



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**ESTANDARIZACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DEL GEN *pncA* EN
Mycobacterium tuberculosis pncA-knockout MEDIANTE UNA TÉCNICA DE
COMPLEMENTACIÓN DE GENES**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Adiana Ochoa Ortiz

Asesor:

Dra. Patricia Sheen Cortavarria

Lima, Perú

2025

Jurado calificador

Presidente: Dra. Monica Jehnny Pajuelo Travezaño

Vocal: Dra. Claudia Ines Gloria Machicado Rivero

Secretario: Dr. Jorge Enrique Coronel Herrera

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	OCHOA ORTIZ ADIANA

Pertenecientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**, autores del trabajo titulado: **ESTANDARIZACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DEL GEN *pncA* EN *Mycobacterium tuberculosis pncA-knockout* MEDIANTE UNA TÉCNICA DE COMPLEMENTACIÓN DE GENES**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA** bajo la modalidad de **TESIS**.

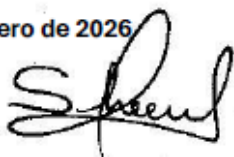
En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	SHEEN CORTAVARRIA PATRICIA	FACI	ASESOR

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

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **16%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3461440141**; fecha de entrega: **20/01/2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 20 de enero de 2026**



Firma del asesor

Nº DNI: 09541127

ORCID: 0000-0002-7118-9301

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	7
III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	8
IV. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	9
V. OBJETIVOS	9
5.1 Objetivo general	9
5.2 Objetivos específicos	9
VI. METODOLOGÍA	10
6.1 Material biológico	10
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	10
7.1 Construcción del plásmido integrativo con el gen <i>pncA</i> de MTB-H37Rv	11
7.2 Integración del gen <i>pncA</i> en el genoma de <i>M. tuberculosis pncA</i> -Knockout	11
7.3 Medición de los parámetros fenotípicos	13
7.4 Análisis estadísticos	18
7.5 Aspectos éticos	19
VIII. RESULTADOS	20
8.1 Clonación del gen <i>pncA</i> nativo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en el plásmido integrativo pMV306hsp.	20
8.2 Integración del gen <i>pncA</i> nativo más su promotor en el genoma de <i>M. tuberculosis pncA</i> -knockout.	23
8.3 Parámetros fenotípicos: Detección de ácido pirazinoico	26
IX. DISCUSIÓN	35
X. CONCLUSIONES	38
XI. LIMITACIONES	38
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE ABREVIATURAS

TB: Tuberculosis

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

PZA: Pirazinamida

POA: Ácido pirazinoico

PZAsa: Pirazinamidasa

MIC: Concentración mínima inhibitoria

MGIT: Tubo indicador de crecimiento micobacteriano

MTB-H37Rv: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

MTB-KO: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv con el *pncA* desactivado debido a la inserción del gen de higromicina en su misma secuencia.

MTB-KO-pMV: MTB-KO integrado con el plásmido pMV306hsp.

MTB-KO-pMV*pncA*: MTB-KO integrado con el plásmido pMV306hsp más el gen *pncA*

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción

TEMA: Ensayo de microplaca con tetrazolio

ANOVA de dos vías: Análisis de varianza de dos vías

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Alelo: Variante de un mismo gen que ocupa una posición específica (locus) en un cromosoma.

Complementación génica: Técnica que introduce una copia funcional de un gen en un organismo que carece de él, para restaurar su función.

Electroporación: Método de transformación de células que utiliza pulsos eléctricos para aumentar la permeabilidad de la membrana y facilitar la entrada de ADN.

Enzimas de restricción: Proteínas que reconocen y cortan secuencias específicas de ADN generando extremos cohesivos o romos.

Digestión enzimática: Proceso de corte de un plásmido o fragmento de ADN utilizando enzimas de restricción.

Ligasa: Enzima que une fragmentos de ADN uniéndolos covalentemente en los extremos compatibles.

Integrasa: Enzima que cataliza la integración de ADN foráneo en un sitio específico del genoma.

Endonucleasa: Enzima que corta el ADN en sitios internos específicos.

Plásmido: Molécula de ADN extracromosómico circular, capaz de replicarse independientemente del cromosoma bacteriano.

Promotor: Región de ADN situada en el inicio de un gen que regula la transcripción del mismo.

Vector integrativo: Plásmido diseñado para incorporarse de manera estable en el genoma de la bacteria.

Vector episomal: Plásmido que se replica independientemente del cromosoma dentro de la célula.

Fold Change: Razón de cambio relativa en la expresión génica entre dos condiciones.

Sitios attP/attB: Secuencias de recombinación específicas del fago L5 (attP) y del cromosoma de *M. tuberculosis* (attB) usadas por la integrasa.

Kb: Unidad de longitud en genética que equivale a mil pares de bases.

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), que afecta principalmente a los pulmones.

Una de las drogas para tratar la TB es la pirazinamida (PZA), cuyo mecanismo de acción se inicia con la conversión de la PZA a su forma activa, ácido pirazinoico (POA) por acción de la pirazinamidasa (PZAsa) codificada por el gen *pncA*. La gran mayoría de pacientes resistentes a esta droga presentan mutaciones en *pncA*. Sin embargo, se han reportado resultados discordantes entre la actividad enzimática de PZAsa y la susceptibilidad a la droga usando aislados clínicos que presentan mutaciones en otras regiones genómicas.

Por ello, el propósito de este estudio es estandarizar la integración de forma estable del gen *pncA* de tipo salvaje en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv con delección de *pncA* (MTB-KO), para restaurar la actividad de la PZAsa, la susceptibilidad a la PZA y estandarizar un modelo genético que permita evaluar el impacto de mutaciones específicas del gen *pncA* en la resistencia a PZA.

Finalmente, se logró integrar exitosamente el plásmido integrativo con el gen *pncA* en el genoma de MTB-KO y se demostró que la cepa complementada recuperó la expresión del gen *pncA*, la producción de POA y la susceptibilidad a PZA. En cambio, la cepa MTB-KO o con el plásmido vacío no produjo POA ni fue sensible a la droga.

Este modelo permitió restaurar la susceptibilidad a PZA usando el gen de *pncA* nativo, en un contexto genético controlado y sin interferencia de otras mutaciones.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, susceptibilidad, resistencia, integración génica, pirazinamida y pirazinamidasa.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a contagious infectious disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), which mainly affects the lungs.

One of the drugs used to treat TB is pyrazinamide (PZA), whose mechanism of action begins with the conversion of PZA to its active form, pyrazinoic acid (POA), by pyrazinamidase (PZAse), encoded by the *pncA* gene. Most patients resistant to this drug have mutations in *pncA*. However, conflicting results have been reported regarding PZA enzyme activity and drug susceptibility in clinical isolates harbouring mutations in other genomic regions.

Therefore, the purpose of this study is to standardise the stable integration of the wild-type *pncA* gene into the genome of *M. tuberculosis* H37Rv with *pncA* deletion (MTB-KO) genome, to restore PZAse activity and susceptibility to PZA, and to standardise a genetic model that allows the evaluation of the impact of specific mutations in the *pncA* gene on PZA resistance.

Finally, the integrative plasmid carrying *pncA* was successfully integrated into the MTB-KO genome, and the complemented strain recovered *pncA* gene expression, POA production, and PZA susceptibility. In contrast, the MTB-KO strain or the strain with the empty plasmid did not produce POA and was not sensitive to the drug.

This model allowed susceptibility to PZA to be restored using the native *pncA* gene in a controlled genetic context, without interference from other mutations.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, susceptibility, resistance, gene integration, pyrazinamide, and pyrazinamidase.

I. INTRODUCCIÓN

El patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) es el agente causal de la enfermedad infecciosa tuberculosis (TB), que no solo provoca altas tasas de mortalidad y morbilidad en países de bajos y medianos ingresos, sino que constituye una de las 10 causas de muerte más frecuentes del mundo y la líder en causas de muerte por un solo agente infeccioso (1). En el Perú, se han reportado 173 nuevos casos de TB por 100 000 habitantes en 2023, lo que mantiene al Perú entre los países con más alta carga de TB resistente en la Región de las Américas. Además, en el año 2024, se notificaron 33 049 casos de TB en el país, siendo el 4,4% TB multidrogorresistente (TB-MDR) (2). El tratamiento de los casos sensibles dura 6 meses y requiere la combinación de 4 drogas: isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida, dentro de las cuales resalta pirazinamida (PZA), ya que elimina las poblaciones de bacilos persistentes y, por tanto, reduce las tasas de recaída (3,4).

La PZA actúa eficientemente gracias a la enzima micobacteriana pirazinamidasa (PZAsa), la cual transforma la PZA en su forma activa, ácido pirazinoico (POA). Al ser la PZAsa la enzima clave de la transformación de PZA a su forma activa, mutaciones en el marco de lectura de su gen podrían alterar la estructura de la enzima y reducir su actividad, dando como resultado un nivel de resistencia a la droga. Esto se ve reflejado en más del 90% de los aislados clínicos de pacientes con TB resistentes a PZA donde se encuentra diversos polimorfismos de nucleótido simple en todo el marco de lectura del gen *pncA* y región promotora (5,6). En ese sentido, diversos estudios han demostrado que determinadas mutaciones que afectan al sitio activo o al sitio de unión al metal disminuyen totalmente la actividad enzimática de la PZAsa mientras que algunas mutaciones, lejos de estos sitios, presentan sólo una parcial disminución de la actividad (7-9). Por ello, entender la importancia de cada mutación en la resistencia a PZA es sustancial, ya que permitirá generar catálogos de las mutaciones que confieren resistencia a esta droga.

Existen otros mecanismos de resistencia a PZA que no involucran la secuencia del gen *pncA*. Entre estas están mutaciones puntuales en la bomba de flujo de salida Rv1258c (Tap), las cuales generan que la expulsión de POA al medio extracelular sea más eficiente (10). También existen, mutaciones puntuales en el promotor del gen *pncA* y en el gen *panD*, que codifica aspartato descarboxilasa, responsable de la síntesis de pantotenato, las cuales generan resistencia a PZA (11,12).

Las mutaciones a nivel del gen *pncA* provenientes de los aislados clínicos, se han caracterizado mediante ensayos *in vitro*, es decir, se han generado proteínas recombinantes utilizando la secuencia del gen de *pncA* mutado en *Escherichia coli* (8,9).

Dentro de los principales ensayos fenotípicos para evaluar la PZA se destacan: la prueba de Wayne, donde se mide la actividad de la PZAsa a través de la detección de POA, siendo el resultado “positivo” si se detectan niveles similares a los producidos por *M. tuberculosis* H37Rv, “débilmente positivo” si son menores a la cepa silvestre y “negativo” si no hay detección de POA; el ensayo de microplaca con tetrazolio (TEMA) donde se determina la concentración mínima inhibitoria (MIC) de una droga, en este caso detectar la menor concentración de PZA capaz de inhibir el crecimiento de la micobacteria, siendo 100 µg/mL la concentración que inhibe el crecimiento de la cepa silvestre y el ensayo MGIT 960 PZA, donde un resultado “resistente” indica la presencia y crecimiento de la micobacteria en el tubo MGIT con PZA y en el tubo MGIT control, y un resultado “sensible” sugiere crecimiento solo en el tubo control durante el periodo de incubación.

