en el pozo donde no se observaba el viraje de color (Figura 6).

Ensayos para una RB	[Droga]	Stock (2X) mg/ml	X (2X)	X/2	X/4	X/8	X/16	X/32	X/64	X/128	X/256	C	C
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ATc +	A												
	B	INH con 7H9										Cultivo sin droga (100 $\mu$ l 7H9 suplementado)	200 $\mu$ l de 7H9 suplementado
	C	PZA con 7H9										Cultivo sin droga (100 $\mu$ l 7H9 suplementado)	200 $\mu$ l de 7H9 suplementado
	D	POA con 7H9										Cultivo sin droga (100 $\mu$ l 7H9 suplementado)	200 $\mu$ l de 7H9 suplementado
ATc-	E	INH con 7H9										Cultivo sin droga (100 $\mu$ l 7H9 suplementado)	200 $\mu$ l de 7H9 suplementado
	F	PZA con 7H9										Cultivo sin droga (100 $\mu$ l 7H9 suplementado)	200 $\mu$ l de 7H9 suplementado
	G	POA con 7H9										Cultivo sin droga (100 $\mu$ l 7H9 suplementado)	200 $\mu$ l de 7H9 suplementado
	H												

**Figura 6:** Esquema de elaboración de la microplaca para los ensayos de TEMA. Fuente: elaboración propia

### 5.5.12. Análisis estadístico

Se realizaron 3 réplicas biológicas para la extracción de ARN, evaluación de flujo de POA mediante Wayne y evaluación de la susceptibilidad a PZA por medio de TEMA.

La prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con el programa GraphPad 9.5.1.733 junto con la corrección de Dunn se realizaron para poder evaluar la significancia de variación en el nivel de expresión de las dos condiciones (silenciada y no silenciada) para cada cepa. Los valores estadísticamente significativos fueron aquellos que mostraron un valor de  $p < 0.05$ .

La comparación del crecimiento bacteriano en la condición silenciada (ATc+) y no silenciada (ATc-) de la cepa control H37Rv-pLJR965 y las cepas *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* fue realizado mediante una regresión lineal simple ( $p < 0.05$ ) con comparación de pendientes, con el programa GraphPad 9.5.1.733 y R 4.3. Se realizaron 3 réplicas biológicas.

La curva estándar de POA mM y la tasa de eflujo de POA, se realizó mediante la técnica Wayne y se analizaron los resultados por un modelo de regresión lineal simple y luego se realizó se aplicó una prueba t de Student con el fin de comparar las pendientes obtenidas entre la condición de la cepa silenciada con la no silenciada, determinando si las diferencias observadas eran estadísticamente significativas. Todas estas pruebas se realizaron con un nivel de significancia de 0.05 con el programa GraphPad 9.5.1.733 y R 4.3. Se realizaron 3 réplicas biológicas con 3 ensayos en cada una.

El MIC en TEMA se determinó de manera cualitativa (resistencia o susceptibilidad). El MIC de resistencia se corroboró con literatura previa. Se realizaron 3 réplicas biológicas con 3 ensayos en cada una.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Clonación de un ARNg en el plásmido pLJR965

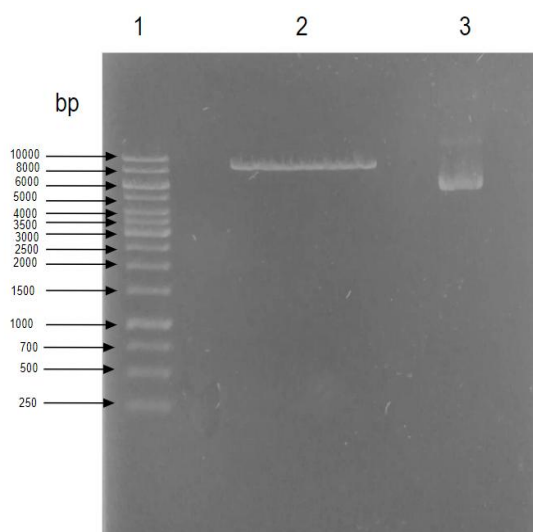
Los ARNg seleccionados con valores de *Predicted\_strength* cercanos a 1, los cebadores y el LOG2FC predicho, calculados por la página Pebble, son mostrados en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Cebadores seleccionados para formar los ARNg del sistema de CRISPRi que se usará en los genes de interés

Gen	Secuencia del ARNg	PAM	Fuerza de predicción	Valor predictivo de log <sub>2</sub> FC	"Top oligo"	"Bottom oligo"
Rv3756c	5' ATCATCGCACCGA CCAGAGCGAT 3'	GTGG AAT	0.97	-1.66	5' GGGAATCATCGCACC GACCAGAGCGAT 3'	5' AAACATCGCTCTGG TCGGTGCATGAT 3'
Rv1667c	5' GCAGGTGCCGCAA CCGGTCAT 3'	CGAG AAT	0.95	-0.65	5' GGGAGCAGGTGCCGC AACCGTCAT 3'	5' AAACATGACCGGTT GCGGCACCTGC 3'
Rv3008	5' GCGTCGGACCGTT TCGTCGGCC 3'	CTGG AAT	0.93	-0.02	5' GGGAGCGTCGGACCG TTTCGTCGGCC 3'	5' AAACGGCCGACGA AACGGTCCGACGC 3'

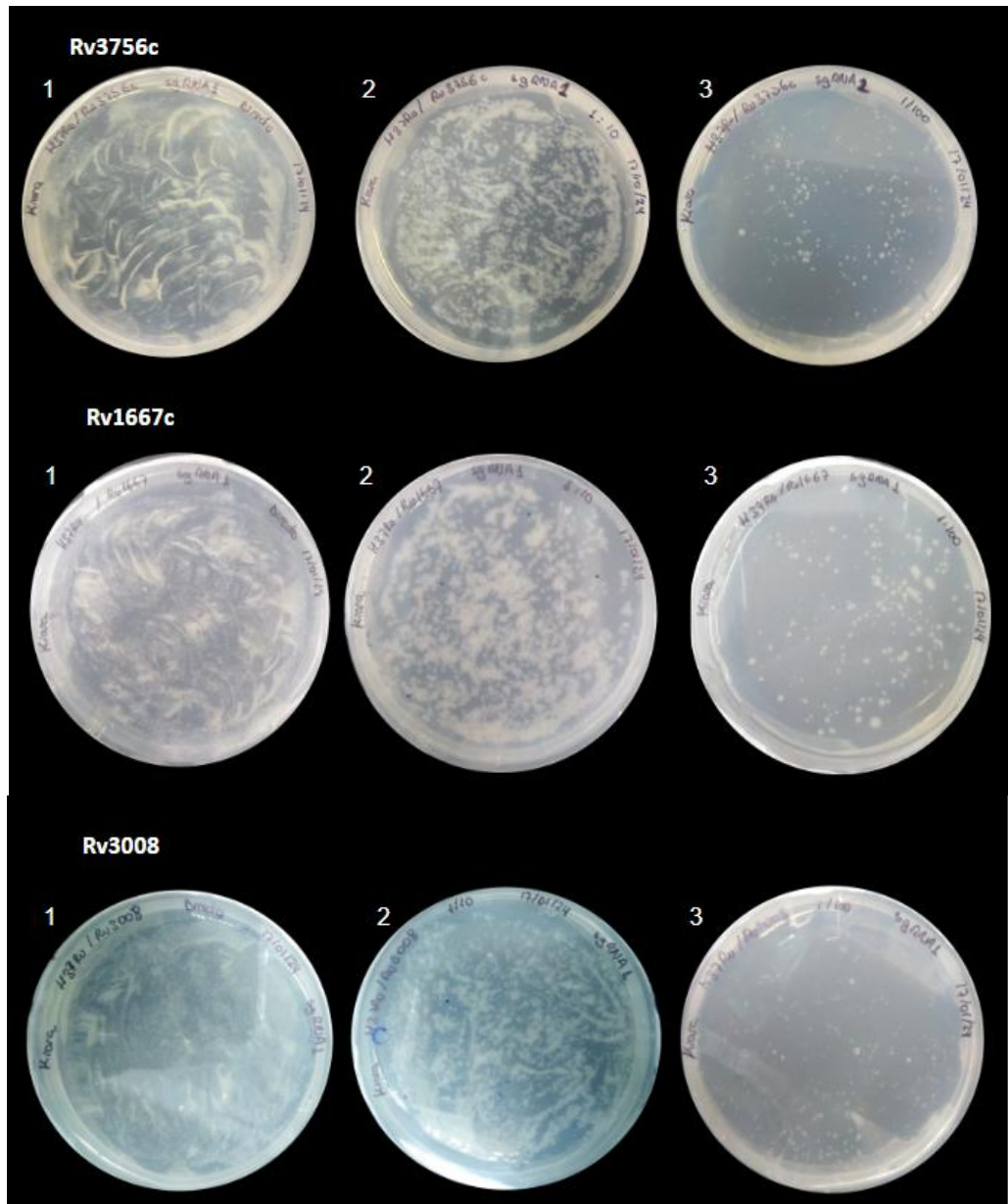
El tamaño aproximado de los oligos hibridados de los genes *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* fue de 27, 25 y 26 pb, respectivamente.

La digestión del plásmido fue exitosa, por la enzima BsmBI y el resultado es mostrado en la Figura 3. El tamaño del plásmido digerido fue de 8631 pb, y se corrió junto al plásmido sin linealizar (410 ng/μl) (Figura 7).



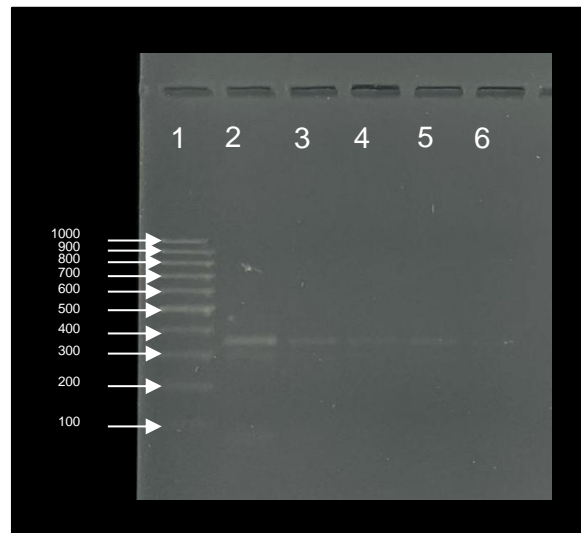






**Figura 10:** Crecimiento de las colonias H37Rv transformadas con el plásmido pLJR965 con los ARNg específicos para cada gen en medio 7H10 con kanamicina. (1) Siembra en directo, (2) dilución 1/10 y (3) dilución 1/100. Nota: En el Anexo 3 se observa a mayor detalle las colonias seleccionadas con las cuales se realizaron los ensayos de CRISPRi.

La integración del plásmido pLJR965 en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* fue corroborada por análisis molecular mediante PCR. Como se muestra en la Figura 11, se obtuvo un amplicón de aproximadamente 330 pares de bases, correspondiente al tamaño esperado, lo que confirma una integración exitosa del plásmido.



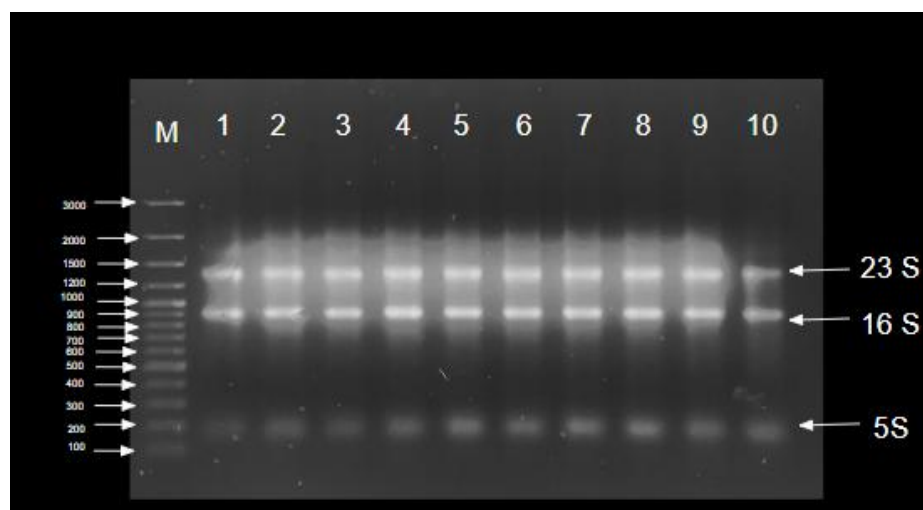
**Figura 11:** Electroforesis en en 2% de agarosa en buffer TAE 1X de los productos de PCR. (1) Marcador de 100 pb (Invitrogen), (2) Control negativo (H37Rv/pLJR965), (3) *Rv3417* (control positivo de la clonación), (4) *Rv3756c*, (5) *Rv1667c* y (6) *Rv3008*.

## 6.5. Inducción de silenciamiento génico transcripcional (CRISPRi)

### 6.5.1. Integridad del ARN extraído

Se obtuvo entre 9 y 22  $\mu\text{g}$  de ARN total a partir de las cepas (H37Rv/pLJR965, pLJR965:*Rv3756c*, pLJR965:*1667c* y pLJR965:*Rv3008*) con los genes silenciados y no silenciados. Los ratios de absorbancia 260/280 fue entre 1.9 a 2.01 y 260/230 de 2.16 a 2.22 (Anexo 4).

En la electroforesis del ARN, se observó las estructuras ribosomales: 16S, 23S y 5S constando la integridad del ARN (Figura 12).

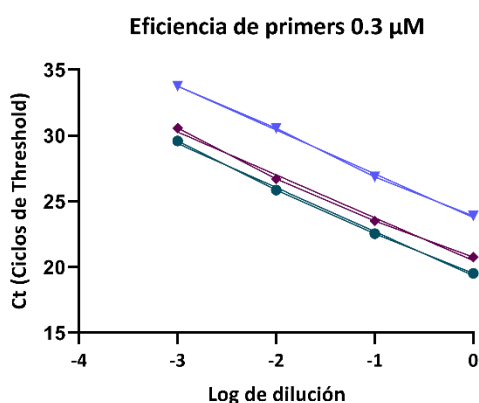


**Figura 12:** Electroforesis en 2% de agarosa en buffer TBE 1X con agua DEPC de 1  $\mu$ g de ARN total de las cepas de MTB con el sistema CRISPRi. (1) Marcador de 100 pb; (1-3-5-7-9) Cepas tratadas con ATc, genes diana silenciados, (2-4-6-8-10) Cepas sin tratar con ATc, genes diana no silenciados, control. Y, se señalan los ARN ribosomales bacterianos 23S, 16S y 5S.

## 6.5.2. Evaluación de silenciamiento individual de bombas de flujo

### 6.5.2.1 Eficiencia de primers de qPCR

En la figura 13 se muestran las líneas de regresión lineal que representan la eficiencia de la amplificación de los genes *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008*. Los resultados de la regresión lineal para cada primer están tabulados y demuestran altos valores de coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para cada gen. Para el gen *SigA*, se mantuvo las mismas condiciones de los genes diana (Tabla 4).



**Figura 13:** Gráfico de dispersión para el cálculo de la eficiencia de los primers de qPCR. Nota: El eje Y del gráfico representa el número de ciclos de umbral (Ct) necesarios para detectar el ADN, mientras que el eje X muestra el logaritmo de la dilución de las muestras.