Por otra parte, en el estudio de Sheen et al., se analizaron diversas mutaciones y su asociación al fenotipo resistente a PZA. Algunas modificaciones en el gen *pncA* estudiadas tales como F94L, Y34D, T135P y H51R se caracterizan por presentar una única mutación de aminoácidos a lo largo del gen con una actividad variable de PZAsa (9). La mutación F94L está ubicada distante del sitio activo y de unión a metal, presenta una actividad enzimática parcial *in vitro* (55,18 % de actividad PZAsa), una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 400 µg/ml con TEMA y un MGIT 960 PZA resistente. La mutación Y34D también está ubicada distante del sitio activo y de unión al metal, una actividad enzimática del 53,59%, un MIC con TEMA de 100 µg/ml, un Wayne débil y un MGIT 960 PZA resistente (9, 13). Estas dos mutaciones tienen en común que presentan actividad enzimática, pero que son fenotipo resistente según MGIT 960 PZA. Por otro lado, las mutaciones T135P y H51R son fenotipo resistente según MGIT 960 PZA, Wayne negativo y su MIC con TEMA es mayor a 800 µg/ml. Además, están próximos al sitio activo y unión al metal, y presentan actividad enzimática casi nula, siendo 0.05% y 0.02%, respectivamente (13).

La prevalencia de cepas clínicas resistentes a PZA es muy elevada entre las cepas de pacientes con TB-MDR, alcanzando el 51% frente a solo el 5% en cepas no TB-MDR (14). El principal impulsor de esta resistencia son las modificaciones genéticas en el gen

pncA que provocan una disminución parcial o total de la actividad enzimática de la PZAsa (15). Sin embargo, también se han reportado casos discordantes entre la actividad enzimática de la PZAsa y la resistencia a la droga. Por ejemplo, en el estudio de Rahman et al., se ha detectado que el 6,4% de 69 muestras fue resistente según MGIT 960 PZA y carecía de mutaciones en el gen *pncA*, mientras que el 32% de 90 muestras sensibles presentan mutaciones puntuales, silenciosas o múltiples (5, 6). Además, en el estudio de Cui et al., se observó que el 9.5% de 169 cepas resistentes a PZA, de acuerdo con MGIT 960 PZA, eran positivas en la prueba de actividad enzimática Wayne (16), lo que indica que estas cepas tienen una actividad PZAsa fuerte o similar a la cepa silvestre y que la resistencia podría deberse a otro mecanismo. Del mismo modo, en otro estudio se identificó que 8 cepas resistentes en MGIT 960 PZA eran PZAsa positivas en Wayne (17). Ambos estudios coincidieron en que la resistencia a la droga no se debía a la pérdida de la actividad de la PZAsa, sino a alguna otra mutación fuera del gen o del promotor de *pncA*. Por último, en una revisión sistemática de 39 estudios se cuantificó que el 12% de 1125 aislados resistentes a PZA dieron positivo en la prueba de actividad PZAsa, lo que evidencia claramente la discrepancia entre estas dos pruebas de susceptibilidad a PZA (13)

Por otro lado, la ingeniería genética es una herramienta muy utilizada para implementar, mutar o eliminar genes en el genoma de MTB, con la finalidad de comprender el papel e importancia de distintas proteínas en la farmacorresistencia. Además, las técnicas de edición genética en micobacterias se basan en el uso de vectores plasmídicos episomales e integrativos, ya sea para conseguir una mutagénesis directa, un intercambio alélico o la simple implementación de un gen extracromosomal (18,19). Para estos fines, los laboratorios utilizan la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (MTB-H37Rv), que es la más utilizada en investigación por ser la primera cepa virulenta aislada de un paciente con TB y, más importante aún, por contar con el genoma completo actualizado y publicado (20).

En diversos estudios se han utilizado vectores episomales e integrativos para introducir o silenciar genes en MTB (21–23). En un estudio reciente se utilizó el plásmido episomal pNIT-1 para la expresión basal del gen *pncA* de MTB. No obstante, la limitación de estos vectores es que el número de copias del plásmido podría no brindar una expresión basal igual a la del gen de interés. Lo esperado es que la expresión del gen insertado sea igual

a la de la bacteria en estado basal. Si la expresión del gen de interés es baja, se podría inducir una mayor expresión a través de un inductor (p. ej., IVN), pero si la expresión basal es mayor a la esperada, no podría reducirse, lo cual no imitaría la expresión del gen de interés en la bacteria en estado basal (24).

Dado ello, se emplean vectores integrativos por ejemplo El pMV306hsp (Figura 1), que insertan una única copia del gen de interés junto con su promotor nativo en el sitio attB del cromosoma de MTB. Esta estrategia asegura que la transcripción dependa exclusivamente del promotor original y que la dosis génica sea la misma que en la cepa silvestre, lo que produce niveles de expresión muy similares a los basales naturales. Además, los vectores integrativos no comprometen la integridad o funcionalidad de otros genes, ya que su sitio de unión a attB es específico. Uno de los plásmidos más populares para MTB es el plásmido pMV306hsp (19), el cual se basa en un sistema que contiene el sitio attP del fago L5 y una integrasa para la recombinación específica del sitio con el attB del cromosoma de MTB, lo que permite la recombinación íntegra del gen de interés.

Una caracterización precisa de la resistencia a la PZA en MTB requiere un modelo experimental que permita distinguir el aporte de la PZA a la sensibilidad al fármaco. Los aislados clínicos presentan variabilidad genética adicional, incluidos mutaciones en otros loci y mecanismos alternativos de resistencia, que dificultan atribuir de forma exclusiva cualquier cambio fenotípico a la función de *pncA*.

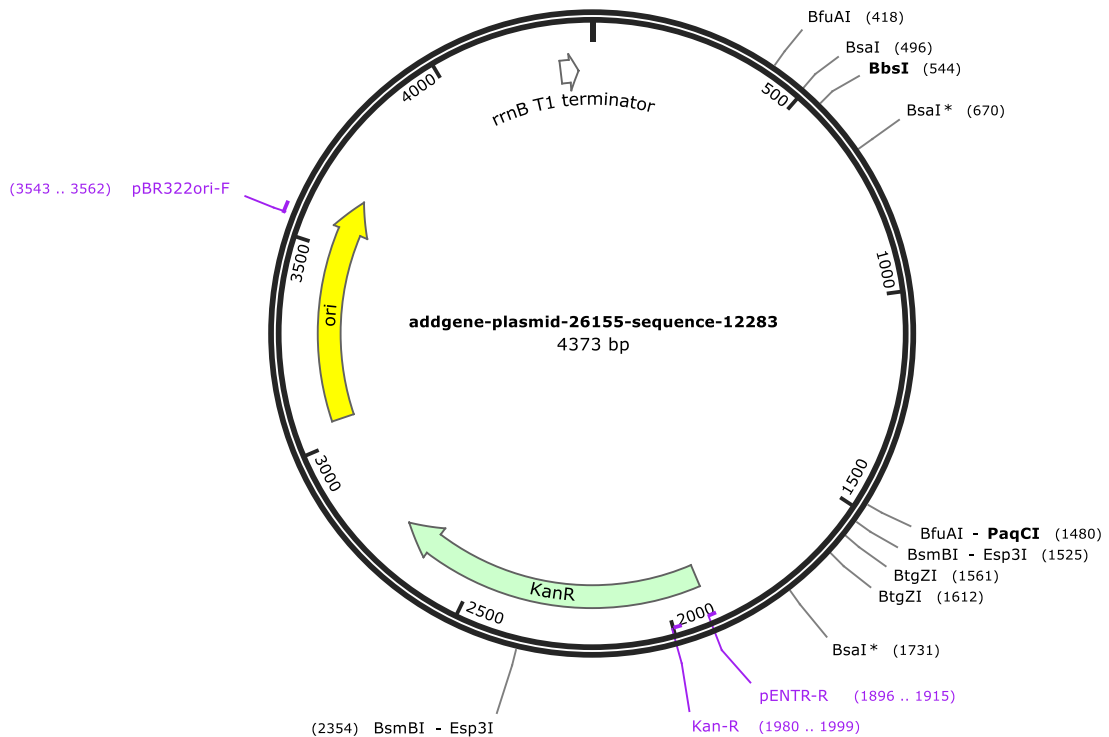


Figura 1. Mapa genético del plásmido integrativo pMV306hsp.

Fuente: Snapgene, 2010.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La resistencia a PZA en MTB representa un desafío creciente para el control de la TB. A nivel mundial, se estima que aproximadamente 1,4 millones de casos nuevos de TB resistentes a PZA ocurren cada año, de los cuales cerca de 270 000 corresponden a TB-MDR (4,5).

La mayoría de los estudios asocian esta resistencia a mutaciones puntuales o deleciones en la región codificante de *pncA*, detectando más de 608 polimorfismos únicos distribuidos a lo largo de los 561 pb del gen (5,6). No obstante, la correlación genotipo-fenotipo no es perfecta: entre un 23 % y un 45 % de las cepas resistentes por MGIT 960 PZA no exhibe mutaciones en *pncA* (6–12 % en algunos estudios locales (24) y hasta un 32 % de las cepas fenotípicamente sensibles aloja mutaciones silenciosas o de bajo impacto en *pncA* (4, 5, 6). Asimismo, variantes en la región promotora de *pncA* pueden reducir drásticamente la transcripción de PZAsa sin alterar su estructura proteica, contribuyendo al fenotipo resistente.

Dicha discordancia ha llevado a identificar mecanismos alternativos de resistencia: mutaciones en la bomba de eflujo Rv1258c (Tap) que incrementan la expulsión de POA y resistencia a isoniazida y estreptomycin; alteraciones en *panD*, que codifica el aspartato descarboxilasa, generando resistencia a PZA sin cambios en *pncA* (25, 26) y mutaciones de plegamiento en regiones alejadas del sitio catalítico de PZAasa que afectan su estabilidad y actividad. A ello se suman las variaciones en los protocolos de susceptibilidad fenotípica, al pH del medio, al inóculo bacteriano y a la lectura de la prueba de Wayne, que pueden producir falsos resultados de resistencia o sensibilidad en hasta un 20 % de los casos (5,6).

En este contexto de alta diversidad genética y técnica, atribuir con certeza el fenotipo resistente a una causa molecular única se vuelve inviable. Por ello, surge la necesidad de un modelo experimental isogénico, donde la única variable sea la presencia o ausencia de *pncA* silvestre, insertado de forma estable en el genoma de una cepa MTB-KO. Un sistema así permitiría cuantificar de manera rigurosa la contribución de la PZAasa a la sensibilidad a PZA, sin la interferencia de otras variantes genómicas ni de sesgos metodológicos.

III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La TB continúa siendo una de las principales causas de mortalidad infecciosa, con más de 10 millones de casos y 1,6 millones de muertes en el 2024 (26). Dentro del régimen de primera línea, la PZA juega un papel clave al eliminar bacilos persistentes tras su conversión a POA (5,6). Sin embargo, la creciente resistencia a PZA, que afecta al 51 % de las cepas TB-MDR frente al 5 % en no-MDR, resalta la importancia de un tratamiento eficaz. Los diagnósticos moleculares actuales, basados en la detección de mutaciones en *pncA*, fracasan hasta en un 32 % de los casos sensibles y permiten la actividad enzimática en el 12 % de los casos resistentes por MGIT 960 PZA (5, 15, 16), lo que evidencia una correlación genotipo-fenotipo insuficiente. Además, los vectores episomales que han intentado complementar *pncA* en cepas sin expresión de la PZAasa presentan limitaciones, tales como la variabilidad en el número de copias dentro de la célula en los cultivos sucesivos, el estrés provocado por el antibiótico de inducción del gen de interés y de pérdida del plásmido, limitando la reproducibilidad de los ensayos (28).

En este contexto, desarrollar un modelo isogénico en el que la única variable sea la restauración estable de *pncA* silvestre, mediante un vector integrativo que garantice una sola copia bajo su promotor nativo, resulta fundamental. Un sistema así es crucial porque, a diferencia de los sistemas episomales que varían en número de copias y pueden perderse durante el cultivo (24), garantiza la inserción única y estable del gen con su promotor nativo en el locus attB del cromosoma (19). Esto reproduce fielmente la dosificación génica y la regulación transcripcional propias de la cepa silvestre, eliminando la fluctuación en los niveles de PZAsa que confunde la interpretación de los ensayos fenotípicos. Al mantener un fondo genético homogéneo y una expresión constante de la PZAsa, esta técnica permite asociar de manera inequívoca cualquier restauración de la sensibilidad a PZA con la presencia funcional de *pncA*, lo que refuerza la validez de los diagnósticos moleculares basados en su detección. Además, al proporcionar un modelo reproducible, facilita el cribado de compuestos que mejoren la eficacia de la PZAsa o contrarresten mecanismos alternativos de resistencia, acelerando el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas frente a la TB resistente.

IV. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

La integración estable del gen *pncA* silvestre, con su promotor nativo, en el locus attB de MTB-KO restaurará la actividad de PZAsa y la sensibilidad a PZA al nivel observado en la cepa salvaje H37Rv.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estandarizar un modelo de complementación genética en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv con delección del gen de *pncA*, que inserte una única copia del mismo gen con su promotor nativo en el locus attB, con el fin de cuantificar la restauración de la actividad de la pirazinamidasa y la recuperación de la sensibilidad a pirazinamida en un fondo genético homogéneo.

5.2 Objetivos específicos

- Clonar la secuencia silvestre del gen *pncA* con su promotor en el vector integrativo pMV306hsp.
- Integrar de forma estable el gen *pncA*, junto con su promotor, en el genoma de MTB-KO.

- Evaluar la expresión funcional del gen *pncA* complementado mediante ensayos fenotípicos (nivel de transcripción de *pncA*, Wayne cualitativo y cuantitativo, TEMA y MGIT 960 PZA en medio ácido pH 6.2).

VI. METODOLOGÍA

6.1 Material biológico

El Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular en UPCH cuenta con un banco institucional de cepas de MTB, resguardadas bajo procedimientos estandarizados y normas de bioseguridad. En el presente estudio se emplearon las cepas H37Rv (WT), H37Rv $\Delta pncA$ (H37Rv KO-*pncA* y $\Delta pncA$:hyg, descrita por Boshoff et al. (28). Las cepas fueron recuperadas de criopreservación y manejadas en condiciones BSL-3 según los procedimientos operativos del laboratorio. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y para la construcción/validación del cassette de complementación de *pncA* se diseñaron *in silico* y se adquirieron de Integrated DNA Technologies (IDT); los reactivos de selección y medios de cultivo se prepararon conforme a las especificaciones del fabricante.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Construcción del plásmido integrativo con el gen *pncA* de MTB-H37Rv

El clonamiento se inició con la amplificación del gen *pncA* y su promotor (Figura 2), usando primers con sitios de restricción para las enzimas XbaI y EcoRI (5' GATATCTAGAGTCATGGACCCTATATCTGTGGC 3' y 5' TATTGAATTCTCAGGAGCTGCAAACCAACTCGA 3'). Se utilizó la 2X Phusion High Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher) para la amplificación. El ciclo de temperaturas fue 98 °C por 10 segundos, 30 ciclos de 98 °C por 1 segundo, 65,5 °C por 5 segundos y 72 °C por 15 segundos, finalizando la amplificación a 72 °C por 1 minuto.

Además, se realizó una doble digestión con las enzimas XbaI y EcoRI. Posteriormente se realizó la purificación de los amplicones de PCR con el PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen).

El plásmido integrativo pMV306hsp se doble digirió con las enzimas XbaI y EcoRI y se purificó a partir del gel con el InnuPREP Plasmid Mini Kit 2.0 (Analytik Jena) de acuerdo con su protocolo. Para la ligación, se utilizaron 20 μ L

de la enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs) y la proporción del plásmido y del inserto fue 5:1. Se dejó ligado por 16 horas a 16 °C. Posteriormente, estos plásmidos se transformaron en células competentes de *E. coli* NovaBlue (Novagen) mediante shock térmico y se seleccionaron las transformantes mediante el cultivo en medio sólido LB con kanamicina (40 µg/mL).

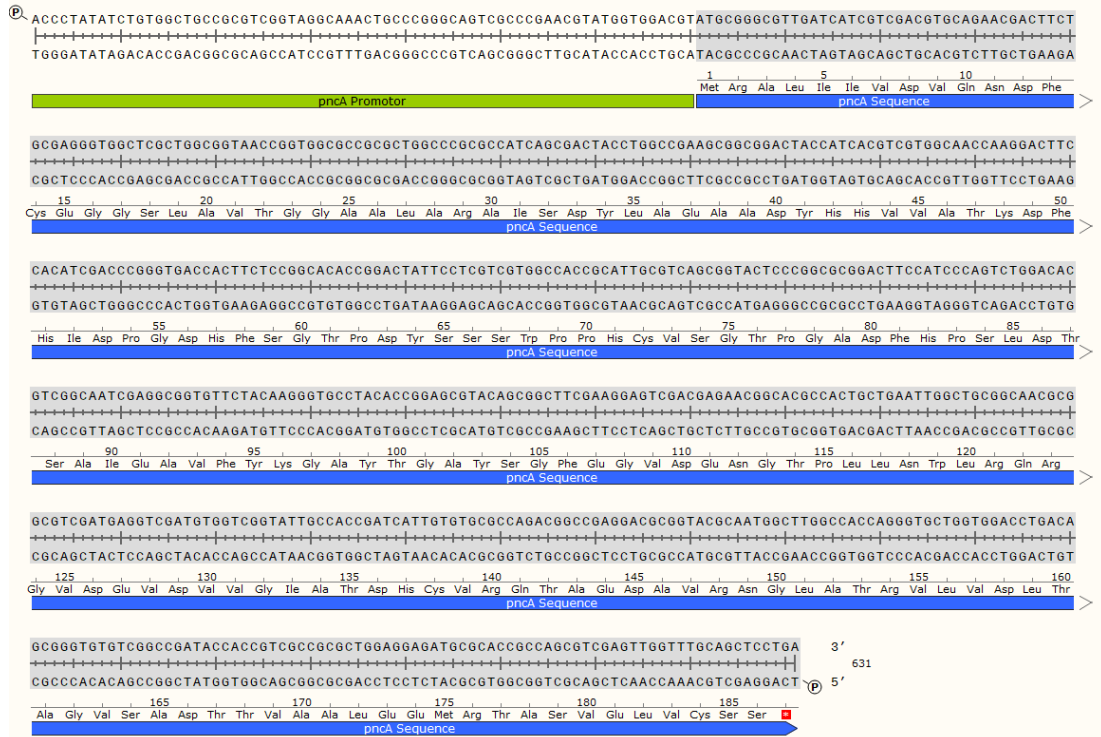


Figura 2. Secuencia del gen *pncA* (azul) y de su promotor (verde) obtenidos de Snapgene 2019. El gen tiene 561 pb y su promotor, 70 pb.

La verificación del inserto se realizó con una doble digestión enzimática utilizando las enzimas XbaI y EcoRI y mediante el secuenciamiento de la región del gen *pncA* más su respectivo promotor utilizando los oligonucleótidos 5' AGT CTT TCG ACT GAG CCT TTC G 3' y 5' TGC GTT ATC CCC TGA TTC TGT GG 3'. Por último, se extrajo y purificó el plásmido a partir de 50 mL de *E. coli* NovaBlue con el innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0 de acuerdo con su protocolo.

7.2 Integración del gen *pncA* en el genoma de *M. tuberculosis pncA-Knockout*

El gen *pncA* se integró en el genoma de MTB-KO a través del vector pMV306hsp (Figura 1). Para ello, primero se clonó el gen *pncA* WT con su promotor en el plásmido pMV306hsp. Posteriormente, se transformó el plásmido recombinante

en la cepa MTB-KO mediante electroporación y finalmente se validó la integración a través de la ampliación de la región integrada por PCR.

Electroporación de MTB-KO con pMV306 hsp60

MTB-KO se sembró en caldo 7H9 enriquecido con OADC y 50 µg/mL de higromicina. La cepa se dejó en agitación continua (100 rpm) en una incubadora con agitación a 37 °C hasta alcanzar un OD600 = 0.5-0.8. Luego, se utilizó el protocolo descrito por Parish (29)

Las células en fase logarítmica se incubaron 16 horas más a 37°C tras adicionarles 5 mL de glicina. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron las células a 3000 g por 10 minutos a 17°C y luego se resuspendieron en 15 mL de glicerol al 10%. Se repitió la centrifugación y se resuspendió con 10 mL de glicerol al 10%. Por último, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y el sedimento se resuspendió en 1 mL de glicerol al 10%. Una alícuota (200 µL) de las células competentes se transformó utilizando el electroporador con el plásmido pMV306hsp (100 ng/µL) o H₂O (control negativo) bajo las siguientes condiciones: 2,5 kV, 25 µF y 1000 Ω.

Las células transformadas se recuperaron y se adicionaron a un tubo que contenía 5 mL de caldo 7H9 sin antibiótico y se incubaron por 24 horas en la incubadora con agitación a 37°C para que expresaran el casete de resistencia a la kanamicina. Por último, las células se cosecharon a 3000 g por 10 minutos a 17 °C y se diluyeron en caldo 7H9 a 1/100 y 1/1000 para luego ser dispensadas en placas Petri con agar 7H10 enriquecido con OADC (7H10+O) y con 20 µg/mL de kanamicina.

Validación de la integración del gen *pncA* en MTB-KO

Las células transformadas seleccionadas se sembraron en placas Petri con agar 7H10 enriquecido con OADC y con 20 µg/mL de kanamicina. Se dejó incubar de 2 a 4 semanas a 37°C para su posterior extracción de ADN genómico, de acuerdo con el trabajo de Soolingen et al. (30). Brevemente, las células de MTB se cultivaron hasta su fase estacionaria y luego se recolectaron por centrifugación. Los bacilos se suspendieron en tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH

8.0) y se lisaron mediante incubación con lisozima (10 mg/mL) a 37 °C durante 1 h. A continuación, se añadió SDS al 1% y proteinasa K (0,1 mg/mL) y se incubó a 55 °C durante 2 h para degradar proteínas. La mezcla se sometió a extracción con fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1), seguida de una segunda extracción con cloroformo puro. El ADN se precipitó con etanol frío y acetato de sodio, se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en tampón TE.

Estos ADN genómicos se usaron para una posterior PCR con los primers Fw_Gen 5' AAA GCG GAT GCG CTA CCA 3' y Rv_Gen 5' CCC ACA GGT TGAC GAC AAG A 3' que detectaron una región del plásmido pMV306hsp integrado en el genoma (Figura 3).



Figura 3. Secuencia amplificada del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv con los primers Fw_Gen y Rv_Gen. Los primers son específicos para las zonas upstream y downstream donde se integrará el plásmido pMV306hsp; cuando el vector esté ausente, el producto amplificado será de 430 pb, mientras que con el plásmido será de 4.8 kb.