En la tabla 4 se muestra la eficiencia de amplificación de primers para los genes *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008*. Lo cual confirma que el uso de 0.3 uM de primers para evaluar la expresión relativa de los genes es altamente eficiente. Los valores de coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de la regresión lineal para cada primer fueron altos: 0.9976, 0.9983 y 0.9941 para *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008*, respectivamente

**Tabla 4:** Porcentaje de eficiencia de los primers evaluados

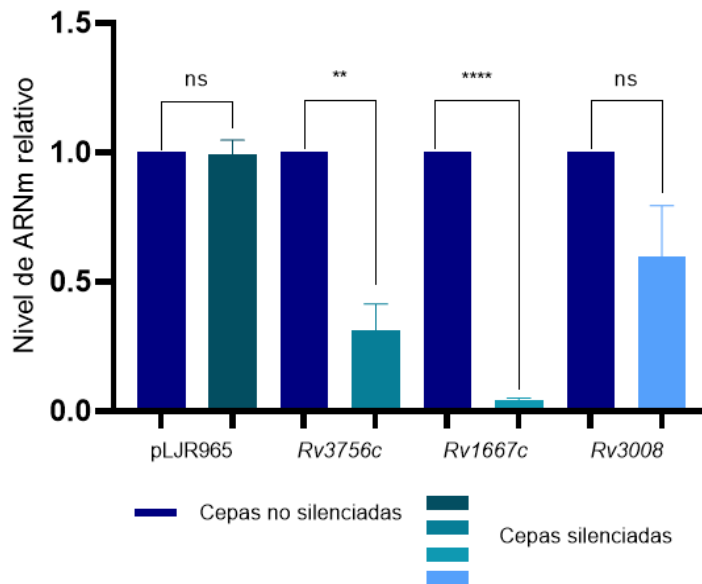
Gen diana	Eficiencia (%)	Pendiente	$R^2$
<i>Rv3756c</i>	98.98	-3.349	0.9976
<i>Rv1667c</i>	99.59	-3.332	0.9983
<i>Rv3008</i>	102.47	-3.262	0.9941

#### 6.5.2.2. Niveles de expresión de ARNm en cepas silenciadas y no silenciadas

En el control negativo, la mediana de los niveles de expresión de ARNm fue de 1.05 en la condición sin ATc (ATc-) y de 0.98 en la condición con ATc (ATc+), lo cual es adecuado, ya que el plásmido utilizado no contiene ARN guía (Tabla 5). Esto confirma que en el control negativo no se observa una disminución en la expresión de los genes evaluados. En cuanto a los genes blanco inducidos con ATc (*Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008*), se observó una disminución en las medianas de expresión en comparación con sus respectivas condiciones sin inducción (ATc-). No obstante, dicha disminución fue estadísticamente significativa únicamente para *Rv3756c* y *Rv1667c* (Tabla 5 y Figura 14). La expresión relativa del ARNm se calculó utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Ver anexo 5).

**Tabla 5:** Descripción estadística de los niveles de expresión de ARNm ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) de *M. tuberculosis* H37Rv silenciados (ATc+) y sin silenciar (ATc-)

Estadística descriptiva (Kruskal-Wallis y Metodo de Dunn)	pLJR965		Rv3756c		Rv1667c		Rv3008	
	ATc -	ATc +	ATc-	ATc +	ATc -	ATc +	ATc -	ATc +
Número de réplicas	9	9	9	9	9	9	9	9
Mínimo	0.72	0.80	0.75	0.18	0.68	0.02	0.59	0.28
25% percentil	0.88	0.83	0.83	0.22	0.77	0.04	0.86	0.46
Mediana	1.05	0.98	1.00	0.23	1.06	0.04	1.07	0.62
75% Percentil	1.27	1.30	1.18	0.43	1.29	0.06	1.12	0.71
Máximo	1.30	1.39	1.42	0.59	1.38	0.07	1.59	1.09
Promedio	1.05	1.06	1.02	0.32	1.03	0.04	1.03	0.61
Desviación estándar (DS)	0.21	0.23	0.22	0.14	0.26	0.02	0.27	0.23
Error de la DS	0.07	0.08	0.07	0.05	0.09	0.01	0.09	0.08
IC Inferior 95%	0.89	0.88	0.85	0.21	0.83	0.03	0.82	0.43
IC Superior 95%	1.21	1.24	1.19	0.43	1.23	0.05	1.24	0.79



**Figura 14:** Niveles de ARNm relativo para cepas silenciadas en comparación de la cepa no silenciada

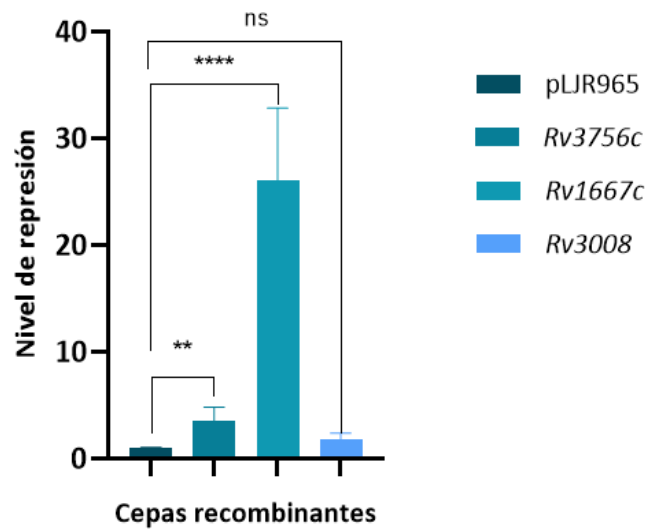
### 6.5.2.3. Silenciamiento de la expresión génica, logaritmo de cambio de pliegue (LOG2FC) en cepas silenciadas y porcentaje de ARNm

En la cepa H37Rv:pLJR965 no se observa un cambio en los niveles de expresión relativos, en base al gen constitutivo SigA, como se puede observa en la figura 15 y la tabla 6. Para el gen *Rv1667c* se tuvo un mayor silenciamiento, es decir, el gen *Rv1667* ha disminuido 26.11 veces su expresión en comparación del gen *SigA*, para el gen *Rv3756c* el resultado fue de 3.5, y *Rv3008* fue de 1.8.

**Tabla 6:** Silenciamiento de la expresión génica y LOG2FC de cada gen estudiado con las dos condiciones (ATc- y ATc +) de las cepas recombinantes: H37Rv/pLJR965 (control negativo), *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008*.

pLJR965								
Replica Biologica	Gen	ARNm ATc-	ARNm AT+	Represión (R)	Promedio (R)	ATc+/ATc-	LOG2FC	Promedio
1	Control	1.000	1.050	0.95	1.01	1.050	0.07	-0.01
2		1.000	0.940	1.06		0.940	-0.09	
3		1.000	0.990	1.01		0.990	-0.01	
<i>Rv3756c</i>								
Replica Biologica	Gen	ARNm ATc-	ARNm AT+	Represión (R)	Promedio (R)	ATc+/ATc-	LOG2FC	Promedio
1	<i>Rv3756c</i>	1.000	0.202	4.95	3.50	0.202	-2.31	-1.75
2		1.000	0.410	2.44		0.410	-1.29	
3		1.000	0.320	3.13		0.320	-1.64	
<i>Rv1667c</i>								
Replica Biologica	Gen	ARNm ATc-	ARNm AT+	Represión (R)	Promedio (R)	ATc+/ATc-	LOG2FC	Promedio
1	<i>Rv1667c</i>	1.000	0.03	33.33	26.11	0.030	-5.06	-4.67
2		1.000	0.040	25.00		0.040	-4.64	
3		1.000	0.050	20.00		0.050	-4.32	
<i>Rv3008</i>								
Replica Biologica	Gen	ARNm ATc-	ARNm AT+	Represión (R)	Promedio (R)	ATc+/ATc-	LOG2FC	Promedio
1	<i>Rv3008</i>	1.000	0.42	2.38	1.80	0.420	-1.25	-0.80
2		1.000	0.560	1.79		0.560	-0.84	
3		1.000	0.810	1.23		0.810	-0.30	

En la tabla 6 se muestran el número de veces en que se genera el silenciamiento y LOG2FC para cada gen en las 3 réplicas biológicas con sus 3 ensayos en cada una.

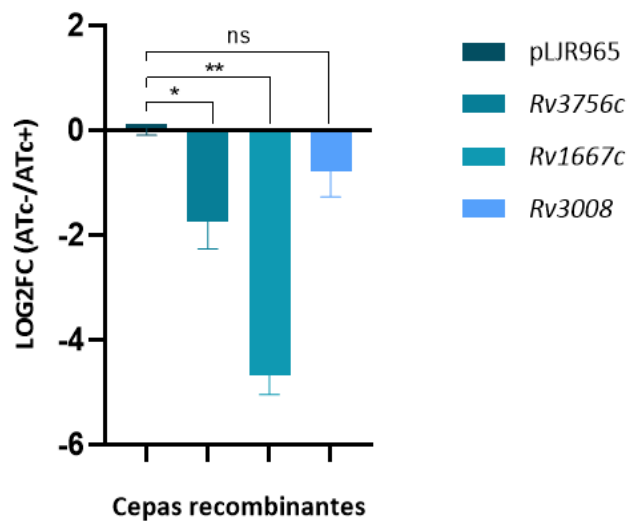


**Figura 15.** Silenciamiento de la expresión transcripcional individual de los genes silenciados en comparación de la cepa H37Rv/pLJR965

Los valores experimentales del logaritmo del cambio de pliegue ( $\log_2$  del fold change, LOG<sub>2</sub>FC) fueron de -1.75 para *Rv3756c*, -4.67 para *Rv1667c*, y -0.8 para

Rv3008. En contraste, la cepa control H37Rv/pLJR965 presentó un valor cercano a cero ( $-0.01$ ), lo que indica ausencia de represión génica en dicha condición (Figura 16).

A partir de estos valores, se calculó el porcentaje de disminución del ARNm en cada cepa (Tabla 7). La cepa control H37Rv/pLJR965 inducida con ATc mostró una reducción mínima del 0.69 % en los niveles de ARNm con respecto a su condición no inducida. En cambio, las cepas con silenciamiento dirigido presentaron una reducción considerable: *Rv3756c* mostró una disminución del 70.27 %, *Rv1667c* del 99.72 %, y *Rv3008* del 42.57 %. Estos resultados confirman una represión efectiva en los genes *Rv3756c* y *Rv1667c*, mientras que en *Rv3008* la represión fue mínima.



**Figura 16.** LOG2FC para las cepas silenciadas en comparación de H37Rv/pLJR965

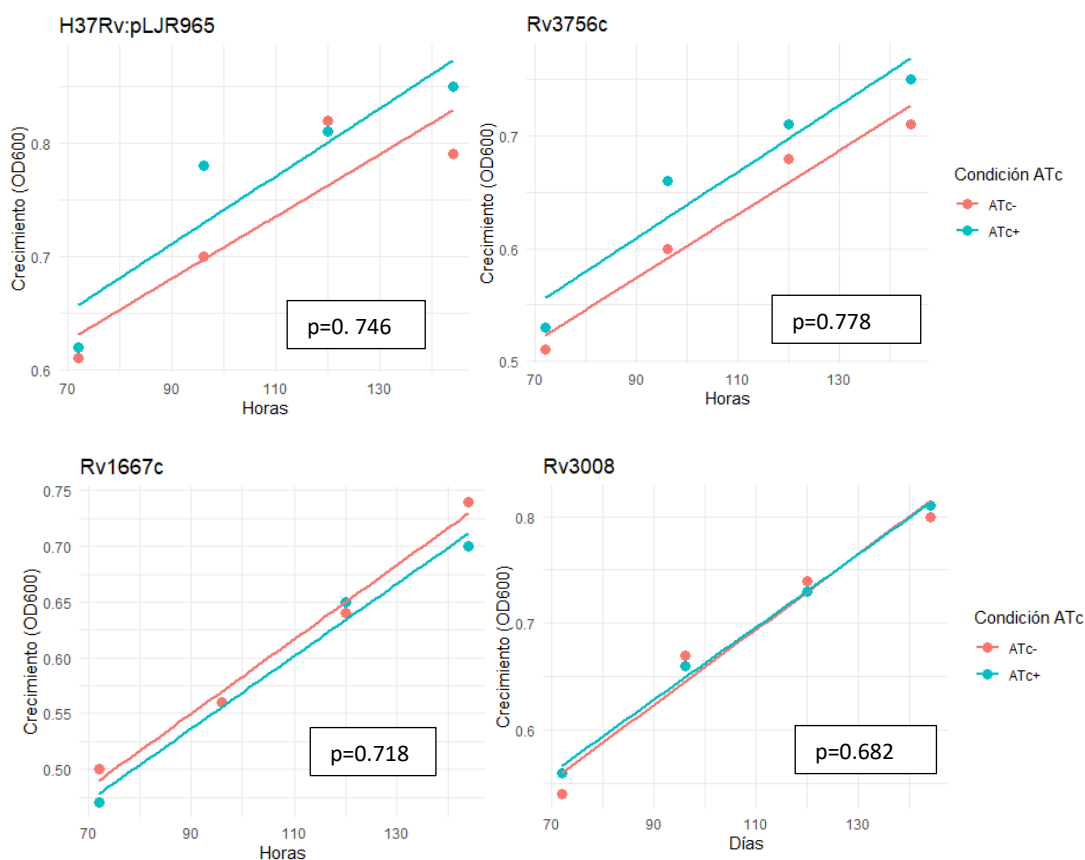
**Tabla 7:** Porcentaje de ARNm disminuido en las cepas silenciadas

Gen	% de disminución de ARNm = $(1 - 2^{\text{LOG2FC}}) \times 100\%$	Porcentaje
pLJR965	$(1 - 2^{-0.01}) \times 100\%$	0.69%
<i>Rv3756c</i>	$(1 - 2^{-1.75}) \times 100\%$	70.27%

<i>Rv1667c</i>	$(1 - 2^{-4.67}) \times 100\%$	96.07%
<i>Rv3008</i>	$(1 - 2^{-0.80}) \times 100\%$	42.57%

### 6.6. Evaluación de crecimiento de las cepas transformadas

El crecimiento bacteriano fue similar en los cultivos silenciados y los no silenciados (Figura 17). El inductor ATc no tuvo una influencia negativa en el crecimiento de la cepa durante ese intervalo de tiempo, debido a que no existe diferencia significativa entre las tasas de crecimiento (pendientes). Los valores del valor de p fueron H37Rv-pLJR965= 0.746, Rv3756c= 0.778, Rv1667c= 0.718 y Rv3008= 0.682 (Anexo 6).



**Figura 17:** Crecimiento de las cepas silenciadas (ATc+) y no silenciadas (ATc-) durante desde las 72 h – 144 h. Nota: En ambos casos, se realizaron 3 réplicas biológicas (RB) y se calculó el promedio por cada hora.

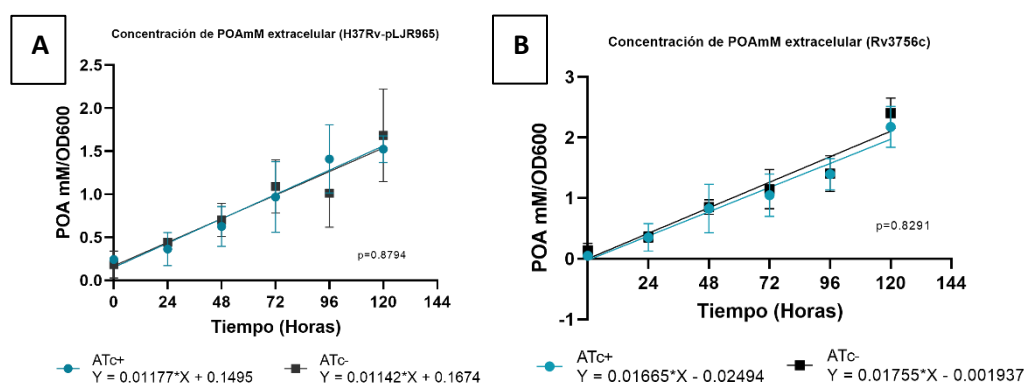
## 6.7. Evaluación de la concentración extracelular y velocidad de eflujo inicial de ácido pirazinoico en las cepas silenciadas y no silenciadas

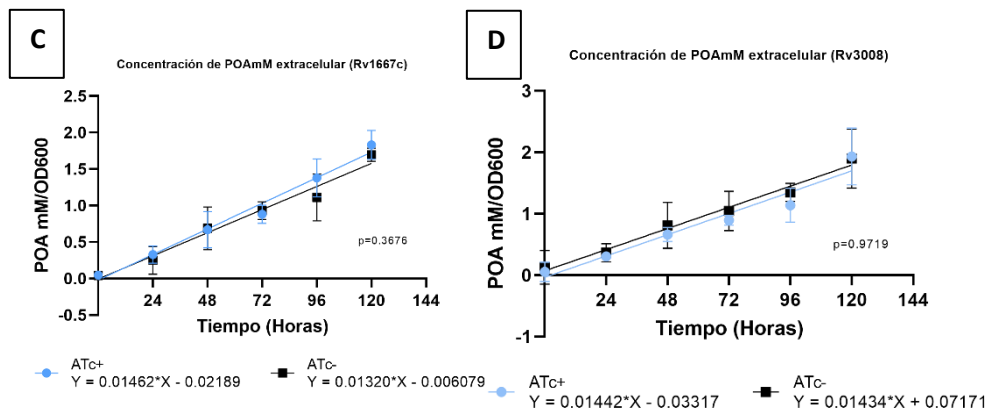
### 6.7.1. Concentración extracelular de ácido pirazinoico mM en cepas silenciadas y no silenciadas

En base a la curva de POA realizada (Anexo 2: Curva estándar de POAmM), en la cepa H37Rv/pLJR965, en la condición no silenciada (ATc -), la acumulación de POA a las 120 horas fue de 1.6837 mM y en la condición silenciada (ATc +), la acumulación de POA fue de 1.5247 mM a las 120 horas, demostrando que no hay diferencia significativa entre las pendientes de las condiciones ATc + y ATc - ( $p = 0.8794$ ), por lo tanto, el ATc no tuvo ningún efecto en la expulsión de POA y era lo que se esperaba ya que el plásmido no tiene ARNg que flanqueen algún gen.

Para el gen *Rv3756c*, en la condición no silenciada, se registró una concentración de POA 2.4003 mM a las 120 horas mientras que, en la condición silenciada, la acumulación de POA fue inferior, alcanzando 2.174 mM, pero ello es no significativo al comparar las pendientes de ambas condiciones (Figura 18 y Anexo 7)

Para los genes *Rv1667c* y *Rv3008*, las pendientes fueron de 0.01665 y 0.01442, respectivamente, con buenos ajustes de  $R^2$  (0.8628 y 0.9719), pero sin diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas ( $p > 0.1$ ) (Tabla 8).





**Figura 18:** Concentración extracelular de POA en cepas con silenciamiento y sin silenciamiento. **A-D.** Regresión lineal simple de la acumulación de POA en la cepa H37Rv/pLJR965, *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* en condiciones ATc+ y ATc-. Nota: los valores de R<sup>2</sup>, p < 0.05 entre ATc+ y ATc- están en la Tabla 9.

**Tabla 8:** Comparación de pendientes a partir de los valores de concentración acumulada de POA

Condición	Gen	Ecuación de la recta	Pendiente (m)	(IC 95%)	R <sup>2</sup>	Valor de p (ATc+ vs ATc-)
Cepas silenciadas	H37Rv-pLJR965	$Y = 0.01177 \cdot X + 0.1495$	0.01177	0.008713 - 0.01483	0.8064	0.8794
	<i>Rv3756c</i>	$Y = 0.02090 \cdot X - 0.2332$	0.0209	0.01667 - 0.02512	0.873	0.8291
	<i>Rv1667c</i>	$Y = 0.01665 \cdot X - 0.02494$	0.01665	0.01313 - 0.02017	0.8628	0.3673
	<i>Rv3008</i>	$Y = 0.01442 \cdot X - 0.03317$	0.01442	0.01132 - 0.01752	0.8585	0.9719

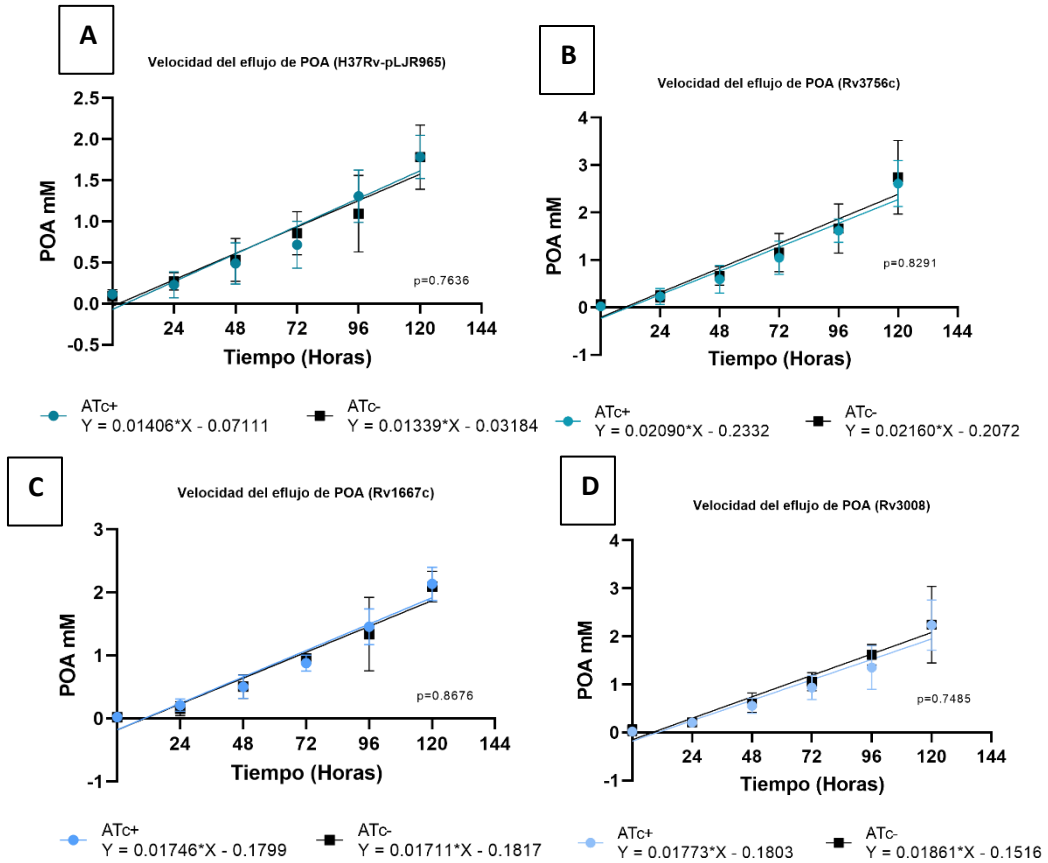
Nota: IC (Intervalos de confianza 95%)

### 6.7.2. Velocidad inicial del eflujo de POA mM en cepas silenciadas y no silenciadas

En general, todas las cepas muestran un comportamiento usual de la cepa H37Rv, donde hay incremento en la velocidad de eflujo de POA a lo largo del tiempo. En la cepa H37Rv/pLJR965, la velocidad de eflujo a las 120 horas fue comparable entre la condición no silenciada (ATc-) y la condición silenciada (ATc+), con 1.7817 mM/h y 1.784 mM/h, respectivamente, donde no se observa diferencia significativa (Anexo 8). Cuando el gen *Rv3756c* no fue silenciado alcanzó la velocidad de 2.744 mM/h y para la condición silenciada fue de 2.61 mM/h a las 120 horas. Los genes *Rv1667c* y *Rv3008* también mostraron un incremento en la velocidad de eflujo de POA sin silenciamiento (ATc-) con valores de 2.093 mM/h y 2.2433 mM/h y 2.1357 mM/h y 2.234 mM/h en la condición silenciada (ATc+) (Figura 19).

Además, no se encontraron diferencias significativas en las pendientes entre las condiciones ATc+ y ATc- dentro de cada cepa (p > 0.05), lo que sugiere que el

silenciamiento no afecta significativamente las velocidades de flujo de POA en las cepas evaluadas (Ver tabla 9).



**Figura 19:** Dinámica de la velocidad inicial de flujo de POA en cepas con silenciamiento y sin silenciamiento. **A-D.** Regresión lineal simple de velocidad inicial de flujo de POA en la cepa H37Rv/pLJR965, Rv3756c, Rv1667c y Rv3008 en condiciones ATc+ y ATc-. Nota: los valores de R<sup>2</sup>, p<0.05 entre ATc+ y ATc-, pendiente y la ecuación de la recta se encuentran en la Tabla 10.

**Tabla 9:** Comparación de pendientes a partir de los valores de la velocidad inicial del flujo de POA

Condición	Gen	Ecuación de la recta	Pendiente (m)	(IC 95%)	R <sup>2</sup>	p value (ATc+ vs ATc-)
Cepas silenciadas	H37Rv-pLJR965	Y = 0.01406*X - 0.07111	0.01406	0.01092 - 0.01720	0.849	0.7636
	Rv3756c	Y = 0.02090*X - 0.2332	0.0209	0.01667 - 0.02512	0.9262	0.8291
	Rv1667c	Y = 0.01746*X - 0.1799	0.01746	0.01460 - 0.02033	0.9124	0.8676
	Rv3008	Y = 0.01773*X - 0.1803	0.01773	0.01372 - 0.02174	0.8458	0.7485

Nota: IC (Intervalos de confianza 95%)

### 6.8. Evaluación a la susceptibilidad a pirazinamida en cepas silenciadas y no silenciadas (TEMA)

El MIC de isoniazida fue de 0.13 µg/ml, droga control, para todas las cepas y los pHs fueron de 6.22 y 6.8. Para H37Rv (pH de 6.8) a los 5 días la concentración mínima inhibitoria (MIC) para PZA fue de 400 µg/ml y para POA fue 200 µg/ml en ambas condiciones ATc+ y ATc-. En cambio, cuando se disminuye el pH a 6.2, el MIC para PZA y POA disminuye a 100 µg/ml (medido a los 7 días). En el caso de la cepa H37Rv/pLJR965 a un pH de 6.2, en PZA muestra un MIC de 200 µg/ml y para POA un MIC de 100 µg/ml, manteniéndose el mismo patrón en las dos condiciones. Un comportamiento similar a un pH de 6.2 lo mantienen las cepas *Rv3756c* y *Rv1667c* con un MIC en PZA de 100 µg/ml y para POA de 50 µg/ml y para *Rv3008* el MIC de PZA y POA fue de 100 µg/ml, demostrando que no existe resistencia a estos fármacos, estando bajo el efecto de silenciamiento y no silenciamiento. (Tabla 10) Además, no se registró crecimiento en INH para ninguna cepa.

**Tabla 10:** Actividad de PZA y POA en MTB H37Rv bajo las condiciones de ATc+ y ATc- (A,B,C,D,E,F)

**A**

Condición	H37Rv pH=6.8	Visibilidad de crecimiento bacteriano con PZA y POA(ug/ml)										MIC ATc+
		0	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600	
ATc+	PZA	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	PZA: 400 µg/ml
	POA	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	POA: 200 µg/ml
ATc-	PZA	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	MIC ATc-
	POA	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	PZA: 400 µg/ml
												POA: 200 µg/ml

**B**

Condición	H37Rv pH=6.2	Visibilidad de crecimiento bacteriano con PZA y POA(ug/ml)										MIC ATc+
		0	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600	
ATc+	PZA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	PZA: 100 µg/ml
	POA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	POA: 100 µg/ml
ATc-	PZA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	MIC ATc-
	POA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	PZA: 100 µg/ml
												POA: 100 µg/ml

**C**

Condición	H37Rv-pLJR965 pH=6.2	Visibilidad de crecimiento bacteriano con PZA y POA(ug/ml)										MIC ATc+
		0	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600	
ATc+	PZA	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	PZA: 200 µg/ml
	POA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	POA: 100 µg/ml
ATc-	PZA	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	MIC ATc-
	POA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	PZA: 200 µg/ml
												POA: 100 µg/ml

**D**

Condición	Rv3756c pH=6.2	Visibilidad de crecimiento bacteriano con PZA y POA(ug/ml)										MIC ATc+
		0	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600	
ATc+	PZA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	PZA: 100 µg/ml
	POA	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	POA: 50 µg/ml
ATc-	PZA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	MIC ATc-
	POA	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	PZA: 100 µg/ml
												POA: 50 µg/ml

**E**

Condición	Rv1667c pH=6.2	Visibilidad de crecimiento bacteriano con PZA y POA(ug/ml)										MIC ATc+
		0	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600	PZA: 100 µg/ml POA: 50 µg/ml
ATc+	PZA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	MIC ATc- PZA: 100 µg/ml POA: 50 µg/ml
	POA	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
ATc-	PZA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	PZA: 100 µg/ml POA: 50 µg/ml
	POA	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	

**F**

Condición	Rv3008 pH=6.2	Visibilidad de crecimiento bacteriano con PZA y POA(ug/ml)										MIC ATc+
		0	6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	1600	PZA: 100 µg/ml POA: 100 µg/ml
ATc+	PZA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	MIC ATc- PZA: 100 µg/ml POA: 100 µg/ml
	POA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
ATc-	PZA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	PZA: 100 µg/ml POA: 100 µg/ml
	POA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	

Nota: A. H37Rv (pH=6.8) B. H37Rv (pH=6.2). C. H37Rv/pLJR965 (pH= 6.2). D. H37Rv/Rv3756c (pH=6.2) E. H37Rv/Rv1667c (pH=6.2), F. H37Rv/Rv3008 (pH=6.2). Crecimiento bacteriano está representado con un (+) y donde no hubo crecimiento con un (-).

## VII. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto del silenciamiento transcripcional individual mediante CRISPRi de los genes *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008*, relacionados con bombas de eflujo, sobre la concentración y velocidad de expulsión de ácido pirazinoico (POA) y la susceptibilidad a pirazinamida (PZA) en *Mycobacterium tuberculosis*. A pesar de que se obtuvo una represión significativa de ARNm para *Rv3756c* (nivel de represión: 3.5; reducción del 70.27 %) y *Rv1667c* (nivel de represión: 26.11; reducción del 96.07 %), y una represión baja en *Rv3008* (1.8; 42.57 %), no se observaron diferencias significativas en el eflujo de POA ni en la susceptibilidad a PZA o POA al comparar condiciones con y sin inducción por ATc (Figura 13 y Tabla 7).