7.3 Medición de los parámetros fenotípicos

Después de verificar que el genoma de MTB-KO fue exitosamente integrado con el plásmido recombinante pMV306hsp (MTB-KO-pMV*pncA*), se evaluaron los niveles de transcripción del gen *pncA* y la cantidad de POA producida.

7.3.1 Expresión del gen de *pncA*

Extracción de ARN

Las cepas complementadas con *pncA* se cultivaron por triplicado en 10 mL de caldo 7H9 enriquecido con OADC a 37°C, hasta que la suspensión alcanzó un OD₆₀₀ de 0,8. Posteriormente, las células se cosecharon a 3000 g por 20 minutos a 17 °C y se lavaron con buffer TE pH 8.0. Posteriormente, el sedimento se resuspendió en 800 µL de TRI Reagent (Zymo Research) y se traspasó a un tubo de tapa rosca con perlas de sílice de 0,1 mm. Todo el procedimiento se realizó en el laboratorio de bioseguridad de nivel 3 (BLS3).

Los tubos se desinfectaron convenientemente y se retiraron de la BSL3, luego se colocaron en el equipo Fast Prep (MP, BIomedicals) para ser lisados a 6.5 m/s por 30 seg., dos veces, con un intervalo de espera de 5 minutos en hielo, entre cada ciclo.

Las células lisadas fueron centrifugadas a 12 000 g durante 15 minutos a 4 °C para obtener el sobrenadante o la fase soluble. Se recuperaron 600 µL de esta fase y se agregaron 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente con ayuda del vórtex durante 15 segundos y se incubó por 5 minutos en hielo. Se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4 °C y se transfirió la fase superior a un tubo de microcentrífuga. Se repitió este proceso con cloroformo una vez más. Después, al ARN se le añadieron dos volúmenes de RNA Binding Buffer, seguidos por un volumen igual de etanol absoluto frío. Se transfirió toda la muestra mezclada a la columna Zymo-Spin IIIC (Zymo Research) puesta en un tubo colector y se centrifugó a 16 000 g a 4 °C por 1 minuto. Luego, se añadieron 400 µL de RNA Prep Buffer a la columna y se centrifugó a 16 000 g a 4 °C por 1 minuto. Posterior a ello, se añadió 700 µL de RNA Wash Buffer y se centrifugó a 16 000 g a 4 °C por 1 minuto. Luego, se agregaron 400 µL del mismo buffer y se centrifugó

a 16 000 g a 4 °C por 1 minuto. Finalmente, se añadió 50 µL de agua DEPC y después de 5 minutos de incubación, se centrifugó a 16 000 g a 4 °C durante 2 minutos. Por último, para estimar la concentración de ARN se utilizó el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Todo este proceso se realizó en un laboratorio de nivel de bioseguridad 1.

Retrotranscripción y PCR cuantitativa (RT-qPCR)

El ARN se trató con DNasa I antes de ser utilizado. Para ello se adicionó ADNasa I (Invitrogen) a las muestras de ARN y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, la ADNasa se inactivó a 75 °C por 5 minutos.

La RT-qPCR se inició con el primer mix de primers y el ARN tratado (900 ng), con un volumen total de 12 µL, siendo 1 µL de los random primers, 10 µL del ARN tratado y 1 µL de 10 mM dNTP Mix. Estos se incubaron a 65 °C por 5 minutos y a 4 °C por 2 minutos, respectivamente. Luego, se adicionaron 7 µL del segundo mix (5X First Strand Buffer, 0.1 M DTT, inhibidor de RNasa) (M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen), y se incubó por 10 minutos a 25 °C, 1 hora a 37 °C, 15 minutos a 70 °C e infinito a 4 °C.

Por último, se amplificaron los DNA complementarios de *pncA* y de 16S usando el máster mix SYBR Green (Takara) y los primers 16S Fw 5' TTC TCT CGG ATT GAC GGT AGG T 3' y 16S Rv 5' CGC TCG CAC CCT ACG TAT TAC 3', y *pncA* Fw 5' CGA GAA CGG CAC GCC ACT G 3' y *pncA* Rv 5' CCG TCT GGC GCA CAC AAT G 3'. El umbral del ciclo (CT) se calculó con el software Step One Plus v2.1 (Applied Biosystems). El ensayo se repitió tres veces usando ARN extraído de tres cultivos independientes.

Por otro lado, previo al proceso de RT-qPCR con las muestras de ADNc, se verificó la eficiencia de los primers de *pncA* y 16S. Para ello, se prepararon diluciones (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 y 1:100000) del ADN genómico de MTB-H37Rv y se amplificaron por triplicado usando el máster mix de SYBR Green. Luego, se graficaron los promedios de CTs (eje Y) vs el Log [ADN] (eje X) para obtener la siguiente fórmula: $Y =$

$mX + b$. Donde se obtuvo el valor de la pendiente, la cual se reemplazará en la siguiente fórmula para determinar la eficiencia de los primers:

$$E = 10^{\frac{-1}{m}}$$

La cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes *pncA* (gen de interés) respecto al gen 16S (gen housekeeping) se realizó mediante el método de Livak (31,32). Cabe mencionar que el gen de referencia ya se utilizó en trabajos de RT-qPCR para MTB. Para ello, se utilizaron los valores promedio de los CTs del número de ciclos del PCR. La fórmula de Livak es la siguiente:

$$\text{Proporción de expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Donde:

$$\begin{aligned} \Delta\Delta CT = & (CT_{\text{gen de interés de MT-KO-pMV306pncA}} \\ & - CT_{\text{gen housekeeping de MT-KO-pMV306pncA}}) \\ & - (CT_{\text{gen de interés de MT-KO}} - CT_{\text{gen housekeeping MT-KO}}) \end{aligned}$$

7.3.2 Medición de la cantidad de POA

Cada una de las técnicas aplicadas se realizó en triplicado. Para las respectivas comparaciones, se utilizaron como control positivo la cepa MTB-H37Rv y como control negativo la cepa MTB-KO.

Wayne cualitativo

La prueba Wayne (33,34) se realizó para determinar cualitativamente la producción de POA. Primero, se cogió una asada de cada cultivo (MTB-H37Rv, MTB-KO y MTB-KO-pMVpncA) y se inoculó sobre la superficie del medio Dubos que contenía 100 µg/mL de PZA y se dejó en incubación durante 4 días a 37 °C. Posteriormente, se agregó 1 mL de 1% de sulfato de amonio ferroso a los tubos y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos.

Este ensayo de colorimetría detecta la presencia de POA en el medio Dubos, el cual reacciona con el sulfato de amonio ferroso, y da como resultado la presencia del color naranja rojizo en donde se sembró la cepa.

Wayne cuantitativo

La cuantificación de los niveles de POA se realizó con la prueba de Wayne modificada (33,35). Primero, se suspendieron 2 asadas de cada cultivo (MTB-H37Rv, MTB-KO, y MTB-KO-pMV*pncA*) en tubos de 10x1.5 cm con 5 mL de buffer de citrato y beads de 2.5 mm. Luego, las células fueron disgregadas por agitación en vórtex y se transfirieron 30 µL o más a un tubo con 3 mL de buffer de citrato pH 7,0 hasta conseguir una turbidez de McFarland # 4. Posteriormente, a esta nueva suspensión se le agregaron 100 µg/mL de PZA y se incubó por 0, 12, 24, 36, 48 y 60 horas a 37 °C. Cumplido el plazo, las células se cosecharon a 13000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante con las células fue inactivado por 20 minutos a 95 °C. Por último, se agregaron 100 µL del sobrenadante a una placa de 96 pocillos y 20 µL de sulfato de amonio ferroso al 1% para cuantificar la presencia de POA, ya que al reaccionar con el sulfato genera un color naranja intenso cuantificable, que varía dependiendo de la actividad de la enzima de cada cepa. La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 450 nm.

7.3.3 Detección de susceptibilidad a PZA

MGIT 960

Las cepas complementadas se centrifugaron y se suspendieron en tampón fosfato (pH 6.8) y se ajustaron a un patrón 0.5 de McFarland. Luego la suspensión se diluyó 1/10 y se inoculó 0,5 mL en el tubo control MGIT (que contiene caldo 7H9 a un pH de 5,9 y el suplemento de enriquecimiento PZA), y 0,5 mL en el tubo control MGIT (que contiene caldo 7H9 a un pH de 5,9 y el suplemento de enriquecimiento PZA). Adicionalmente, se realizó otra dilución 1/5 y se agregó 0.5 mL a otro tubo MGIT que contenía caldo 7H9 a un pH de 5,9 más 100 µg/ml de PZA y el suplemento de enriquecimiento de PZA. Los tubos finalmente se incubaron en el equipo automatizado MGIT 960 que monitorea y registra el crecimiento de MTB en los tubos para finalmente reportarlos como sensibles o resistentes. (35).

Ensayo de microplaca con tetrazolio (TEMA)

TEMA es una prueba rápida para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de antibióticos, incluyendo la PZA y su forma activa, el POA, sobre MTB.

Básicamente, las cepas de cada cultivo (MTB-H37Rv, MTB-KO, MTB-KO-pMV y *MTB-KO-pMVpncA*) se cultivaron por 3 o 4 semanas a 37 °C. Posteriormente, se inocularon 2 asadas de cada cepa en distintos tubos de vidrio con 4 beads más 100 µL de 10 % Tween-80. Los tubos se vortexearon por 2 minutos y se dejaron reposar por 20 minutos. Después, el sobrenadante se pasó a otro tubo sin beads y se ajustó la turbidez a McFarland #1 con solución salina Tween (SST). Luego, cada tubo con turbidez análoga se diluyó 25 veces con el medio 7H9 enriquecido con OADC a pH 6.2.

Primero, se agregaron diferentes concentraciones de PZA o POA (1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 µg/mL) diluidas en medio 7H9 a pH 6.2 en placas de 96 pocillos y luego cada cepa fue agregada a distintos pocillos de una placa. La placa se incubó por 5 días o más a 37 °C, y tras observarse crecimiento de las micobacterias en el pocillo control sin antibiótico, se agregaron 50 µL de 0,1 % tetrazolio diluido en etanol y se incubó por 24 horas más a 37 °C (36,37). El MIC se determinó al detectarse la menor concentración de PZA y POA capaz de inhibir el crecimiento de las micobacterias y, por tanto, sin cambio de color en el pocillo. Un cambio de color indica que las bacterias viables de MTB reducen el tetrazolio incoloro a formazán de color púrpura; en cambio, donde la concentración del antibiótico inhibe el crecimiento, no ocurre la reducción y el pocillo permanece incoloro.

7.4 Análisis estadísticos

Cada una de las técnicas aplicadas se realizó por triplicado y los datos se presentaron como media ± desviación estándar (DE). Para las respectivas comparaciones se tuvieron como control positivo la cepa MTB-H37Rv y como control negativo la cepa MTB-KO.

Para evaluar si existían diferencias significativas en la concentración de ácido pirazinóico (POA) producida a lo largo del tiempo por la cepa MTB-KO complementada con el gen *pncA* silvestre, se aplicó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y para las comparaciones múltiples se utilizó Tukey HSD. Este análisis permitió comparar los valores medios de concentración de POA obtenidos en distintos puntos temporales. Esta prueba se analizó con el programa GraphPad Prism 10.5.0. Las diferencias fueron consideradas significativas con un valor de $p < 0.01$. La normalidad de los datos de concentración de POA para cada cepa (MTB-H37Rv, MTB-KO-pMV306*pncA* y MTB-KO) se comprobó mediante la prueba de Shapiro–Wilk, y la homogeneidad de varianzas entre los distintos tiempos de muestreo se evaluó con la prueba de Levene. Ambos análisis se llevaron a cabo en Python 3.9. Se consideraron satisfactorios los supuestos de normalidad y varianzas homogéneas cuando $p > 0,05$.

7.5 Aspectos éticos

Este proyecto fue registrado en el Sistema de Investigación Descentralizado de información y seguimiento a la investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), SIDISI N.º 2017004, bajo la categoría F3. Además, fue exonerado de revisión ética por el Comité Institucional de Ética en Investigación – CIEI-UPCH (Oficio N.º CAREG-ORVEI-079-22) del día 30 de mayo de 2022. En este estudio, se trabajó exclusivamente con la cepa de referencia MTB-H37Rv y su derivado $\Delta pncA$, cumpliendo la normativa de bioseguridad de nivel 3 (BSL-3) del laboratorio Mycobacterium de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en UPCH. Antes de trabajar en esta área, se recibió la capacitación y aprobación para trabajar en la BSL3 y posteriormente se realizó la validación de los ensayos fenotípicos (Figura 4).

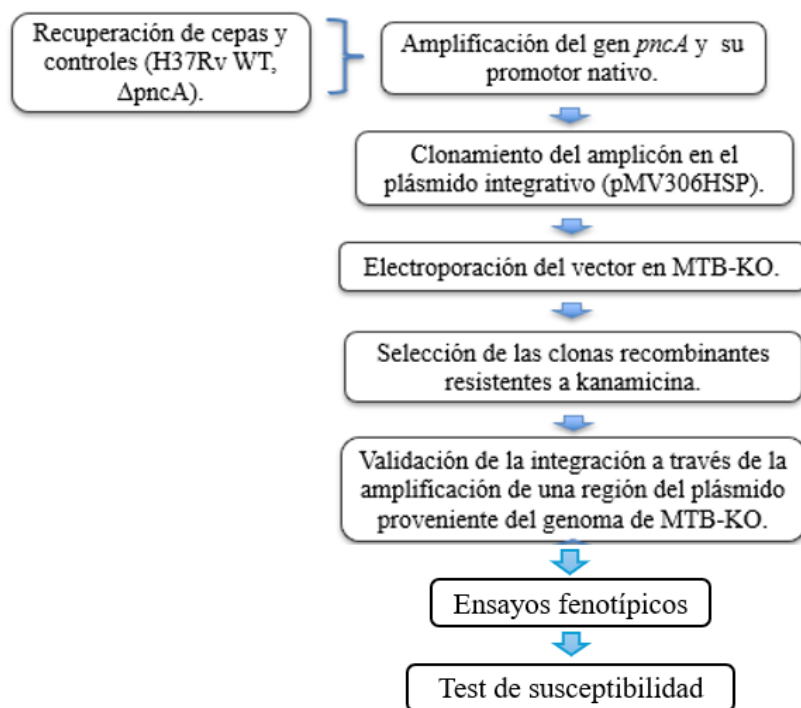


Figura 4. Flujograma de trabajo

VIII. RESULTADOS

8.1 Clonación del gen *pncA* nativo de *M. tuberculosis* H37Rv en el plásmido integrativo pMV306hsp.

Amplificación del gen *pncA* WT más su promotor

El gen *pncA* WT tiene un tamaño de 561 pb y su respectivo promotor de 77 pb. En total, esta región suma 638 pb, las cuales fueron amplificadas con dos primers a partir del ADN genómico de MTB-H37Rv. Por ello, el tamaño del amplicón observado en el gel está alrededor de la banda de 650 pb (Figura 5).

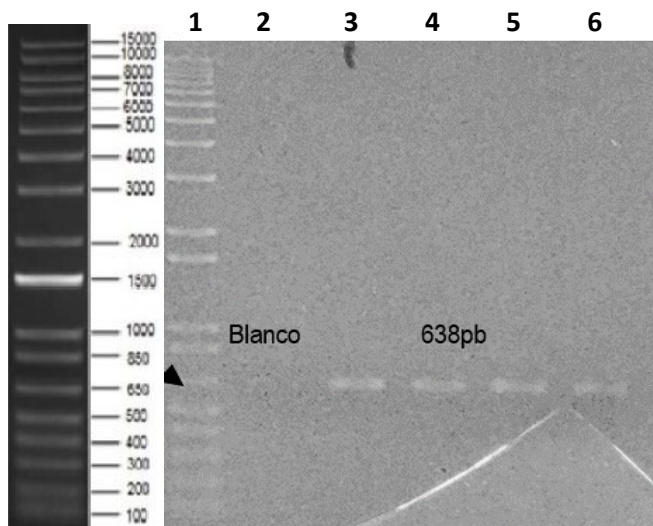


Figura 5. Amplificación del gen *pncA* WT más su promotor. Amplificaciones corridas en un gel de electroforesis al 1% del control negativo (carril 2), MTB-H37Rv (carriles 3-6) y el marcador de peso molecular 1 kb Ladder Plus (Invitrogen) (Carril 1). Se observó el producto amplificado *pncA* WT más su promotor con un tamaño de 638 pb.

Simple y doble digestión del plásmido pMV306hsp

El producto de amplificación del gen *pncA* más su promotor y el plásmido pMV306hsp se cortaron con las enzimas de digestión XbaI y EcoRI para conseguir extremos cohesivos y así permitir que la ligasa actuara en esa región (Figura 6).

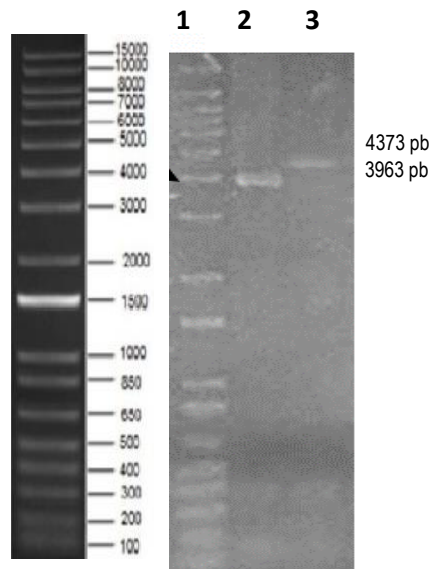


Figura 6. Simple y doble digestión del plásmido pMV306hsp. Electroforesis en gel de agarosa del marcador de peso molecular 1 kB (carril 1), plásmido pMV306hsp doble digerido, 3963 pb (carril 2) y plásmido pMV306hsp simple digerido con la enzima XbaI, 4379 pb.

El plásmido pMV306hsp tiene 4373 pb, y cuando se doble digirió, perdió 416 pb y se quedó con 3963 pb. Cuando el plásmido fue digerido, se clonó con el gen de *pncA* más su promotor, llegó a tener 4621 pb.

Secuenciamiento

Se verificó que el inserto, el gen de *pncA* y su promotor, no tuvieran mutaciones después del clonamiento. Para ello, se inoculó una colonia de cada

clona candidata en 3 mL de medio LB con tetraciclina (50 µg/mL) y kanamicina (40 µg/mL). Posteriormente, se aislaron y purificaron los plásmidos usando el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche, Sigma-Aldrich) y fueron enviados para su secuenciación a MacroGen Inc. usando los primers: Fw_Gen 5' AAA GCG GAT GCG CTA CCA 3' y Rv_Gen 5' CCC ACA GGT TGAC GAC AAG A 3' (Figura 7).



Figura 7. Alineamiento de la secuencia del promotor y el gen de *pncA* versus la secuencia de la región integrada en el vector pMV306.

Transformación del plásmido en *Escherichia coli NovaBlue*

Después de realizar la ligación entre el plásmido integrativo y el amplicón doble digerido y la ligación del plásmido sin amplicón (autoligado), se continuó con la transformación de estas ligaciones en *E. coli NovaBlue* (Figura 8). Las colonias obtenidas en la transformación fueron cultivadas y se extrajo el plásmido por lisis alcalina. Los plásmidos fueron doble digeridos para verificar la inserción del gen de interés en el vector integrativo (Figura 9). Asimismo, al secuenciar los plásmidos para verificar la presencia del gen de interés.

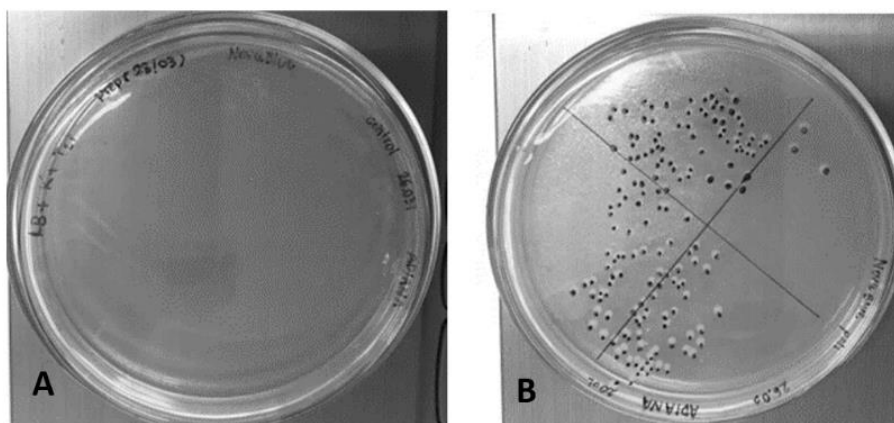


Figura 8. Crecimiento de *E. coli NovaBlue* luego de la transformación con el autoligado y con el plásmido pMV306-*pncA*. Las células transformadas con el plásmido autoligado que fueron sembradas en placas de

LB más kanamicina a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no crecieron (A), mientras que las células con los plásmidos ligados sí crecieron formando colonias (B).

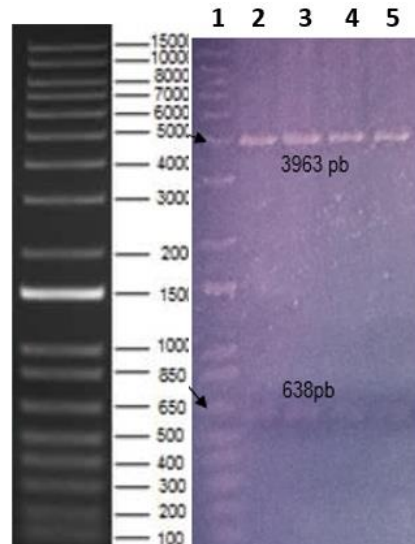


Figura 9. Electroforesis de la doble digestión (*Xho*I y *Nco*I) de plásmidos clonados. En el gel de agarosa se observan dos bandas en algunos carriles, siendo la superior los plásmidos recombinantes pMV306-*pncA* doble digeridos (Carriles 2-5), con una banda de 3 963 pb y la banda inferior de 638 pb que corresponde al gen *pncA*. El carril 1 contiene el marcador de peso molecular 1 kb Ladder Plus de Invitrogen.