En los ensayos de eflujo, la cepa control H37Rv:pLJR965 mostró valores similares entre condiciones (1.68 mM sin ATc vs. 1.52 mM con ATc; velocidad inicial: 1.78 vs. 1.784 POA mM/h), lo que confirma que el ATc no afecta el sistema por sí solo. Para *Rv1667c*, a pesar del silenciamiento más marcado, no se evidenció una diferencia significativa en la concentración extracelular de POA (ATc- = 1.69 vs. ATc+ = 1.83 mM) ni en la velocidad de eflujo (ATc- = 2.093 vs. ATc+ = 2.13 POA mM/h). Resultados similares se obtuvieron para *Rv3756c* y *Rv3008*, donde tampoco se observaron diferencias significativas en los parámetros

evaluados, a pesar de las magnitudes de silenciamiento alcanzadas (Tabla 8 y Anexo 7).

Estos hallazgos contrastan con estudios previos donde silenciamientos equivalentes o incluso menores, como en el caso de *Rv1258c* (represión: 5.94), generaron una disminución significativa del 39.94 % en la concentración extracelular de POA y del 65.4 % en la velocidad de eflujo, junto con un aumento en la susceptibilidad a PZA (25). Esta diferencia podría explicarse por una compensación funcional entre múltiples bombas de eflujo, un fenómeno ya descrito en *M. tuberculosis*, donde la eliminación o silenciamiento de un solo gen puede ser insuficiente para modificar el fenotipo debido a la acción redundante de otras bombas (40).

Asimismo, en el caso de *Rv0191*, se reportó que un silenciamiento de 13.33 mediante CRISPRi tampoco provocó cambios observables, pero su delección completa por ORBIT sí redujo el eflujo de POA, aunque en menor medida que *Rv1258c*. Esto refuerza la hipótesis de que la represión parcial mediante CRISPRi puede no ser suficiente en algunos genes, especialmente cuando su función es compartida con otros transportadores.

Otro aspecto a considerar es la posible influencia de factores técnicos, como el diseño de los ARN guías. Para *Rv3008*, se utilizó el segundo mejor ARNg sugerido por el software Pebble (<https://pebble.rockefeller.edu/tools/sgrna-design/>), debido a la proximidad del primero con el gen esencial *gatB*, lo cual podría haber limitado el efecto del silenciamiento y generado un valor de represión insuficiente (1.5), con riesgo de efecto polar (41).

Otra hipótesis plausible es que el silenciamiento logrado, aunque significativo en algunos genes, no alcanzó el umbral funcional necesario para generar un cambio fenotípico. Rock et al. (42) sugieren que se requiere una represión de al menos cuatro veces para detectar efectos observables en *M. tuberculosis*. En el presente estudio, solo *Rv1667c* superó este umbral. Sin embargo, incluso en este caso no se evidenció una alteración en el eflujo, lo cual refuerza la idea de mecanismos compensatorios (40) o, alternativamente, que este gen no cumple un rol principal en la expulsión de POA.

También debe considerarse que el diseño de los ARN guías puede haber limitado la eficiencia del silenciamiento, especialmente en *Rv3008*, cuyo segundo ARN

guía se eligió para evitar un efecto polar sobre el gen esencial *gatB* (Anexo 9 y 10). En ese sentido, se necesitaría usar otros ARN guías o generar una delección génica para poder observar su comportamiento y llegar a una conclusión sobre su rol en la expulsión de POA.

Desde el punto de vista metodológico, las condiciones experimentales fueron cuidadosamente controladas: se descartó que el inductor ATc afecte el crecimiento de la bacteria, como se muestra en los ensayos de viabilidad (Figura 15). Esta precaución es clave, ya que cambios en el crecimiento podrían interferir con la interpretación del efecto del silenciamiento. Sin embargo, se reconoce como limitación experimental la falta de delecciones completas de los genes mediante otras estrategias, como ORBIT o recombinación homóloga, que podrían confirmar el rol funcional de estos genes sin el sesgo de represión parcial que puede generar CRISPRi. Además, no se evaluaron posibles mutaciones espontáneas podrían haber modulado la respuesta a PZA o POA.

Finalmente, los resultados del ensayo TEMA confirman que las cepas silenciadas no mostraron cambios en la susceptibilidad a PZA o POA, reforzando los resultados del ensayo de eflujo. Estas observaciones, aunque negativas, son relevantes para descartar el papel central de los genes estudiados en el transporte de POA, y sugieren que la resistencia a PZA es un fenómeno multifactorial, posiblemente dependiente de interacciones entre varias bombas de eflujo y otras rutas metabólicas aún no caracterizadas.

A través del ensayo cualitativo y cuantitativo TEMA, se evaluó la susceptibilidad de las cepas de *M. tuberculosis* inducidas y no inducidas al silenciamiento génico frente a pirazinamida (PZA), ácido pirazinoico (POA) e isoniacida (INH) como control. La cepa silvestre mostró crecimiento hasta 400 µg/ml en PZA y 200 µg/ml en POA a pH 6.8, mientras que a pH 6.2 —condición que favorece la actividad bactericida de la PZA (34)— el crecimiento fue limitado a 100 µg/ml para ambas drogas (Tabla 10). En todas las condiciones evaluadas, las cepas silenciadas no mostraron diferencias en la susceptibilidad respecto a sus controles sin inducción, manteniéndose dentro del rango del MIC reportado en estudios previos.

Estos resultados confirman que el silenciamiento transcripcional de *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* no afecta la susceptibilidad a PZA ni a POA, y son consistentes

con los datos obtenidos en los ensayos de eflujo, donde tampoco se observaron cambios significativos en la concentración extracelular ni en la velocidad de expulsión de POA. Aunque se trata de resultados negativos, estos hallazgos son relevantes, ya que permiten descartar el papel central de estos genes como bombas de eflujo implicadas directamente en el transporte de POA. Además, refuerzan la hipótesis de que la resistencia a PZA es un fenómeno multifactorial, probablemente mediado por interacciones complejas entre diversas bombas de eflujo y otras rutas metabólicas aún no caracterizadas.

### VIII. CONCLUSIONES

- El nivel de represión individual de los genes silenciados *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008* fue de 3.5, 26.11 y 1.80, respectivamente, en comparación con las cepas no inducidas al silenciamiento. Pero el silenciamiento individual fue significativo para los genes *Rv3756c* y *Rv1667c*.
- El silenciamiento individual en los genes con los que se trabajaron no afectó en el crecimiento de la cepa.
- No se vio una disminución de POA mM extracelular acumulada y en la velocidad inicial de eflujo de POA para las cepas silenciadas *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008*.
- No se observó resistencia a PZA y POA cuando se silenciaron los genes *Rv3756c*, *Rv1667c* y *Rv3008*.
- Los resultados obtenidos sugieren que las bombas de eflujo evaluadas no participarían directamente en la expulsión de POA. Por lo tanto, se sugiere considerar otros posibles blancos terapéuticos para el desarrollo de tratamientos clínicos frente a *Mycobacterium tuberculosis*.
- Se recomienda evaluar estas bombas de eflujo mediante la delección completa de sus genes, a fin de determinar con mayor precisión su relevancia en la expulsión de POA.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la tuberculosis 2024 [Internet]. Ginebra: OMS; 2024. Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>
2. Lamont EA, Dillon NA, Baughn AD. The bewildering antitubercular action of pyrazinamide. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2020 Mar 4;84(2):e00070-19. doi: 10.1128/MMBR.00070-19. PMID: 32132245; PMCID: PMC7062198.
3. 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.* 1999 Apr;181(7):2044–9. doi: 10.1128/JB.181.7.2044-2049.1999. PMID: 10094680; PMCID: PMC93615.
4. Zimic M, Fuentes P, Gilman RH, Gutiérrez AH, Kirwan D, Sheen P. Pyrazinoic acid efflux rate in *Mycobacterium tuberculosis* is a better proxy of pyrazinamide resistance. *Tuberculosis (Edinb).* 2012 Jan;92(1):84–91. doi: 10.1016/j.tube.2011.09.002. PMID: 22004792; PMCID: PMC3269536.
5. Lynch AS. Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? An industry view. *Biochem Pharmacol.* 2006 Mar 30;71(7):949–56. doi: 10.1016/j.bcp.2005.10.021. PMID: 16290174.
6. Zhang Y, Zhang J, Cui P, Zhang Y, Zhang W. Identification of novel efflux proteins Rv0191, Rv3756c, Rv3008, and Rv1667c involved in pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Jul 25;61(8):e00940-17. doi: 10.1128/AAC.00940-17. PMID: 28584158; PMCID: PMC5527661.
7. Liu J, Shi W, Zhang S, Hao X, Maslov DA, Shur KV, Bekker OB, Danilenko VN, Zhang Y. Mutations in efflux pump Rv1258c (Tap) cause resistance to pyrazinamide, isoniazid, and streptomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol.* 2019 Feb 19;10:216. doi: 10.3389/fmicb.2019.00216. PMID: 30837962; PMCID: PMC6389670.
8. Wong AI, Rock JM. CRISPR interference (CRISPRi) for targeted gene silencing in mycobacteria. *Methods Mol Biol.* 2021;2314:343–64. doi: 10.1007/978-1-0716-1460-0\_16.

9. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST). Mycobacterium tuberculosis - Bacterias - Agentes Biológicos. Madrid: INSST; 2021 Disponible en: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/mycobacterium-tuberculosis>
10. Organización Mundial de la Salud. Tuberculosis. Ginebra: OMS; 2025. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
11. Organización Panamericana de la Salud. Directrices unificadas de la OMS sobre el tratamiento de la tuberculosis farmacorresistente. Washington, D.C.: OPS; 2020. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52261>
12. Pirofski LA, Casadevall A. The state of latency in microbial pathogenesis. *J Clin Invest.* 2020;130(9):4525–31. doi: 10.1172/JCI136221.
13. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). Tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR) en las Américas. 2016. Disponible en: [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12129:tuberculosis-multidrogorresistente-tb-mdr-en-las-americas&Itemid=0&lang=es](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12129:tuberculosis-multidrogorresistente-tb-mdr-en-las-americas&Itemid=0&lang=es)
14. Peterson ND, Rosen BC, Dillon NA, Baughn AD. Uncoupling environmental pH and intrabacterial acidification from pyrazinamide susceptibility in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Dec;59(12):7320–6. doi: 10.1128/AAC.00967-15. PMID: 26369957; PMCID: PMC4649215.
15. Stoffels K, Mathys V, Fauville-Dufaux M, Wintjens R, Bifani P. Systematic analysis of pyrazinamide-resistant spontaneous mutants and clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Oct;56(10):5186–93. doi: 10.1128/AAC.05385-11. PMID: 22825123; PMCID: PMC3457413.
16. Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE 3rd, Wang H, Zhang W, Zhang Y. Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis. *Science.* 2011 Sep 16;333(6049):1630–2. doi: 10.1126/science.1208813. PMID: 21835980; PMCID: PMC3502614.

17. Dillon NA, Peterson ND, Feaga HA, Keiler KC, Baughn AD. Anti-tubercular activity of pyrazinamide is independent of trans-translation and RpsA. *Sci Rep.* 2017;7:6135. doi: 10.1038/s41598-017-06415-5.
18. Vallejos-Sánchez K, Lopez JM, Antiparra R, Toscano E, Saavedra H, Kirwan DE, Amzel LM, Gilman RH, Maruenda H, Sheen P, Zimic M. Mycobacterium tuberculosis ribosomal protein S1 (RpsA) and variants with truncated C-terminal end show absence of interaction with pyrazinoic acid. *Sci Rep.* 2020 May 20;10(1):8356. doi: 10.1038/s41598-020-65173-z. PMID: 32433489; PMCID: PMC7239899.
19. Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, Abe C. Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis.* 1997;78(2):117–22. doi: 10.1016/s0962-8479(98)80004-x. PMID: 9692180.
20. Petrella S, Gelus-Ziental N, Maudry A, Laurans C, Boudjelloul R, Sougakoff W. Crystal structure of the pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. *PLoS One.* 2011;6(1):e15785. doi: 10.1371/journal.pone.0015785.
21. Ali A, Khan MT, Khan A, Ali S, Chinnasamy S, Akhtar K, Shafiq A, Wei DQ. Pyrazinamide resistance of novel mutations in *pncA* and their dynamic behavior. *RSC Adv.* 2020 Sep 28;10(58):35565–73. doi: 10.1039/d0ra06072k. PMID: 35515677; PMCID: PMC9056903.
22. Sayahi H, Pugliese KM, Zimhony O, Jacobs WR, Shekhtman A, Welch JT. Analogs of the antituberculous agent pyrazinamide are competitive inhibitors of NADPH binding to *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I. *Chem Biodivers.* 2012;9(11):2582–96. doi: 10.1002/cbdv.201200291.
23. Baughn AD, Deng J, Vilchèze C, Riestra A, Welch JT, Jacobs WR Jr, Zimhony O. Mutually exclusive genotypes for pyrazinamide and 5-chloropyrazinamide resistance reveal a potential resistance-proofing strategy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Dec;54(12):5323–8. doi: 10.1128/AAC.00529-10. PMID: 20876380; PMCID: PMC2981270.
24. Gopal P, Nartey W, Ragunathan P, Sarathy J, Kaya F, Yee M, Setzer C, Manimekalai MSS, Dartois V, Grüber G, Dick T. Pyrazinoic acid inhibits mycobacterial coenzyme A biosynthesis by binding to aspartate decarboxylase

- PanD. ACS Infect Dis. 2017 Nov 10;3(11):807–19. doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00079. PMID: 28991455; PMCID: PMC5734868.
25. Flores Bancayan CA. Estudio del rol de los genes Rv0191 y Rv1258c en el eflujo de ácido pirazinoico y la resistencia a pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis* [Tesis de maestría]. Lima (Perú): Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2024. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12866/16030>
  26. Saier MH Jr, Paulsen IT. Phylogeny of multidrug transporters. Semin Cell Dev Biol. 2001 Jun;12(3):205–13. doi: 10.1006/scdb.2000.0246. PMID: 11428913.
  27. Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Rev. 2000 Oct;24(4):449–67. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00550.x.
  28. Kushal G, Pathak R, Tandon R, Rathor N, Sinha R, Bose M, Varma-Basil M. Differential expression of efflux pump genes of *Mycobacterium tuberculosis* in response to varied subinhibitory concentrations of antituberculosis agents. Tuberculosis (Edinb). 2015;95(2):155–61. doi: 10.1016/j.tube.2015.01.005.
  29. Sengupta DC, Sengupta J. Application of graph entropy in CRISPR and repeats detection in DNA sequences. J Biomed Sci Eng. 2016 Oct 26;6(3):41–51. Disponible en: [https://www.scirp.org/\(S\(czeh2tfqw2orz553k1w0r45\)\)/journal/paperinformation.aspx?paperid=71504](https://www.scirp.org/(S(czeh2tfqw2orz553k1w0r45))/journal/paperinformation.aspx?paperid=71504)
  30. Chávez-Jacobo VM. El sistema de edición genética CRISPR/Cas y su uso como antimicrobiano específico. TIP Rev Especial Cienc Químico-Biológicas. 2018 Dic;21(2):e201825. doi: 10.22201/fesz.23958723e.2018.2.5. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-888X2018000200200&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2018000200200&lng=es)
  31. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. Science. 2008 Dec 19;322(5909):1843–5. doi: 10.1126/science.1165771. PMID: 19095942; PMCID: PMC2695655.
  32. Alcántara R, Fuentes P, Antiparra R, Santos M, Gilman RH, Kirwan DE, Zimic M, Sheen P. MODS-Wayne, a colorimetric adaptation of the microscopic-observation drug susceptibility (MODS) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamide resistance from sputum samples. J Clin Microbiol.