8.2 Integración del gen *pncA* nativo más su promotor en el genoma de *M. tuberculosis pncA*-knockout.

Electroporación de MTB-KO

La cepa MTB H37Rv *pncA* knockout fue complementada con la secuencia del gen *pncA* más su promotor a través del plásmido pMV306hsp. Las micobacterias transformadas crecieron en un medio de selección de 7H10+O con kanamicina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

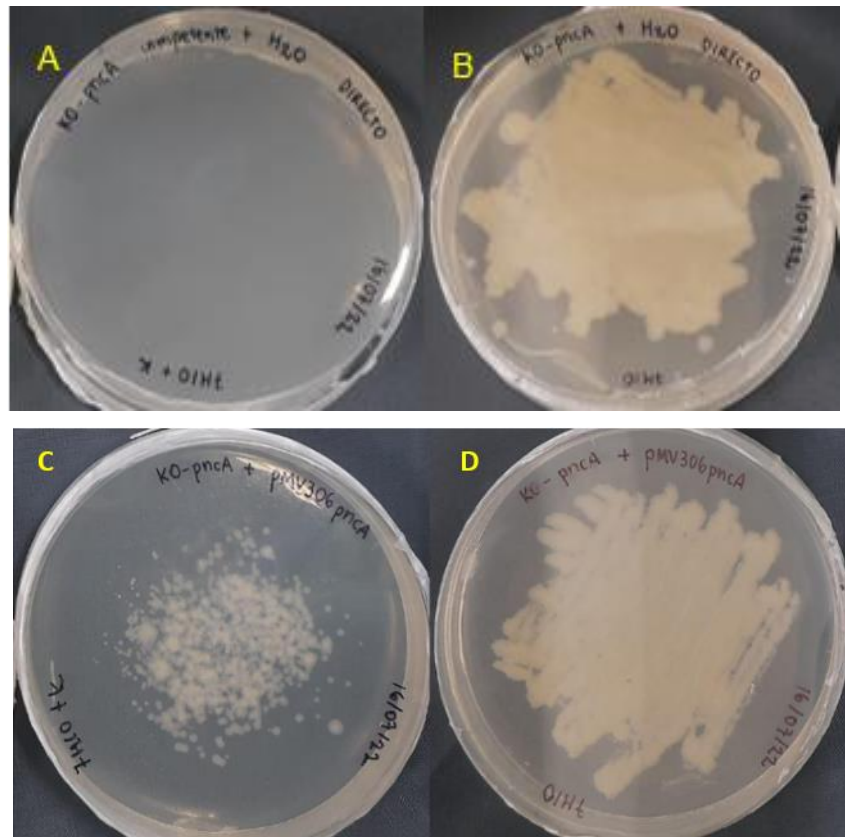


Figura 10. Crecimiento en placa 7H10+O más kanamicina de MTB-KO después de ser electroporado con H₂O y el plásmido. (B y D) Placas con kanamicina en donde se sembró MTB-KO electroporado con H₂O y con el plásmido, respectivamente. (A y C) Placas sin antibiótico en donde se sembró MTB-KO electroporado con H₂O y con el plásmido, respectivamente.

En la placa 7H10+O más kanamicina donde se sembró el control negativo de la electroporación (placa A) no se observa crecimiento bacteriano, debido a que la bacteria electroporada con H₂O no posee ningún caset de resistencia. Mientras que en la placa sin antibiótico (placa B) sí se observa crecimiento. Por otro lado, en las placas con y sin antibiótico (placas C y D), donde se sembró la micobacteria electroporada con el plásmido pMV-pncA, sí se observa crecimiento, ya que el plásmido le otorga resistencia a la kanamicina (Figura 10).

Extracción de ADN genómico de la micobacteria complementada

El ADN genómico de las cepas electroporadas se extrajeron mediante el método de Somerville (38) Para verificar que el plásmido se integró en el

genoma exitosamente (Figura 11), se diseñaron plásmidos upstream y downstream a las zonas donde se integró el plásmido al genoma, para corroborar la integración a través de la diferencia de pares de bases de los productos amplificados. En otras palabras, el amplicón del genoma de MTB-KO sin el plásmido es de 431 pb, mientras que el amplicón del genoma más el plásmido integrado es de 4,8 kb (Figura 12).

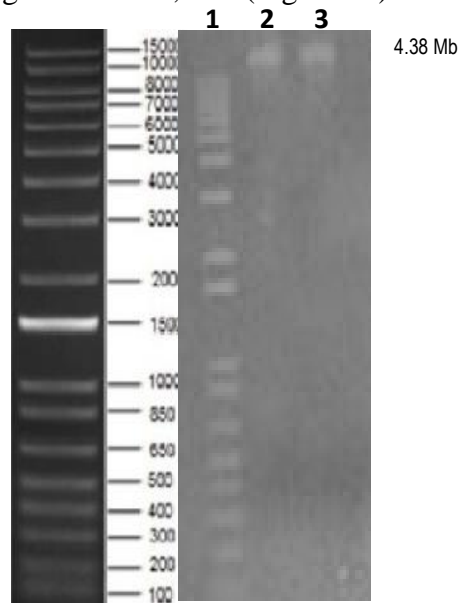


Figura 11. ADN genómico de la cepa MTB-KO-pMV*pncA*. El tamaño del genoma es de aproximadamente ~4.38 Mb. El marcador 1k plus Ladder está a la derecha del gel (1), mientras que las muestras de ADN están al lado izquierdo (2 y 3).

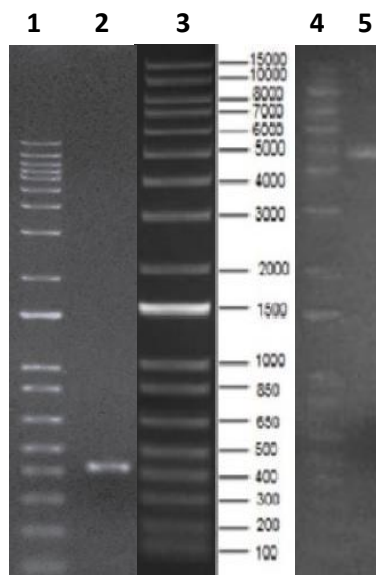


Figura 12. Producto amplificado (PA) del genoma de MTB-KO (2) con 413 pb y de MTB-KO-pMV*pncA* (5) con 4,8 kb. En los carriles 1, 3 y 4 está el marcador 1 kb Ladder Plus.

8.3 Parámetros fenotípicos: Detección de ácido pirazinoico

La presencia de POA es un indicativo de la actividad enzimática de la PZAsa. Por ello, dentro de los parámetros fenotípicos para evaluar la resistencia a PZA se consideran el Wayne cualitativo y el Wayne cuantitativo. Siendo el último el más utilizado para determinar la concentración y la cinética de POA.

Wayne cualitativo

Los resultados de la producción de POA en presencia de la droga PZA de la MTB-KO-pMV*pncA* complementada y de los controles (MTB-H37Rv, la MTB-KO y un tubo sin micobacterias) se muestran en la figura 13. La cepa MTB-H37Rv y la complementada tomaron un color rosado anaranjado, ya que tuvieron una actividad de PZAsa similar, mientras que en los tubos de MTB-KO y del blanco no se observaron cambios de color debido a la ausencia de actividad de la enzima PZAsa y, en consecuencia, a la no producción de POA.

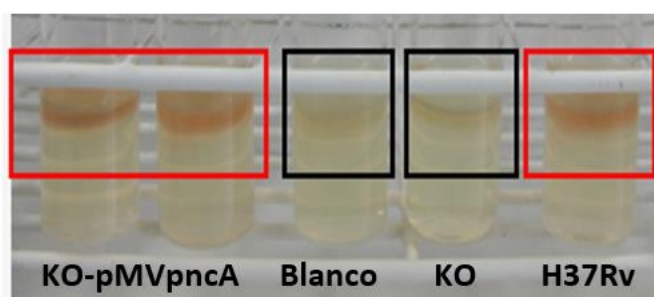


Figura 13. Wayne cualitativo de la cepa complementada con *pncA* WT más su promotor y sus respectivos controles. Crecimiento en medio Dubos para verificar la presencia de POA en las repeticiones de la cepa complementada MTB-KO-pMV306*pncA* (KO-pMV*pncA*), la cepa resistente a PZA MTB-KO (KO) que no produce POA, el blanco (Blanco) y el control positivo MTB-H37Rv (H37Rv).

Expresión del gen *pncA*

Los niveles de ARN de todas las cepas extraídas oscilaron entre 300 y 500 ng/ μ L. Los ratios de pureza oscilaron entre $A_{260}/A_{280} = 1,8$ y $1,9$ y A_{260}/A_{230} mayor a $1,85$. Además, para evaluar la integridad de las muestras de ARN se procedió a correr las muestras en un gel de electroforesis donde se visualizaron los ribosomas bacterianos 23 S, 16 S y 5 S, y también ADN genómico, por lo que se prosiguió con el tratamiento con DNasa I (Invitrogen) para evitar el ruido producto de la presencia del gen de interés en el ADN genómico (Figura 14).

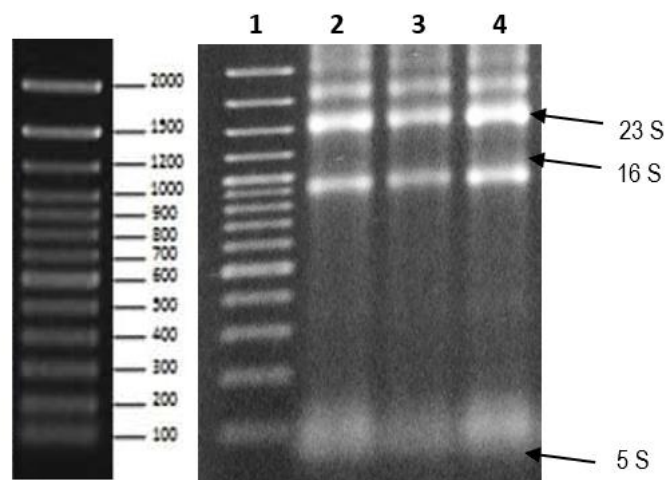


Figura 14. Corrida electroforética en agarosa al 1,5 % con buffer TBE 1X, con 2 μ g de ARN total extraído. (1) Marcador 100 pb (Invitrogen), (2) ARN de la cepa MTB-H37Rv, (3) ARN de la cepa MTB-KO y (4) ARN de la cepa MTB-KO-pMV*pncA*. Las bandas señaladas corresponden a las subunidades del ARN ribosomal.

Después de culminar con la limpieza del ADN en las muestras, se cuantificó el ARN total, y se obtuvo alrededor de 100 ng/ μ L de ARN de cada cepa (Figura 15). Posteriormente, se utilizaron 400 ng para el proceso de retrotranscripción. Previo al inicio de la RT-qPCR, se evaluó la eficiencia de amplificación para los primers de *pncA* y del 16S, los cuales fueron 103,4 % y 98%, respectivamente (Figura 16).

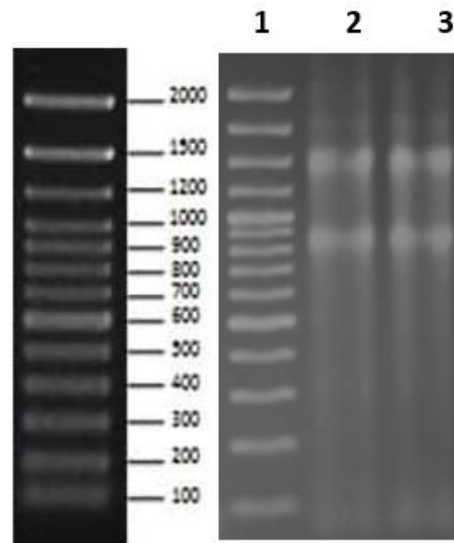


Figura 15. Corrida electroforética en agarosa al 1,5 % en buffer TBE 1X de 1 μ g de ARN tratado. (1) Marcador 100 pb (Invitrogen), (2) ARN de la cepa MTB-H37Rv y (3) de la cepa MTB-KO.

A través de la cuantificación relativa de la abundancia del ARNm calculada mediante el método Livak, siendo el gen constitutivo el gen housekeeping 16S y el gen de interés *pncA*, se obtuvo que los valores de CT del gen 16S fueron de 7 para la cepa MTB-KO y 13 para la cepa MTB-H37Rv y MTB-KO-pMV*pncA*. Los Cts de los controles sin transcriptasa reversa estuvieron entre 25.85 a 26.88, siendo la diferencia entre los Cts positivos y negativos 12 y 18, respectivamente, lo cual indicaría la presencia de bajas concentraciones de ADN en las muestras de ARN tratadas y utilizadas para el proceso de RT-qPCR.

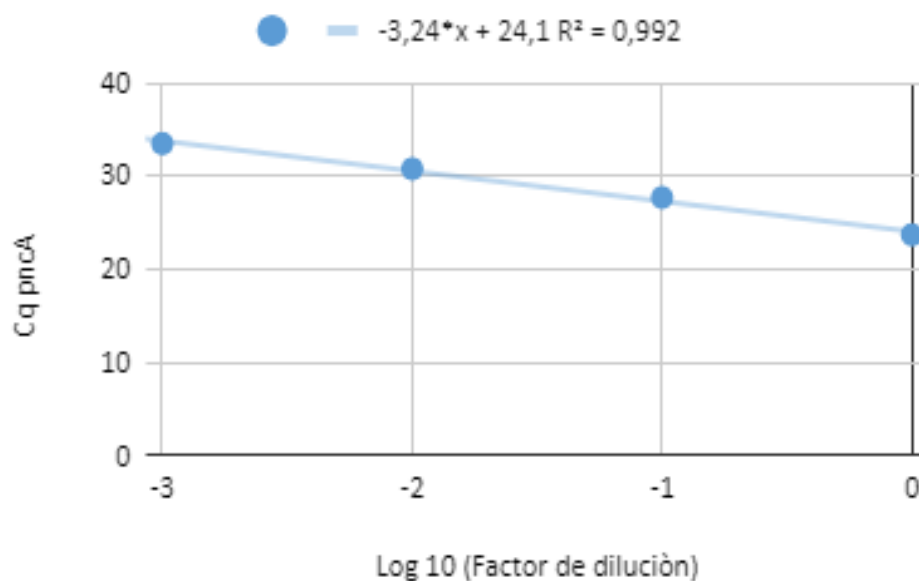


Figura 16. Curva estándar para determinar la eficiencia de amplificación de *pncA*.

La expresión de *pncA* en MTB-H37Rv con respecto a MTB-KO-pMV*pncA* resultó en un *Fold Change* de 1.33, por lo que se considera que la integración del gen *pncA* y su promotor en el genoma de MTB-KO generó la expresión basal del gen *pncA*. Además, la expresión de *pncA* en MTB-KO (CT 26,43) con respecto a MTB-H37Rv (CT 22,96) resultó en un *Fold Change* de 0,001 confirmando que la cepa MTB-KO tiene una muy baja expresión del gen *pncA* (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de expresión y CTs de los genes *pncA* y *16 S* para las cepas MTB-H37Rv, MTB-KO y MTB-KO-pMV*pncA*.

<i>Cepa</i>	<i>Gen</i>	<i>Ct</i>	<i>Fold change</i>	σ
<i>MTB-H37Rv</i>	<i>pncA</i>	22,96	1,0	0
	<i>16S</i>	13,207		0
<i>MTB-KO</i>	<i>pncA</i>	26,43	0,001	0.2
	<i>16S</i>	7,425		0.2
<i>MTB-KO-pMV306pncA</i>	<i>pncA</i>	22,54	1,33	0.4
	<i>16S</i>	13,84		0.8

Wayne cuantitativo

Antes de determinar la concentración de POA producido por las distintas cepas, se calculó la ecuación lineal de la curva estándar de POA en buffer de citrato. Para ello, se graficaron las concentraciones conocidas de POA (0.4, 2, 4, 8, 12 y 16 mM) en el eje Y y sus respectivas absorbancias a 450 nm en el eje X (Figura 17).

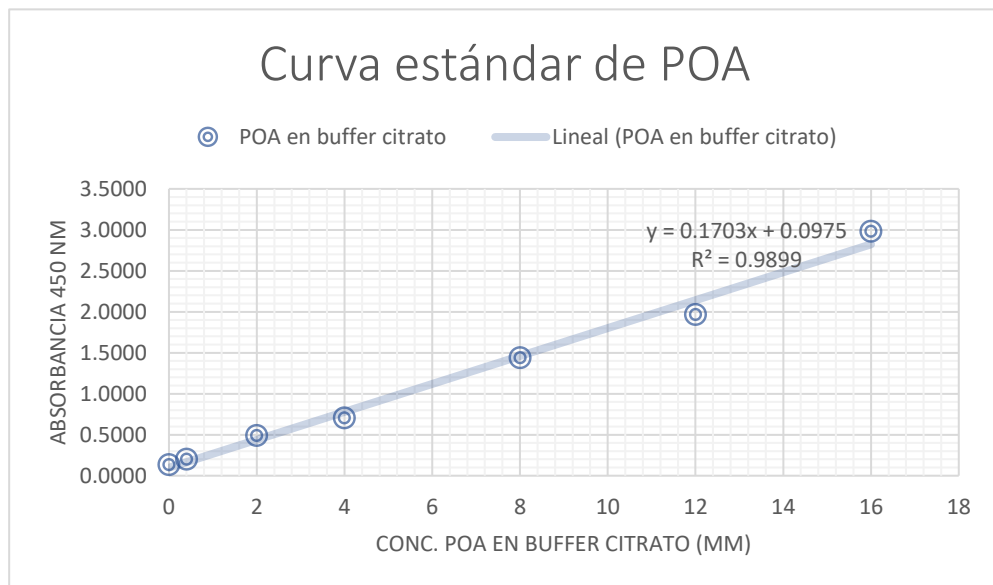


Figura 17. Curva estándar de POA en buffer de citrato.

A partir de la fórmula de la curva estándar de POA se calcularon los valores de la pendiente (m) y de la ordenada (b), siendo 0.1703 y 0.0975, respectivamente.

$$Y = m x + b$$

Donde:

Y = Absorbancia de POA

m = Pendiente de la recta

b = Ordenada de la recta

Estos valores se reemplazaron en la segunda fórmula para determinar la concentración de POA producido por el blanco y aplicarlo como factor de corrección.

$$Bco = \left(\frac{Abs_{blanco} - b}{m} \right)$$

Donde:

Bco = “Concentración” del blanco como factor de corrección

Abs_{blanco} = Absorbancia del blanco

Reemplazando los valores obtuvimos que:

$$Bco = \left(\frac{0.1605 - 0.0975}{0.1703} \right)$$

$$Bco = 0.3699$$

Por último, reemplazando el valor de Bco se obtuvo la fórmula final, con la cual se determinó la concentración de POA:

$$[POA] = \left(\frac{Abs_{cp} - b}{m} \right) - Bco$$

Donde:

[POA] = Concentración de POA

Abs_{cepa} = Absorbancia de POA de una cepa específica

$$[POA] = \left(\frac{Abs_{cp} - 0.0975}{0.1703} \right) - 0.3699$$

Después de obtener las absorbancias de los sobrenadantes recolectados en distintos tiempos (0, 12, 24, 36, 48 y 60 horas), se observó que la cepa MTB-KO no cambió de color a lo largo del tiempo; sin embargo, la absorbancia aumentó ligeramente. No obstante, las concentraciones de POA de la cepa MTB-KO seguían inferiores a las de la cepa MTB-H37Rv en el tiempo cero. Por otro lado, en la placa se observó un ligero aumento en la intensidad en el color de la cepa MTB-KO-pMVpncA respecto a la cepa MTB-H37Rv lo cual está relacionado con la concentración de POA producido, siendo mayor en la cepa complementada respecto a la cepa MTB-H37Rv, con valores de POA de 0,935 y 0,728 mM a las 60 horas, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de POA de las cepas MTB-H37Rv, MTB-KO-pMVpncA y MTB-KO.

HORAS (H)	CONCENTRACIÓN DE POA (MM)					
	MTB-H37Rv		MTB-KO- pMVpncA		MTB-KO	
	Promedio	σ	Promedio	σ	Promedio	σ
0	0,290	0.04	0,213	0.15	0,187	0.02
12	0,299	0.03	0,335	0.16	0,214	0.01
24	0,407	0.04	0,455	0.01	0,239	0.03
36	0,442	0.02	0,608	0.05	0,268	0.03
48	0,552	0.05	0,728	0.13	0,242	0.01
60	0,728	0.08	0,935	0.03	0,257	0.05

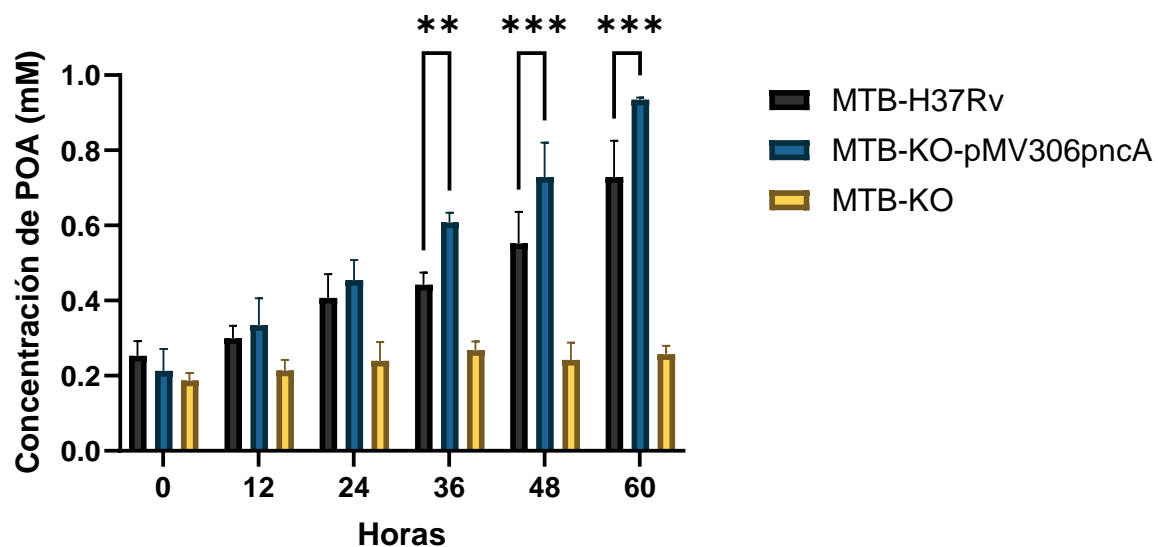


Figura 18. Distribución de las concentraciones promedio de POA. La figura representa el promedio de los resultados de tres sobrenadantes y las barras representan la desviación estándar. Diferencias significativas entre los grupos: **p<0.01, *p<0.001. Las diferencias no significativas entre MTB-H37Rv y MTB-KO-pMV306 no se graficaron. Asimismo, todas las diferencias entre MTB-H37Rv y MTB-KO o MTB-H37Rv-pMVpncA y MTB-KO no se muestran por el tamaño límite de la figura, pero todas son significativas (p<0.01).**

Después de calcular la concentración de POA a partir de sus valores de absorbancia, se confirmó que los datos obtenidos tenían una distribución normal y la homogeneidad de varianzas, a través de los métodos de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente (Tabla 3). Finalmente, tras el análisis de ANOVA, se confirmó que no existían diferencias significativas en el tiempo cero entre las tres cepas. Además, a partir de las 36 horas se observó una diferencia significativa entre MTB-H37Rv y MTB-KO-pMV306*pncA*, mientras que la cepa MTB-KO se mantuvo constante con niveles inferiores a 0.2 mM, sin incrementos significativos a lo largo de todo el experimento (Figura 18).