- 2019 Jan 30;57(2):e01162-18. doi: 10.1128/JCM.01162-18. PMID: 30429257; PMCID: PMC6355525.
33. Meinzen C, Proaño A, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Zimic M, Sheen P. A quantitative adaptation of the Wayne test for pyrazinamide resistance. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016 Jul;99:41–6. doi: 10.1016/j.tube.2016.03.011.
  34. Caviedes L, Delgado J, Gilman RH. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2002 May;40(5):1873–4. doi: 10.1128/JCM.40.5.1873-1874.2002. PMID: 11980982; PMCID: PMC130930.
  35. Werngren J, Sturegård E, Juréen P, Ängeby K, Hoffner S, Schön T. Reevaluation of the critical concentration for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against pyrazinamide using wild-type MIC distributions and *pncA* gene sequencing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar;56(3):1253–7. doi: 10.1128/AAC.05894-11. PMID: 22203587; PMCID: PMC3294906.
  36. Morlock GP, Crawford JT, Butler WR, Brim SE, Sikes D, Mazurek GH, Woodley CL, Cooksey RC. Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Sep;44(9):2291–5. doi: 10.1128/AAC.44.9.2291-2295.2000. PMID: 10952570; PMCID: PMC90060.
  37. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*. 1997;69(2):581–93. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x.
  38. Sambrook J, Russell DW. The Inoue method for preparation and transformation of competent *E. coli*: “ultra-competent” cells. *Cold Spring Harb Protoc*. 2006;2006(1):pdb.prot3944. doi: 10.1101/pdb.prot3944.
  39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*. 2001 Dec 1;25(4):402–8.
 

Disponibile en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046202301912629>
  40. Balganes M, Dinesh N, Sharma S, Kuruppath S, Nair AV, Sharma U. Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):e06003-11. doi: 10.1128/aac.06003-11.

41. Zhang R, Xu W, Shao S, Wang Q. Gene silencing through CRISPR interference in bacteria: current advances and future prospects. *Front Microbiol.* 2021;12:635227. doi: 10.3389/fmicb.2021.635227.
42. Rock JM, Hopkins FF, Chavez A, Diallo M, Chase MR, Gerrick ER, Pritchard JR, Church GM, Rubin EJ, Sasseti CM, Schnappinger D, Fortune SM. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nat Microbiol.* 2017 Feb 6;2:16274. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.274. PMID: 28165460; PMCID: PMC5302332.

## **ANEXOS**

### **Anexo 1. Protocolo de bioseguridad P3**

#### **Ambiente aislado o ambiente de bioseguridad P3**

Lugar de acceso restringido, señalizado adecuadamente al ingresar y que cuenta con las especificaciones referentes a la bioseguridad para el trabajo con micobacterias. Este lugar, cuenta a su vez con 2 ambientes: pre-cámara y cámara (P3). Ambos cuentan con un sistema de presión negativa cuyo mantenimiento se realiza cada 4 meses e involucra especialmente el comprobar el normal funcionamiento de las presiones y cambios de filtros.

**La zona denominada pre-cámara:** Cuenta con presión negativa respecto al ambiente exterior. El ambiente cuenta con un indicador de presión diferencial Dwyer® Magnehelic® para el monitoreo visual de la presión (.20-.30 Pulgadas de agua). En esta zona se recepciona el material biológico contenido en coolers. Es el ambiente donde el personal de laboratorio se coloca la primera parte de la indumentaria de protección personal para el ingreso a la P3: respiradores N95, mandil azul, amarillo y/o descartable (adicional al mandil blanco utilizado en todas las áreas comunes del laboratorio), gorro y/o protector de calzado descartable. Cuenta con una mesa para la lectura de las baciloscopias, un tacho rojo con bolsa de autoclave roja para el descarte de mandiles, guantes, protector de calzado, etc. Adicionalmente tiene un mural en una de sus paredes donde se registra:

- Relación de personal, coordinadores y estudiantes autorizados para su ingreso.
- Cuadro de control de temperatura de equipos semestral con sus responsables.
- Lista de equipos de protección personal y lugar de uso.
- Distribución de toma corriente.
- Medidas cuando presión negativa deja de funcionar.

**La zona denominada cámara o P3:** Cuenta con presión negativa respecto a la precámara y respecto al ambiente exterior. Cuenta igualmente al ingresar con un medidor de presión diferencial para el monitoreo visual de la presión. Con respecto al exterior, la presión negativa es de .30-.40 Pulgadas de agua. En la P3 se realiza el trabajo con el material biológico: descontaminaciones, cultivos, pruebas de susceptibilidad, crioconservaciones etc. Al entrar a esta zona se coloca

el personal la segunda parte de la indumentaria de protección personal: mandil de tela reutilizable, gorras y guantes.

El ambiente cuenta con:

- 3 Cabinas de Seguridad Biológica (CSB)
- Centrifuga refrigerada para uso en los procesos de concentración.
- Estufas (10) para incubar muestras y/o cepas procesadas.
- Refrigeradoras (2): Una para conservar el material biológico y la otra (friobar) para el stock de reactivos de uso diario.
- Equipos como: vortex (2), pipetas automáticas, hot-plate, centrifuga para microtubos, secador de láminas etc.
- Reloj de pared para evitar el uso del reloj pulsera.
- Desinfectante, lejía y bolsas de autoclave para la esterilización del material infeccioso.
- Microscopios invertidos (3) para lectura de los cultivos.
- Mesas para colocar los materiales de uso diario y anotaciones.
- Mueble de madera blanco para la conservación por corto tiempo de tubos y placas
- Petri con cultivos positivos antes de su esterilización y descarte respectivo.
- Ropa o Kit de emergencia en caso de accidentes (vestimenta constituida por un pantalón, chaqueta y mandil).
- Lámpara germicida UV portátil a ser usada en caso de accidentes o derrames.
- Autoclave para esterilizar el material producido en los procesos sean infecciosos o no.
- Lavadero utilizado para el lavado y procesos de coloración.
- Envase rojo para colocar material punzo cortante de descarte (mayormente láminas).
- Tachos con bolsas de autoclave roja con tapa para el descarte de guantes y para el resto de materiales a esterilizar producido en los procesos.

**a. Aspectos de bioseguridad y bioprotección**

Todas las medidas de control de riesgo se encuentran detallados en el Manual de Normas de Bioseguridad de *Mycobacterium*. Las normas siguen los procesos descritos en el Tuberculosis Biosafety Manual de la Organización Mundial de la

Salud en su última edición publicado en el 2012. Los detalles de los procesos se encuentran en el archivo Trabajo Lab *Mycobacterium*: Descripción detallada de los procesos en el Laboratorio de *Mycobacterium* LID 118, el cual se actualiza cada año.

Para el descarte de desechos en el laboratorio P3 y mantenimiento de limpieza en el laboratorio, se realizarán los siguientes pasos:

**b. Descarte de material contaminado**

- Por regla general del laboratorio, todo material biológico, material descartable y no descartable utilizado en los procesos será previamente esterilizado por autoclave en la P3 antes de salir al exterior.
- Los materiales más comunes usados en el laboratorio para su esterilización son los siguientes y tendrán la siguiente disposición:
  - Material descartable y no descartable para manipular las muestras como pipetas de transferencia, tips o puntas, combitips, loops, etc. son sumergidos en un volumen aprox. de 1 litro de lejía al 10% en envases plásticos tipo jarra y permanecerán mínimo 1 hora dentro de la CSB con exposición a la luz UV en bolsas de autoclave para luego ser esterilizados (No se colocará material adicional en estas bolsas). Los envases deben llenarse como máximo hasta  $\frac{3}{4}$  partes de su volumen y no sobresaturarlo.
  - Material biológico contenido en tubos plástico de cultivo, placas Petri etc. serán colocados convenientemente en bolsas de autoclave dentro de la CSB y permanecerán con exposición a la luz UV por lo menos 1 hora antes de ser retirados para su autoclavado.
  - Material usado con suspensiones bacterianas como matraces y tubos de vidrio deben igualmente colocarse en jarras de plástico (para evitar rupturas) y en bolsas de autoclave. Tendrán el mismo trato que los materiales señalados líneas arriba.
  - Material usado en cabina como guantes, papel toalla, viales, tubos plástico de 15 y 50 ml., serán colocados en bolsas con cierre tipo ziploc. Luego serán expuestos a la luz UV por 1 hora dentro de la CSB y finalmente se colocaran en bolsas de autoclave en el tacho de uso

común destinado para este tipo de material antes de su autoclavado.

- Todas las bolsas de autoclave con material a esterilizar serán identificadas con el nombre de la persona y grupo al que pertenece.
- Luego de su exposición a la luz UV serán retiradas y dispuestas adecuadamente en los recipientes de plástico lavables con tapa rotulados claramente como: “MATERIAL PARA AUTOCLAVAR”. Estas bolsas luego se retiran para su autoclavado a 121°C por 60 minutos. Evitar sobrellenar la autoclave.
- La disposición final de las bolsas de autoclave con el material ya autoclavado son efectuadas por el personal del área asignado por cada grupo.
- No se debe agregar en las bolsas de autoclave directamente elementos cortantes o punzantes como tips, pipetas pasteur, láminas portaobjetos, combitips, etc.; éstos se colocan primero en descartadores herméticos apropiados de paredes rígidas y luego serán introducidos en bolsas de autoclave para su autoclavado.
- El material que no va a ser autoclavado y que tienen que ser retirados luego de la CSB son desinfectados con papel toalla embebido con TEGO al 5 % y expuesto a la luz UV por lo menos 15 minutos. Por ejemplo: tubos de plástico sin usar, cajas de tips u otros materiales (todo este material especialmente las cajas con tips deben estar identificados con el nombre y grupo al que pertenecen).
- Los cultivos en placa Petri deben de ser adecuadamente sellados con cintas de polietileno –Parafilm para su incubación al igual que para su descarte. Opcionalmente para el descarte se puede colocar en bolsas con cierre.
- En el caso de placas con cultivo líquido colocarlas en tachos con tapa en bolsas de autoclave para evitar derrames hasta su posterior esterilización.
- Finalmente, todo el material autoclavado se coloca en un tacho grande con tapa identificado como “MATERIAL AUTOCLAVADO” el cual es finalmente transportado por el personal de cada grupo designado para su descarte final.

**c. Protección dentro del área de bioseguridad**

- En la pre cámara, colocarse el respirador de protección N95, el mandil

adicional al blanco (azul, amarillo o descartable) y cubre calzados. Dentro del ambiente de seguridad P3 colocarse el mandil verde, guantes y gorra.

- Usar permanentemente guantes para manipular material sea infeccioso o no en el área de bioseguridad (P3) y un par de guantes adicionales para manipular material infeccioso dentro de la CSB los cuales deben ser desechados dentro de la misma.
  
- Colocarse lentes de protección para los ojos al manipular material de descarte que contenga lejía o manipular viales de criopreservación en el equipo de la -70, así también como guantes criogénicos para su manipulación.
  
- Los mandiles y/o gorras de tela deben ser usados por 1-2 meses dependiendo de su uso y antes de su lavado, son esterilizados dentro de bolsas de autoclave.

Se hará uso de dos descontaminantes:

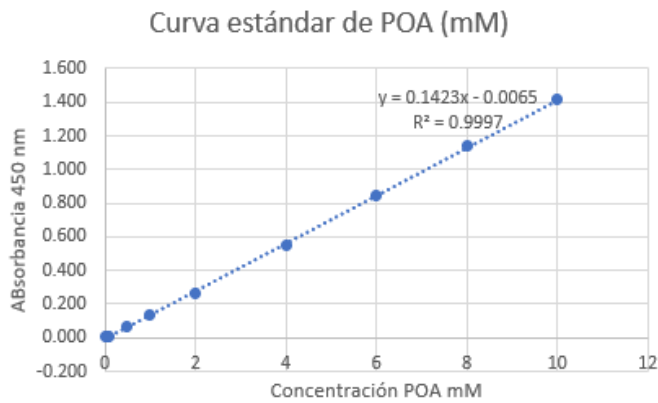
- Lejía comercial al 5% : Preparar una **dilución 1:10** para cada proceso. En 1 litro de 0.5% lejía en una jarra que equivale a aprox.a media jarra de la siguiente manera:
  - Medir 100 ml de lejía comercial en un beaker de plástico (caño de la P3) y agregar a una jarra.
  - Medir 900 ml de agua de caño con una probeta de plástico y agregar a la misma jarra.

- En las jarras de descarte no puede haber menos de 1 litro de 0.5% de lejía.
- TEGO al 5%: es preparado en una probeta de plástico de 500 ml, se agrega 25ml de TEGO y se completa con agua destilada. El TEGO diluido es transferido a las botellas con spray o envase propio que se usa en cabina.
- Indicaciones para algunos equipos:
  - Densitómetro.
  - Incubadora.

- Vórtex
- Cabina de bioseguridad
- Centrífuga
- Autoclave
- Refrigeradora
- Shaker

Las cabinas de bioseguridad son certificadas periódicamente. Anualmente se realiza el mantenimiento preventivo que consiste en verificar el buen funcionamiento del flujo, la limpieza tanto interna como externa y el cambio de los fluorescentes germicida UV.

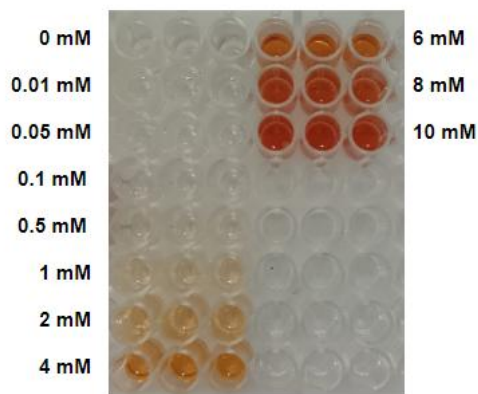
**Anexo 2.** Curva estándar de POA mM



Nota: la regresión lineal positiva fuerte con un  $R^2$  de 0.9997.  $y = 0.1423x - 0.0065$

- Concentración de POA mM con su respectivo valor de absorbancia a un OD450 nm y colorimetría de los estándares de POA mM usando la técnica Wayne

mM POA (x)	Promedio Rep (y)
0.01	0.004
0.05	0.009
0.1	0.012
0.5	0.064
1	0.133
2	0.268
4	0.546
6	0.841
8	1.143
10	1.421



Nota: La curva estándar se realizó utilizando concentraciones de POA desde 0.1 mM hasta 10 mM. Se obtuvo una fuerte correlación lineal entre la densidad óptica medida a 450 nm y la concentración de POA, con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.9997$ , lo que indica un excelente ajuste del modelo. A la derecha, se muestra la imagen colorimétrica del método de Wayne, la cual permite discriminar visualmente las diferentes concentraciones de POA a partir de la intensidad de color obtenida.

Además, se realizó ensayos de reproducibilidad de las concentraciones 0 mM (Blanco), 1 mM, 4 mM y 10 mM. Los cuales tuvieron los siguientes coeficientes 11.06%, 5.32%, 2.15% y 2.12% respectivamente. Y, se obtuvieron valores de recuperación entre 84.8% -98.6%. Esto con el fin de corroborar la reproducibilidad de las medidas de absorbancia a esa concentración.

- Validación de blanco (0mM)

Días	Blanco			
	OD1	OD2	OD3	Promedio
0	0.085	0.085	0.086	0.085
1	0.083	0.084	0.085	0.084
2	0.083	0.084	0.085	0.084
3	0.084	0.085	0.085	0.085
4	0.082	0.085	0.087	0.085
5	0.084	0.083	0.084	0.084
6	0.084	0.086	0.089	0.086
Promedio				0.085
Desviación estándar				0.001
Coeficiente de variación (%)				1.013

- Validación de Reproducibilidad de 1 mM de POA

1 mM								
Repetición	OD1	OD2	OD3	Promedio	Promedio OD corregido	mM POA teórico	mM POA experimental	% de recuperación
1	0.206	0.205	0.246	0.219	0.134	1	0.986	98.6
2	0.208	0.196	0.202	0.202	0.117	1	0.868	86.8
3	0.204	0.205	0.211	0.207	0.122	1	0.901	90.1
4	0.208	0.206	0.247	0.220	0.135	1	0.996	99.6
5	0.210	0.198	0.204	0.204	0.119	1	0.881	88.1
6	0.216	0.208	0.212	0.212	0.127	1	0.936	93.6
7	0.209	0.208	0.248	0.222	0.137	1	1.006	100.6
8	0.212	0.199	0.207	0.206	0.121	1	0.897	89.7
9	0.208	0.209	0.213	0.210	0.125	1	0.923	92.3
Promedio							0.933	
Desviación estándar							0.049	
Coeficiente de variación (%)							5.240	

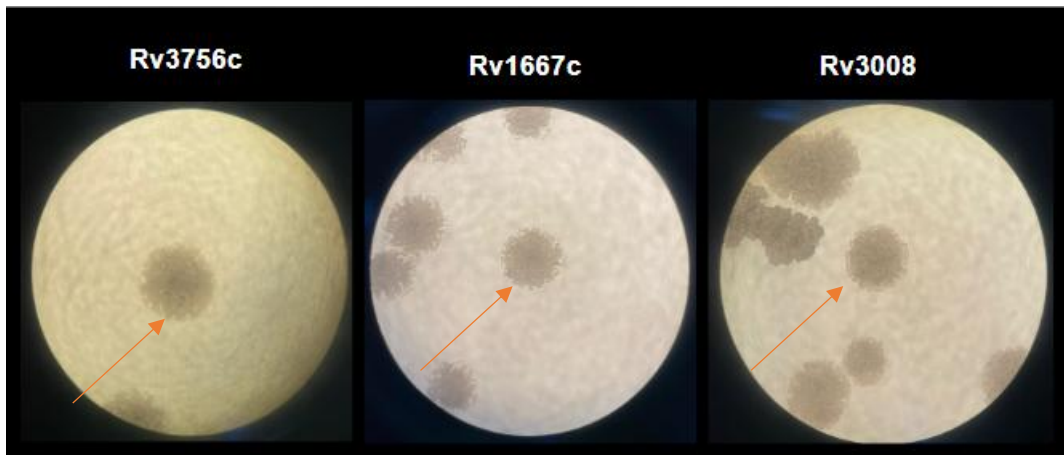
- Validación de Reproducibilidad de 4 mM de POA

4 mM								
Repetición	OD1	OD2	OD3	Promedio	Promedio OD corregido	mM POA teórico	mM POA experimental	% de recuperación
1	0.584	0.588	0.591	0.588	0.503	4	3.577	89.4
2	0.614	0.617	0.620	0.617	0.532	4	3.785	94.6
3	0.613	0.617	0.621	0.617	0.532	4	3.785	94.6
4	0.623	0.627	0.629	0.626	0.541	4	3.851	96.3
5	0.623	0.626	0.628	0.626	0.541	4	3.844	96.1
6	0.614	0.620	0.624	0.619	0.534	4	3.799	95.0
7	0.618	0.622	0.624	0.622	0.537	4	3.816	95.4
8	0.617	0.620	0.625	0.621	0.536	4	3.810	95.3
9	0.625	0.627	0.636	0.629	0.544	4	3.870	96.8
Promedio							3.793	
Desviación estándar							0.081	
Coeficiente de variación (%)							2.140	

- Validación de Reproducibilidad de 10 mM de POA

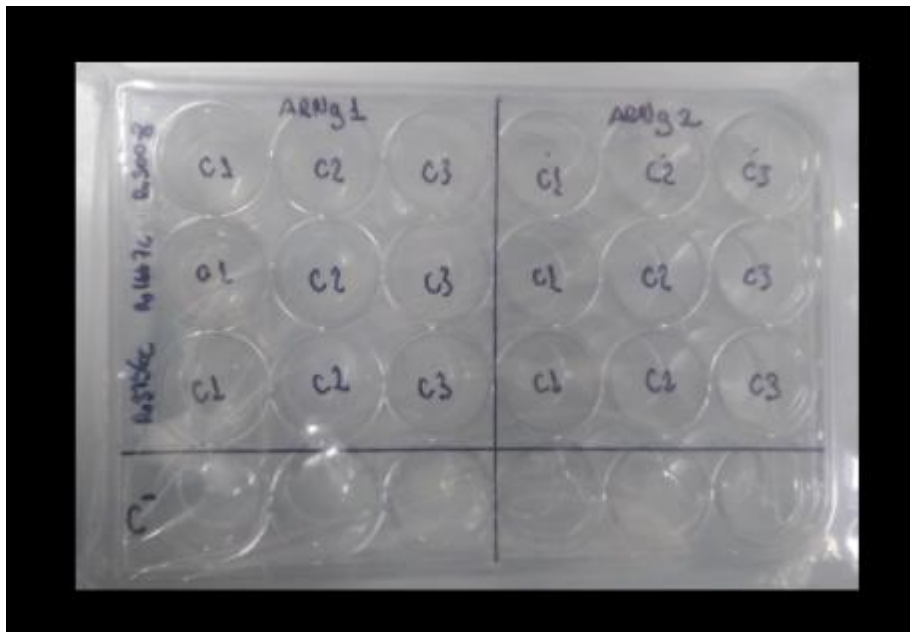
10 mM								
Repetición	OD1	OD2	OD3	Promedio	Promedio OD corregido	mM POA teórico	mM POA experimental	% de recuperación
1	1.323	1.333	1.339	1.332	1.247	10	8.808	88.1
2	1.422	1.363	1.376	1.387	1.302	10	9.194	91.9
3	1.416	1.416	1.416	1.416	1.331	10	9.397	94.0
4	1.402	1.405	1.423	1.410	1.325	10	9.357	93.6
5	1.403	1.406	1.409	1.406	1.321	10	9.329	93.3
6	1.418	1.408	1.420	1.415	1.330	10	9.395	93.9
7	1.428	1.442	1.446	1.439	1.354	10	9.558	95.6
8	1.413	1.412	1.411	1.412	1.327	10	9.369	93.7
9	1.417	1.394	1.415	1.409	1.324	10	9.347	93.5
Promedio							9.306	
Desviación estándar							0.197	
Coeficiente de variación (%)							2.120	

**Anexo 3:** Colonias transformadas aisladas de MTB.



**Nota:** Las colonias señaladas con la flecha roja corresponden a las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* transformadas. Esta marcación se realiza con el objetivo de facilitar su identificación, evitar confusión con posibles contaminaciones y permitir un reconocimiento oportuno para futuros trabajos experimentales.

- Crecimiento aislado de las colonias transformadas seleccionadas en cultivo 7H9 con kanamicina



Nota: La colonia se dejó en crecimiento durante una semana en 300  $\mu$ l de medio 7H9 suplementado con OADC, Tween al 10 % y kanamicina (10  $\mu$ g/ml). Este método permite aislar oportunamente las colonias, especialmente en casos donde estas crecen muy pequeñas o agrupadas.

**Anexo 4:** Extracción de ARN de las cepas silenciadas y no silenciadas.

● **Réplica biológica 1:**

Réplica biológica 1		Concentración de ARN no tratado y purificado (ng/μl)						A260/280				A260/230			
ID	Tratamiento	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Volumen	Cantidad de ARN	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio
pLJR965	ATc+	682.60	681.40	683.50	682.50	19.0	12967.5	1.98	1.97	1.97	1.97	2.18	2.19	2.20	2.19
pLJR965	ATc-	1324.70	1358.70	1352.80	1345.40	19.0	25562.6	2.01	1.99	1.99	2.00	2.22	2.22	2.22	2.22
Rv3756c	ATc+	1168.20	1201.30	1207.30	1198.93	19.0	22779.7	1.98	1.99	1.99	1.99	2.19	2.19	2.19	2.19
Rv3756c	ATc-	758.00	759.20	761.80	759.67	19.0	14433.7	2.00	2.01	2.01	2.01	2.18	2.17	2.15	2.17
Rv1667c	ATc+	1073.50	1060.40	1055.90	1063.27	19.0	20202.1	1.99	1.99	2.01	2.00	2.18	2.18	2.17	2.18
Rv1667c	ATc-	1006.00	1004.20	1004.50	1004.90	19.0	19093.1	1.96	1.96	1.96	1.96	2.16	2.17	2.17	2.17
Rv3008	ATc+	1284.90	1279.50	1275.00	1279.80	19.0	24316.2	2.00	2.00	2.01	2.00	2.23	2.23	2.23	2.23
Rv3008	ATc-	1133.60	1125.8	1127.20	1128.87	19.0	21448.5	2.02	2.01	2.01	2.01	2.22	2.20	2.20	2.21
Réplica biológica 1		Concentración ARN tratado y purificado (ng/μl)						A260/280				A260/230			
ID	Tratamiento	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Volumen	Cantidad de ARN	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio
pLJR965	ATc+	172.40	174.90	176.60	174.63	16.00	2794.13	2.09	2.10	2.10	2.10	2.21	2.19	2.19	2.20
pLJR965	ATc-	188.40	188.40	186.80	187.87	16.00	3005.87	2.09	2.08	2.08	2.08	2.26	2.25	2.25	2.25
Rv3756c	ATc+	214.70	214.00	212.70	213.80	16.00	3420.80	1.99	2.00	2.00	2.00	1.70	1.70	1.71	1.70
Rv3756c	ATc-	168.20	168.90	167.40	168.17	16.00	2690.67	2.08	2.07	2.08	2.08	2.09	2.10	2.11	2.10
Rv1667c	ATc+	124.90	125.10	124.90	124.97	16.00	1999.47	2.07	2.08	2.08	2.08	2.12	2.13	2.12	2.12
Rv1667c	ATc-	178.50	178.20	178.30	178.33	16.00	2853.33	2.07	2.06	2.07	2.07	2.27	2.25	2.25	2.26
Rv3008	ATc+	187.90	188.60	187.80	188.10	16.00	3009.60	2.08	2.08	2.09	2.08	2.30	2.29	2.29	2.29
Rv3008	ATc-	219.20	221.00	219.20	219.80	16.00	3516.80	2.05	2.04	2.05	2.05	2.11	2.05	2.05	2.07

Nota: Tanto para la tabla de “Concentración de ARN no tratado y purificado” y “Concentración de ARN tratado y purificado”, se presenta la concentración de ARN obtenida (ng/μl) a partir de cada extracción, con un volumen final de 19 μl y 16 μl por muestra, respectivamente. El valor A260/280 y A260/230 corresponde a la relación de absorbancia medida mediante el espectrofotómetro NanoDrop al cuantificar 1 μl de ARN, utilizada como indicador de pureza.

• **Réplica Biológica 2**

Réplica biológica 2		Concentración de ARN no tratado y purificado (ng/μl)						A260/280				A260/230			
ID	Tratamiento	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Volumen	Cantidad de ARN	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio
pLJR965	ATc+	125.50	126.20	126.00	125.90	34.0	4280.6	1.91	1.92	1.93	1.92	1.92	1.91	1.89	1.91
pLJR965	ATc-	1023.10	1036.90	804.60	954.87	34.0	32465.5	1.92	1.93	1.93	1.93	2.08	2.07	2.06	2.07
Rv3756c	ATc+	274.90	274.20	273.10	274.07	34.0	9318.3	1.92	1.92	1.93	1.92	2.00	1.99	2.00	2.00
Rv3756c	ATc-	268.40	267.60	266.60	267.53	34.0	9096.1	1.89	1.89	1.89	1.89	1.57	1.58	1.59	1.58
Rv1667c	ATc+	373.70	372.50	370.90	372.37	34.0	12660.5	1.91	1.90	1.91	1.91	1.99	1.98	1.99	1.99
Rv1667c	ATc-	513.00	526.30	516.80	518.70	34.0	17635.8	1.88	1.89	1.88	1.88	2.05	2.01	2.03	2.03
Rv3008	ATc+	518.50	510.50	507.90	512.30	34.0	17418.2	1.84	1.87	1.87	1.86	1.93	1.93	1.92	1.93
Rv3008	ATc-	727.30	727.8	724.70	726.60	34.0	24704.4	1.92	1.94	1.92	1.93	2.15	2.14	2.13	2.14
Réplica biológica 2		Concentración ARN tratado y purificado (ng/μl)						A260/280				A260/230			
ID	Tratamiento	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Volumen	Cantidad de ARN	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio
pLJR965	ATc+	140.00	144.00	142.80	142.27	16.00	2276.27	2.04	2.03	2.05	2.04	2.10	2.09	2.09	2.09
pLJR965	ATc-	146.20	146.60	146.60	146.47	16.00	2343.47	2.05	2.06	2.06	2.06	2.05	2.05	2.06	2.05
Rv3756c	ATc+	138.20	140.20	140.90	139.77	16.00	2236.27	2.05	2.06	2.06	2.06	2.13	2.13	2.11	2.12
Rv3756c	ATc-	129.60	127.60	127.30	128.17	16.00	2050.67	2.05	2.05	2.05	2.05	1.85	1.85	1.84	1.85
Rv1667c	ATc+	146.50	144.80	143.50	144.93	16.00	2318.93	2.06	2.06	2.07	2.06	1.95	1.93	1.91	1.93
Rv1667c	ATc-	134.30	136.10	136.90	135.77	16.00	2172.27	2.07	2.08	2.07	2.07	2.19	2.19	2.17	2.18
Rv3008	ATc+	150.90	152.80	153.90	152.53	16.00	2440.53	2.07	2.08	2.08	2.08	2.25	2.25	2.25	2.25
Rv3008	ATc-	141.40	142.10	140.90	141.47	16.00	2263.47	2.08	2.08	2.08	2.08	1.43	1.43	1.43	1.43

Nota: Tanto para la tabla de “Concentración de ARN no tratado y purificado” y “Concentración de ARN tratado y purificado”, se presenta la concentración de ARN obtenida (ng/μl) a partir de cada extracción, con un volumen final de 19 μl y 16 μl por muestra, respectivamente. El valor A260/280 y A260/230 corresponde a la relación de absorbancia medida mediante el espectrofotómetro NanoDrop al cuantificar 1 μl de ARN, utilizada como indicador de pureza.

- Réplica biológica 3

Réplica biológica 3		Concentración de ARN no tratado y purificado (ng/μl)						A260/280				A260/230			
ID	Tratamiento	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Volumen	Cantidad de ARN	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio
pLJR965	ATc+	361.30	364.80	366.90	364.33	34.0	12387.3	1.87	1.88	1.88	1.88	2.04	2.03	2.04	2.04
pLJR965	ATc-	382.00	285.00	385.20	350.73	34.0	11924.9	1.99	1.99	2.00	1.99	2.09	2.08	2.09	2.09
Rv3756c	ATc+	252.20	252.90	254.90	253.33	34.0	8613.2	1.90	1.91	1.90	1.90	2.01	2.01	2.00	2.01
Rv3756c	ATc-	307.70	305.10	304.50	305.77	34.0	10396.1	1.88	1.88	1.88	1.88	1.97	1.97	1.97	1.97
Rv1667c	ATc+	551.40	565.90	566.70	561.33	34.0	19085.3	1.92	1.92	1.93	1.92	1.86	1.85	1.87	1.86
Rv1667c	ATc-	685.30	689.70	693.50	689.50	34.0	23443.0	1.91	1.91	1.92	1.91	1.91	1.91	1.92	1.91
Rv3008	ATc+	193.70	201.20	200.60	200.50	34.0	6817.0	1.86	1.86	1.85	1.86	1.95	1.94	1.93	1.94
Rv3008	ATc-	483.00	486.8	494.00	487.93	34.0	16589.7	1.87	1.87	1.88	1.87	2.04	2.04	2.04	2.04
Réplica biológica 3		Concentración ARN tratado y purificado (ng/μl)						A260/280				A260/230			
ID	Tratamiento	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Volumen	Cantidad de ARN	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio
pLJR965	ATc+	145.40	144.50	145.80	145.23	16.00	2323.73	2.04	2.04	2.04	2.04	1.88	1.88	1.88	1.88
pLJR965	ATc-	139.00	139.00	141.20	139.73	16.00	2235.73	2.06	2.05	2.05	2.05	2.15	2.15	2.15	2.15
Rv3756c	ATc+	214.70	214.00	212.70	213.80	16.00	3420.80	1.99	2.00	2.00	2.00	1.70	1.70	1.71	1.70
Rv3756c	ATc-	154.80	151.80	151.90	152.83	16.00	2445.33	1.99	1.99	1.99	1.99	1.80	1.86	1.84	1.83
Rv1667c	ATc+	177.90	176.80	175.20	176.63	16.00	2826.13	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Rv1667c	ATc-	175.00	174.00	174.90	174.63	16.00	2794.13	2.04	2.03	2.03	2.03	2.04	2.03	2.03	2.03
Rv3008	ATc+	141.60	142.30	144.60	142.83	16.00	2285.33	2.04	2.04	2.03	2.04	2.04	2.04	2.03	2.04
Rv3008	ATc-	154.90	154.80	154.40	154.70	16.00	2475.20	2.04	2.03	2.05	2.04	2.04	2.03	2.05	2.04

Nota: Tanto para la tabla de “Concentración de ARN no tratado y purificado” y “Concentración de ARN tratado y purificado”, se presenta la concentración de ARN obtenida (ng/μl) a partir de cada extracción, con un volumen final de 19 μl y 16 μl por muestra, respectivamente. El valor A260/280 y A260/230 corresponde a la relación de absorbancia medida mediante el espectrofotómetro NanoDrop al cuantificar 1 μl de ARN, utilizada como indicador de pureza.

**Anexo 5:** Valores de los niveles de expresión de ARNm en cepas silenciadas y no silenciadas, y aplicación del método Livak en cada ensayo

- Réplica biológica 1

Muestra	RB1	Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio	Promedio ensayo	Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio	Promedio ensayo	dCT	ddCT	2 <sup>-(ddCT)</sup>
pLJR965 ATc-	Ensayo 1	SigA	- ATc	19.64	20.20	19.92	19.69	Rv3756c	- ATc	19.93	20.78	20.36	20.08	0.39	0.00	1.00
	Ensayo 2	SigA	- ATc	18.97	19.58	19.62		Rv3756c	- ATc	19.60	19.66	19.63				
	Ensayo 3	SigA	- ATc	19.36	19.68	19.52		Rv3756c	- ATc	19.98	20.51	20.25				
pLJR965 ATc+	Ensayo 1	SigA	+ ATc	19.42	19.04	19.23	18.79	Rv3756c	+ ATc	19.03	19.49	19.26	19.24	0.46	0.07	0.96
	Ensayo 2	SigA	+ ATc	18.60	18.34	18.47		Rv3756c	+ ATc	19.11	19.07	19.09				
	Ensayo 3	SigA	+ ATc	18.86	18.46	18.66		Rv3756c	+ ATc	19.09	19.67	19.38				
Rv3756c ATc-	Ensayo 1	SigA	- ATc	18.73	18.74	18.73	18.82	Rv3756c	- ATc	21.40	20.79	21.10	20.82	2.00	0.00	1.00
	Ensayo 2	SigA	- ATc	18.85	17.93	18.39		Rv3756c	- ATc	21.22	19.86	20.54				
	Ensayo 3	SigA	- ATc	19.33	19.32	19.33		Rv3756c	- ATc	20.82	20.82	20.82				
Rv3756c ATc+	Ensayo 1	SigA	+ ATc	19.04	18.63	18.83	18.77	Rv3756c	+ ATc	23.34	23.25	23.29	23.08	4.31	2.31	0.202
	Ensayo 2	SigA	+ ATc	18.92	18.09	18.51		Rv3756c	+ ATc	23.21	22.24	22.72				
	Ensayo 3	SigA	+ ATc	18.91	19.03	18.97		Rv3756c	+ ATc	23.00	23.45	23.23				
Rv1667c ATc-	Ensayo 1	SigA	- ATc	18.78	18.65	18.71	18.77	Rv1667c	- ATc	26.06	25.79	25.92	25.54	6.77	0.00	1.00
	Ensayo 2	SigA	- ATc	19.49	17.95	18.72		Rv1667c	- ATc	25.29	25.55	25.42				
	Ensayo 3	SigA	- ATc	18.96	18.76	18.86		Rv1667c	- ATc	25.45	25.11	25.28				
Rv1667c ATc+	Ensayo 1	SigA	+ ATc	18.65	18.31	18.48	18.43	Rv1667c	+ ATc	30.45	30.30	30.38	30.29	11.86	5.09	0.03
	Ensayo 2	SigA	+ ATc	17.77	18.06	17.91		Rv1667c	+ ATc	30.09	30.71	30.40				
	Ensayo 3	SigA	+ ATc	19.09	18.72	18.91		Rv1667c	+ ATc	30.48	29.74	30.11				
Rv3008 ATc-	Ensayo 1	SigA	- ATc	19.34	18.89	19.12	18.60	Rv3008	- ATc	21.81	21.44	21.63	21.77	3.18	0.00	1.00
	Ensayo 2	SigA	- ATc	18.26	17.92	18.09		Rv3008	- ATc	21.88	22.17	22.02				
	Ensayo 3	SigA	- ATc	18.66	18.51	18.59		Rv3008	- ATc	21.60	21.74	21.67				
Rv3008 ATc+	Ensayo 1	SigA	+ ATc	19.43	18.91	19.17	18.71	Rv3008	+ ATc	23.19	22.79	22.99	23.15	4.43	1.26	0.42
	Ensayo 2	SigA	+ ATc	18.69	18.02	18.36		Rv3008	+ ATc	23.29	23.46	23.37				
	Ensayo 3	SigA	+ ATc	18.51	18.71	18.61		Rv3008	+ ATc	22.81	23.34	23.08				

Nota: RB: Réplica biológica, Ct: umbral de ciclos o “cycle threshold”. CT1 y CT2: mediciones de dos repeticiones que se realizaron para cada ensayo de cada réplica biológica.

- Réplica biológica 2

Muestra	RB2	Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio		Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio	Promedio ensayo	dCT	ddCT	2 <sup>Δ</sup> (ddCT)
pLJR965 ATc-	Ensayo 1	SigA	- ATc	17.91	17.92	17.91	17.95	Rv3756c	- ATc	18.51	17.52	18.01	18.19	0.24	0.00	1.00
	Ensayo 2	SigA	- ATc	17.58	17.83	17.70		Rv3756c	- ATc	18.06	18.76	18.41				
	Ensayo 3	SigA	- ATc	17.80	18.64	18.22		Rv3756c	- ATc	17.97	18.31	18.14				
pLJR965 ATc+	Ensayo 1	SigA	+ ATc	18.27	18.26	18.27	18.24	Rv3756c	+ ATc	18.52	18.55	18.54	18.39	0.15	-0.09	1.06
	Ensayo 2	SigA	+ ATc	17.99	18.22	18.11		Rv3756c	+ ATc	18.14	18.74	18.44				
	Ensayo 3	SigA	+ ATc	18.14	18.53	18.34		Rv3756c	+ ATc	17.94	18.44	18.19				
Rv3756c ATc-	Ensayo 1	SigA	- ATc	17.42	17.73	17.57	17.38	Rv3756c	- ATc	19.16	19.00	19.08	19.03	1.65	0.00	1.00
	Ensayo 2	SigA	- ATc	17.69	17.66	17.67		Rv3756c	- ATc	19.08	19.02	19.05				
	Ensayo 3	SigA	- ATc	17.37	16.41	16.89		Rv3756c	- ATc	18.99	18.92	18.95				
Rv3756c ATc+	Ensayo 1	SigA	+ ATc	17.80	18.11	17.95	17.76	Rv3756c	+ ATc	20.99	20.94	20.97	20.69	2.93	1.29	0.41
	Ensayo 2	SigA	+ ATc	17.90	17.85	17.88		Rv3756c	+ ATc	20.76	20.56	20.66				
	Ensayo 3	SigA	+ ATc	17.43	17.48	17.45		Rv3756c	+ ATc	20.39	20.53	20.46				
Rv1667c ATc-	Ensayo 1	SigA	- ATc	18.33	18.16	18.24	17.99	Rv1667c	- ATc	24.30	24.96	24.63	24.55	6.56	0.00	1.00
	Ensayo 2	SigA	- ATc	17.56	17.58	17.57		Rv1667c	- ATc	24.43	24.95	24.69				
	Ensayo 3	SigA	- ATc	18.03	18.29	18.16		Rv1667c	- ATc	24.33	24.36	24.35				
Rv1667c ATc+	Ensayo 1	SigA	+ ATc	17.72	17.92	17.82	17.64	Rv1667c	+ ATc	28.96	28.99	28.97	28.87	11.23	4.66	0.04
	Ensayo 2	SigA	+ ATc	17.56	17.41	17.49		Rv1667c	+ ATc	28.71	29.02	28.86				
	Ensayo 3	SigA	+ ATc	17.73	17.52	17.63		Rv1667c	+ ATc	28.83	28.72	28.78				
Rv3008 ATc-	Ensayo 1	SigA	- ATc	18.48	18.72	18.60	18.44	Rv3008	- ATc	22.41	21.82	22.11	22.09	3.65	0.00	1.00
	Ensayo 2	SigA	- ATc	18.91	18.47	18.69		Rv3008	- ATc	22.91	21.78	22.34				
	Ensayo 3	SigA	- ATc	18.10	17.99	18.04		Rv3008	- ATc	22.01	21.64	21.83				
Rv3008 ATc+	Ensayo 1	SigA	+ ATc	18.80	18.35	18.58	18.36	Rv3008	+ ATc	22.90	22.89	22.90	22.86	4.50	0.85	0.56
	Ensayo 2	SigA	+ ATc	18.48	18.32	18.40		Rv3008	+ ATc	23.04	22.81	22.92				
	Ensayo 3	SigA	+ ATc	18.10	18.10	18.10		Rv3008	+ ATc	22.82	22.67	22.75				

Nota: RB: Réplica biológica, Ct: umbral de ciclos o “cycle threshold”. CT1 y CT2: mediciones de dos repeticiones que se realizaron para cada ensayo de cada réplica biológica.

- Réplica biológica 3

Muestra	RB3	Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio		Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio	Promedio ensayo	dCT	ddCT	2^(ddCT)
pLJR965 ATc-	Ensayo 1	SigA	- ATc	18.63	18.54	18.58	18.50	Rv3756c	- ATc	18.17	18.30	18.23	18.38	-0.12	0.00	1.00
	Ensayo 2	SigA	- ATc	18.52	18.79	18.65		Rv3756c	- ATc	18.58	18.85	18.71				
	Ensayo 3	SigA	- ATc	18.25	18.27	18.26		Rv3756c	- ATc	17.93	18.44	18.19				
pLJR965 ATc+	Ensayo 1	SigA	+ ATc	19.28	18.79	19.03	18.98	Rv3756c	+ ATc	18.67	18.45	18.56	18.84	-0.14	-0.02	1.01
	Ensayo 2	SigA	+ ATc	19.07	19.11	19.09		Rv3756c	+ ATc	18.97	19.85	19.41				
	Ensayo 3	SigA	+ ATc	18.80	18.84	18.82		Rv3756c	+ ATc	18.52	18.58	18.55				
Rv3756c ATc-	Ensayo 1	SigA	- ATc	18.07	17.79	17.93	17.93	Rv3756c	- ATc	20.77	20.73	20.75	20.94	3.01	0.00	1.00
	Ensayo 2	SigA	- ATc	18.06	17.72	17.89		Rv3756c	- ATc	20.83	20.98	20.90				
	Ensayo 3	SigA	- ATc	18.19	17.76	17.98		Rv3756c	- ATc	21.66	20.69	21.18				
Rv3756c ATc+	Ensayo 1	SigA	+ ATc	20.62	18.08	19.35	18.47	Rv3756c	+ ATc	23.17	23.09	23.13	23.15	4.68	1.67	0.32
	Ensayo 2	SigA	+ ATc	17.83	18.06	17.94		Rv3756c	+ ATc	23.31	22.80	23.05				
	Ensayo 3	SigA	+ ATc	18.26	17.99	18.13		Rv3756c	+ ATc	23.37	23.17	23.27				
Rv1667c ATc-	Ensayo 1	SigA	- ATc	19.42	19.10	19.26	18.88	Rv1667c	- ATc	25.06	24.67	24.87	24.95	6.07	0.00	1.00
	Ensayo 2	SigA	- ATc	19.28	18.27	18.77		Rv1667c	- ATc	25.28	25.07	25.17				
	Ensayo 3	SigA	- ATc	18.17	19.04	18.60		Rv1667c	- ATc	24.95	24.69	24.82				
Rv1667c ATc+	Ensayo 1	SigA	+ ATc	18.77	18.99	18.88	18.53	Rv1667c	+ ATc	28.90	28.95	28.92	28.82	10.29	4.22	0.05
	Ensayo 2	SigA	+ ATc	18.64	17.65	18.14		Rv1667c	+ ATc	29.16	28.84	29.00				
	Ensayo 3	SigA	+ ATc	18.61	18.54	18.58		Rv1667c	+ ATc	28.50	28.61	28.55				
Rv3008 ATc-	Ensayo 1	SigA	- ATc	19.55	19.08	19.32	18.74	Rv3008	- ATc	22.76	22.36	22.56	22.13	3.39	0.00	1.00
	Ensayo 2	SigA	- ATc	18.51	18.67	18.59		Rv3008	- ATc	22.50	22.09	22.30				
	Ensayo 3	SigA	- ATc	18.34	18.31	18.32		Rv3008	- ATc	21.61	21.46	21.53				
Rv3008 ATc+	Ensayo 1	SigA	+ ATc	19.98	19.39	19.68	19.00	Rv3008	+ ATc	23.24	22.66	22.95	22.70	3.70	0.31	0.81
	Ensayo 2	SigA	+ ATc	18.74	18.95	18.84		Rv3008	+ ATc	23.39	22.46	22.93				
	Ensayo 3	SigA	+ ATc	18.41	18.53	18.47		Rv3008	+ ATc	22.22	22.21	22.21				

Nota: RB: Réplica biológica, Ct: umbral de ciclos o “cycle threshold”. CT1 y CT2: mediciones de dos repeticiones que se realizaron para cada ensayo de cada réplica biológica.

**Anexo 6:** Resultados de la regresión lineal simple para cada cepa

Cepa	Condición	Ecuación lineal	R <sup>2</sup>	b (pendiente)	p<0.05
H37Rv- pLJR965	ATc+	$\ln(y)=-0.7065+0.004x$	0.810	0.004	0.746
	ATc-	$\ln(y)=-0.7366+0.0038x$	0.770	0.004	
Rv3756c	ATc+	$\ln(y)=-0.9226+0.0047x$	0.880	0.005	0.778
	ATc-	$\ln(y)=-0.9952+0.0048x$	0.940	0.005	
Rv1667c	ATc+	$\ln(y)=-1.1243+0.0055x$	0.970	0.006	0.718
	ATc-	$\ln(y)=-1.0896+0.0054x$	0.990	0.005	
Rv3008	ATc+	$\ln(y)=-0.9170+0.005x$	0.970	0.005	0.682
	ATc-	$\ln(y)=-0.9502+0.0053x$	0.940	0.005	

**Anexo 7:** Acumulación de POA extracelular en diferentes cepas bajo condiciones de silenciamiento (ATc+) y no silenciamiento (ATc-) a lo largo de 120 horas

Condición	Cepa/Gen	Horas					
		0 (IC 95%), DS	24 (IC 95%), DS	48 (IC 95%), DS	72 (IC 95%), DS	96 (IC 95%), DS	120 (IC 95%), DS
No silenciado (ATc -)	H37Rv-pLJR965	0.1853(-0.2029-0.5735), 0.1563	0.4423(0.3355-0.5492), 0.043	0.701(0.218-1.184), 0.1944	1.091(0.3243-1.8577), 0.3086	1.0133(0.0296-1.9971), 0.396	1.6837(0.3444-3.0229) 0.5391
	Rv3756c	0.1393(-0.1411-0.4197), 0.1129	0.3593(0.1416-0.5771), 0.0877	0.853(0.5539-1.1521), 0.1204	1.1473(0.3415-1.9532), 0.3244	1.4063(0.6774-2.1353), 0.2934	2.4003(1.7771-3.0236), 0.2509
	Rv1667c	0.0423(-0.081-0.1657), 0.0497	0.2497(-0.2221-0.7215), 0.1899	0.6883(-0.0417-1.4184), 0.2939	0.9303(0.6313-1.2294), 0.1204	1.1103(0.3117-1.909), 0.3215	1.6957(1.4726-1.9188), 0.0898
	Rv3008	0.127(-0.5526-0.8066) 0.2736	0.364(-0.005-0.733), 0.1485	0.811(-0.1214-1.7434), 0.3753	1.0443(0.2485-1.8402), 0.3204	1.348(0.98-1.716), 0.1482	1.8997(0.7057-3.0936), 0.4806
Silenciado (ATc +)	H37Rv-pLJR965	0.2433 (0.1590-0.3277),0.0339	0.363(-0.117-0.843),0.1932	0.626(0.0514-1.2006),0.2313	0.9683(-0.055-1.9916),0.4119	1.409(0.4263-2.3917),0.3956	1.5247(1.1377-1.9116),0.1558
	Rv3756c	0.0483(-0.0848- 0.1815), 0.0536	0.3513 (-0.2127-0.9154), 0.2271	0.8267( -0.1699-1.8232), 0.4012	1.0467(0.1708-1.9225),0.3526	1.3967(0.7548-2.0385), 0.2584	2.174(1.3316-3.0164), 0.3391
	Rv1667c	0.0467(-0.0744- 0.1678), 0.0487	0.3277(0.0336-0.6217), 0.1184	0.6687(0.0514- 1.2859), 0.2485	0.88(0.565-1.195), 0.1268	1.3777(0.7288-2.026),0.2612	1.83(1.3378-2.3222), 0.1981
	Rv3008	0.0563(-0.3339-0.4465), 0.1571	0.306(0.1489-0.4631), 0.0632	0.6623(0.3773-0.9474), 0.1147	0.8967(0.6933-1.1001), 0.0819	1.1387(0.4513-1.8261), 0.2767	1.9327(0.787-3.0783), 0.4612

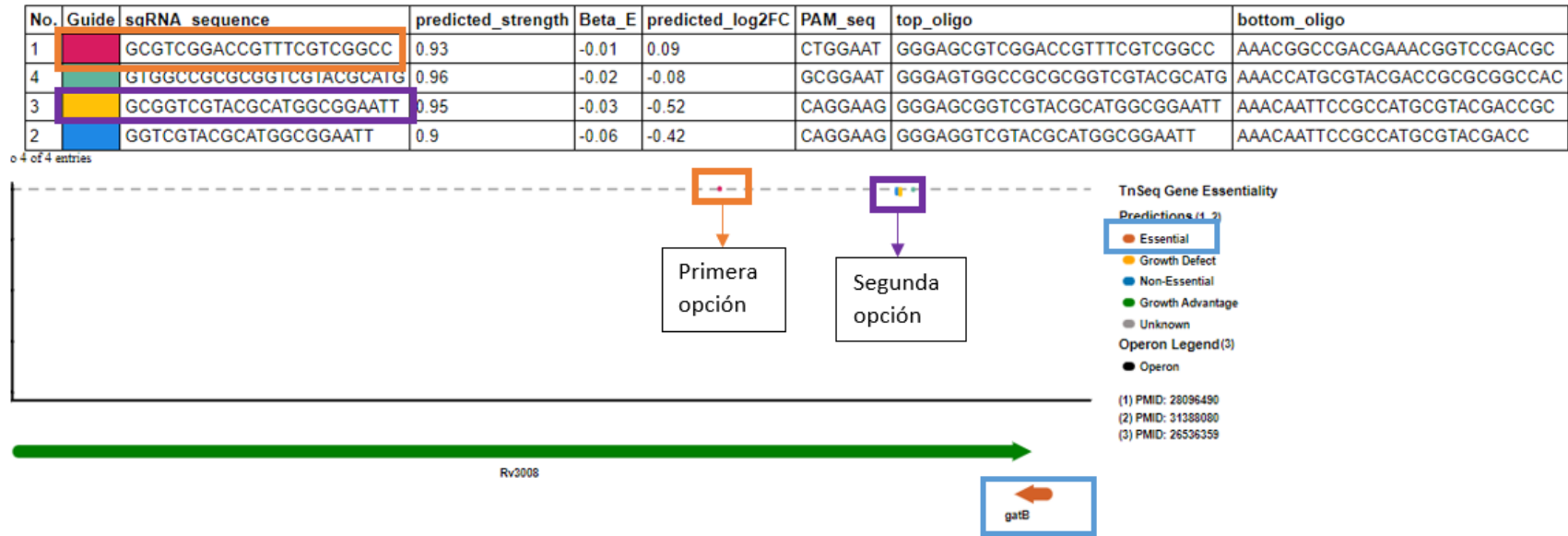
Nota: IC 95%: los intervalos de confianza indican la precisión de las estimaciones realizadas, entregando un rango dentro del cual se espera que se encuentre el valor verdadero con un determinado nivel de confianza (generalmente 95%). DS: La desviación estándar permite mostrar la variabilidad de los datos obtenidos entre réplicas experimentales.

**Anexo 8:** Velocidad inicial del eflujo de POA en diferentes cepas bajo condiciones de silenciamiento (ATc+) y no silenciamiento (ATc-) a lo largo de 120 horas

Condición	Cepa/Gen	Horas					
		0 (IC 95%), DS	24 (IC 95%), DS	48 (IC 95%), DS	72 (IC 95%), DS	96 (IC 95%), DS	120 (IC 95%), DS
No silenciado (ATc-)	H37Rv-pLR965	0.092(-0.1047-0.2887), 0.0792	0.2707(0.0053-0.536), 0.1068	0.5323(-0.1166-1.1813), 0.2612	0.8567(0.205-1.5084), 0.2623	1.0943(-0.0653-2.254), 0.4668	1.7817(0.81-2.7533), 0.3911
	Rv3756c	0.0697(-0.0716-0.2109), 0.0569	0.2367(-0.049-0.5223), 0.115	0.663(0.1713-1.1547), 0.1979	1.1563(0.154-2.1587), 0.4035	1.6627(0.3702-2.9552), 0.5203	2.744(0.8224-4.6656), 0.7735
	Rv1667c	0.0187(-0.0396-0.0769), 0.0234	0.156(-0.1192-0.4312), 0.1108	0.5053(0.0416-0.9691), 0.1867	0.9567(0.7637-1.1497), 0.0777	1.338(-0.1103-2.7863), 0.583	2.093(1.4891-2.6969), 0.2431
	Rv3008	0.049(-0.2308-0.3288), 0.1126	0.2093(0.0442-0.3744), 0.0665	0.6167(0.0996-1.1338), 0.2082	1.0547(0.5838-1.5256), 0.1896	1.617(1.0815-2.1525), 0.2156	2.2433(0.2645-4.2221), 0.7966
Silenciado (ATc+)	H37Rv-pLR965	0.1127(0.0977-0.1276), 0.006	0.2293(-0.1614-0.62), 0.1573	0.4887(-0.1341-1.1115), 0.2507	0.7153(0.0072-1.4234), 0.2851	1.3053(0.5142-2.0964), 0.3185	1.784(1.1322-2.4358), 0.2624
	Rv3756c	0.0233(-0.0449-0.0916), 0.0275	0.2307(-0.1893-0.6506), 0.1691	0.5933(-0.1365-1.3232), 0.2938	1.0467(0.1708-1.9225), 0.3526	1.6193(1.0107-2.2279), 0.245	2.61(1.4115-3.8085), 0.4824
	Rv1667c	0.023(-0.0382-0.0842), 0.0246	0.212(-0.0267-0.4507), 0.0961	0.5023(0.0452-0.9594), 0.184	0.88(0.565-1.195), 0.1268	1.455(0.7477-2.1623), 0.2847	2.1357(1.4833-2.7881), 0.2626
	Rv3008	0.0203(-0.1426-0.1833), 0.0656	0.2047(0.0813-0.328), 0.0497	0.5547(0.1556-0.9537), 0.1606	0.934(0.3054-1.5626), 0.2531	1.3523(0.2199-2.4848), 0.4559	2.234(0.9359-3.5321), 0.5226

Nota: IC 95%: los intervalos de confianza indican la precisión de las estimaciones realizadas, entregando un rango dentro del cual se espera que se encuentre el valor verdadero con un determinado nivel de confianza (generalmente 95%). DS: La desviación estándar permite mostrar la variabilidad de los datos obtenidos entre réplicas experimentales.

**Anexo 9.** Posición de los ARNg seleccionados para el gen *Rv3008*



**Fuente:** Imagen sacada de la página Pebble (<https://pebble.rockefeller.edu/tools/sgrna-design/>)

**Anexo 10.** Valores de silenciamiento obtenido con la segunda opción del ARNg escogido para el gen *Rv3008* y con el que se trabajó este estudio

Replica Biologica	Gen	LOG2FC ATc-	LOG2FC ATc+	Fold Repression	ATc+/ATc-	LOG2FC	Promedio
1	Rv3008	0.175	0.071	2	0.404	-1.31	-1.26
1	Rv3008	0.065	0.031	2	0.472	-1.08	
1	Rv3008	0.118	0.045	3	0.383	-1.38	

**Anexo 12. Cronograma de trabajo** presentados en la forma de un diagrama de Gantt en donde se establecerá el inicio y duración del trabajo experimental

Cronograma general del Proyecto de Tesis

Tareas	Fecha de inicio	Fecha final	Días	Estado
Solicitud de tesis en el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular	01/02/23	17/02/23	17	<b>Completado</b>
Reunión con asesores y definición de tema de tesis	20/02/23	26/02/23	6	<b>Completado</b>
Capacitación en ensayos de laboratorio	20/02/23	10/03/23	18	<b>Completado</b>
Preparación de reactivos y ensayos preliminares de tesis	01/03/23	01/04/23	31	<b>Completado</b>
Registro de tesis a SIDISI	13/03/23	15/03/23	2	<b>Completado</b>
Coordinación y presentación de proyecto de tesis a Comité de Tesis	16/03/23	20/03/23	4	<b>Completado</b>

Coordinación para presentar el proyecto de tesis a Comité de Etica	21/03/23	22/03/23	1	<b>Completado</b>
--	----------	----------	---	-------------------

## 2. Cronograma de Ensayos del Proyecto de Tesis

Objetivos Especificos	Tareas	Fecha de inicio	Fecha final	Días	Estado
Seleccionar genes de bombas de eflujo ( <i>Rv3008</i> , <i>Rv3756c</i> y <i>Rv1667c</i> ) de <i>M. tuberculosis</i> involucrados en la resistencia a pirazinamida.	Búsqueda de genes de bombas de eflujo de <i>M. tuberculosis</i> en Mycobrowser	20/02/23	23/02/23	3	<b>Completado</b>
	Identificación de genes de bombas de eflujo involucradas en la resistencia a fármacos	24/02/23	26/02/23	4	<b>Completado</b>
	Identificación de genes de bombas de eflujo involucradas en la resistencia a pirazinamida	26/03/23	28/03/23	3	<b>Completado</b>
Silenciar la transcripción de genes de bombas de eflujo en <i>M. tuberculosis</i> mediante la técnica de CRISPR de interferencia.	Diseño y Síntesis de ARNg	01/03/23	03/03/23	2	<b>Completado</b>
	Elaboración de reactivos para ensayos de clonamiento	01/04/23	04/04/23	3	<b>Completado</b>
	Preparación de Células Competentes <i>E. coli</i> Novablue	02/04/23	08/04/23	6	<b>Completado</b>
	Transformación de plásmido pLJR965 a <i>E. coli</i> Novablue	08/04/23	09/04/23	1	<b>Completado</b>
	Extracción de plásmido pLJR965 y electroforesis	09/04/23	10/04/23	1	<b>Completado</b>
	Capacitación en cultivo de <i>M. tuberculosis</i> en laboratorio P3	03/03/23	12/04/23	43	<b>Completado</b>

	Ensayos de electroporación en <i>M. tuberculosis</i> y silenciamiento genico transcripcional por CRISPRi	17/05/23	22/06/23	30	<b>Completado</b>
Evaluar la velocidad de eflujo del ácido pirazinoico en <i>M. tuberculosis</i> en condiciones de silenciamiento transcripcional de genes de bombas de eflujo.	Medición de niveles de ARNm de genes silenciados por RT-qPCR	05/04/23	30/05/24	30	<b>Completado</b>
	Estandarización y medición de velocidad de eflujo de POA y TEMA	01/06/24	31/09/24	30	<b>Completado</b>