Tabla 3. Resultados de las pruebas de normalidad (Shapiro–Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene) para las concentraciones de POA en distintas cepas de *M. tuberculosis*.

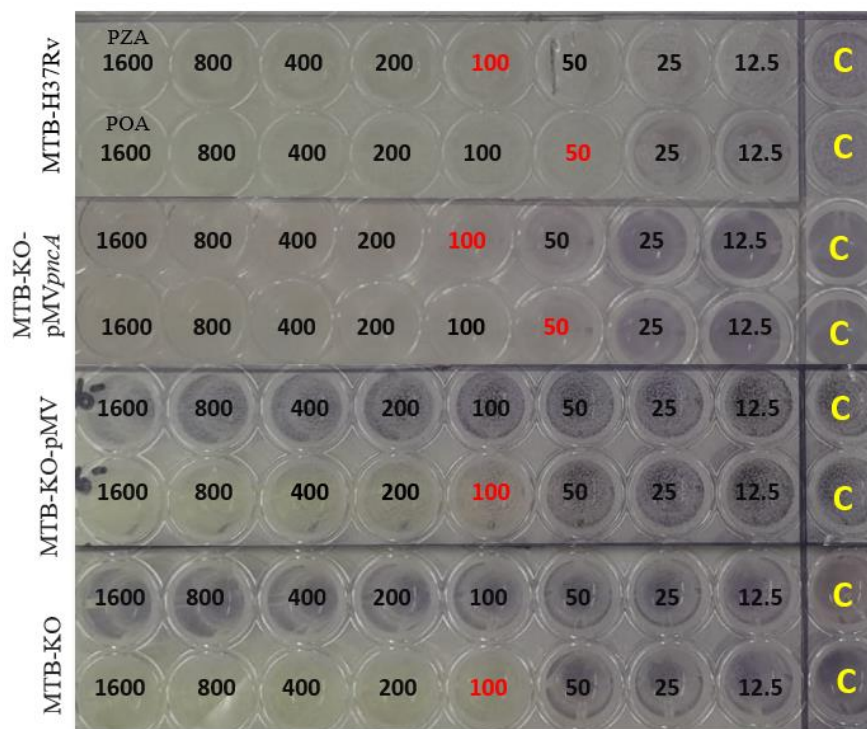
Cepa	Shapiro-Wilk		Levene	
	W	Valor p	F	Valor p
MTB-H37Rv	0.9173	0.4864	0.3616	0.8651
MTB-KO-pMV306 <i>PNCA</i>	0.9824	0.963	0.5854	0.7113
MTB-KO	0.947	0.7162	0.4509	0.8049

MGIT 960

En el ensayo MGIT 960, MTB-KO se categorizó como resistente; en cambio, H37Rv y MTB-KO-pMV*pncA* fueron clasificados como susceptibles. En las cepas susceptibles, los tubos con PZA se mantuvieron negativos o mostraron tiempos a positividad (TTP) significativamente más altos que sus controles; en cambio, en MTB-KO los TTP con PZA fueron parecidos al control, lo que confirmó el crecimiento bajo al medicamento. Se verificó una concordancia total con Wayne confirmando la complementación cromosómica de *pncA* en copia única.

Ensayo de microplaca con tetrazolio (TEMA)

Las cepas MTB-KO y MTB-KO-pMV fueron resistentes a PZA en todas las concentraciones utilizadas, mientras que los valores de MIC en POA fueron 100 $\mu\text{g/ml}$ para ambas cepas. Lo cual indica que la presencia del plásmido recombinante no afecta la sensibilidad de la bacteria MTB-KO. No obstante, si se compara con la cepa MTB-H37Rv, se observa que la susceptibilidad a POA se redujo a 50 $\mu\text{g/mL}$. Por último, el MIC de la cepa recombinante con el gen de *pncA* fue de 50 $\mu\text{g/mL}$ para POA y 100 $\mu\text{g/mL}$ para PZA, al igual que la cepa MTB-H37Rv (Figura 19).



pH: 6.2

Figura. 19. Prueba de sensibilidad TEMA para PZA y POA a pH 6.2. Las cepas que se utilizaron fueron MTB-H37Rv y MTB-KO-pMVpncA, las cuales presentaron un MIC de 50 $\mu\text{g/mL}$ para POA y de 100 $\mu\text{g/ml}$ para PZA. Las otras dos cepas fueron MTB-KO, y MTB-KO-pMV, con MIC de 100 $\mu\text{g/mL}$ para POA, e indetectable para PZA (>1600 $\mu\text{g/mL}$). En la parte derecha se muestran los controles (C) del ensayo, donde no se agregó droga, solo el solvente.

IX. DISCUSIÓN

En el presente estudio se confirmó que la integración del gen *pncA* más su promotor en el genoma de la cepa MTB-KO restauró la susceptibilidad de la cepa a la droga PZA. Dado que, al restaurarse los niveles de expresión del gen *pncA* y, por tanto, la actividad de la enzima PZAsa, se promovió la producción de POA, lo cual se detectó tanto en el Wayne cualitativo, Wayne cuantitativo y TEMA, mostrando resultados similares a la cepa de referencia MTB-H37Rv. El vector pMV306hsp ha sido empleado en MTB sin afectar la expresión de genes adyacentes. En este estudio, se logró la correcta integración de una copia del gen silvestre de *pncA* en el genoma de MTB-KO.

A lo largo de los años, la modificación genética en la bacteria MTB ha avanzado enormemente. Al ser una bacteria difícil de manipular, no solo por la barrera física de su pared bacteriana o por su tiempo de crecimiento, sino también por las condiciones en las que se tiene que trabajar por ser un patógeno altamente infeccioso y contagioso, requiere de instalaciones de bioseguridad 3 para cultivarlas (39). No obstante, la necesidad de dilucidar los mecanismos de infección y latencia que usa la bacteria para eludir al sistema inmune y volverse resistente a determinada droga, es una prioridad de interés mundial. Es por ello, que ahora existen más herramientas para modificar genéticamente a esta bacteria, así como los plásmidos con sistemas recombinantes de ADN que sirven para ingresar material genético de interés en el genoma del bacilo (18,19,21–23,40).

En este estudio se utilizó el plásmido pMV306hsp, el cual integró exitosamente el gen *pncA* más su promotor en el genoma de la cepa MTB-KO y, además, permitió la expresión de un fenotipo equivalente al de la cepa MTB-H37Rv. Además, en los estudios donde utilizan este plásmido no se han reportado cambios en la expresión del gen de interés o en la regulación transcripcional, tras ser integrados con un determinado promotor.(41–43) Por último, si bien el plásmido tiene la secuencia del promotor de una *heat shock protein* (HSP), en este estudio se utilizó el promotor de *pncA* porque no se conocía el nivel de expresión del gen de interés bajo este promotor y si generaba una expresión idéntica a los niveles de expresión de la cepa MTB-H37Rv.

Gracias a los resultados del RT-qPCR se concluyó que los niveles de expresión de *pncA* producidos en la cepa MTB-KO-pMV306*pncA* eran similares a los de la cepa MTB-H37Rv (Fold change = 1,33). Sin embargo, también hay una ligera mayor expresión del

gen en comparación con la cepa WT. Además, los niveles de expresión del gen *pncA* de la cepa MTB-KO eran 0,001, casi 100 veces menores respecto a la cepa MTB-H37Rv. La importancia de analizar los niveles transcripcionales del gen de *pncA*, recae en que niveles inferiores de su expresión causan resistencia a PZA (44). Por lo que, al ser este un estudio donde se pretende diseñar un modelo ideal para evaluar el efecto del gen de *pncA* sobre la resistencia a PZA, es importante que los niveles de expresión de esta proteína no sean alterados, y que, por tanto, tengan un nivel transcripcional casi igual al de la cepa MTB-H37Rv, tal como observamos en los resultados mostrados.

En los resultados fenotípicos del Wayne cualitativo, se observó que la producción de POA, como la intensidad del color, de la cepa MTB-KO-pMV*pncA* era muy similar a la de la cepa MTB-H37Rv. Posteriormente, tras calcular las concentraciones de POA a partir de las absorbancias de las placas del Wayne cuantitativo, se determinó que no existían diferencias significativas entre los niveles extracelulares de POA de la cepa MTB-KO-pMV*pncA* y de la MTB-H37Rv tras cero horas de incubación. Sin embargo, los niveles de POA eran significativamente mayores (* $p < 0.05$) en la cepa complementada después de 12 horas y en adelante. Lo cual podría relacionarse con la expresión ligeramente mayor detectada en la expresión del gen de *pncA*. Además, se observó que la cantidad de POA liberada era tiempo-dependiente para las cepas, MTB-H37Rv y la complementada.

Respecto a los resultados de TEMA, las cepas MTB-H37Rv y MTB-KO-pMV*pncA* obtuvieron un MIC de 50 $\mu\text{g/ml}$ para POA y 100 $\mu\text{g/ml}$ para PZA; ello confirma que la sensibilidad de la cepa complementada es restaurada después de la integración con el gen *pncA* más su promotor. Las otras dos cepas fueron resistentes a PZA, MTB-KO y MTB-KO-pMV, con MIC de 100 $\mu\text{g/ml}$ para POA e indetectable para PZA ($>1600 \mu\text{g/ml}$). Lo cual confirma la crucial actividad de la PZAsa (6) para que la cepa sea sensible a la droga (7,8). Además, la cepa MTB-KO sin o con el plásmido integrativo vacío no influye en la sensibilidad de la droga. Por otro lado, la prueba de MGIT 960 corroboró la restauración de la susceptibilidad en la cepa complementada, mas no en la cepa MTB-KO. Los tubos de las cepas MTB-H37Rv y la cepa MTB-KO-pMV*pncA* permanecieron negativos, indicando inhibición del crecimiento por inhibición de PZA. En cambio, en la cepa MTB-KO, el tubo salió positivo, lo que refleja el crecimiento pese a la presencia del fármaco. En conjunto, los resultados corroboran que la complementación cromosómica de *pncA* en copia única restaura la susceptibilidad a PZA.

Los resultados concuerdan con la función del sistema integrado, ya que este vector logró integrar exitosamente el gen *pncA* más su promotor en la cepa MTB-KO y generó que la expresión del gen fuera dependiente exclusivamente de su promotor. Además, se confirmó, a través de los niveles de expresión de *pncA*, concentraciones de POA, la actividad de PZAsa en los ensayos de Wayne cualitativos y cuantitativos y el TEMA, que la cepa MTB-KO produjo parámetros fenotípicos equivalentes a MTB-H37Rv, convirtiéndose en una cepa sensible a PZA. Por ello, se afirma que este modelo sería ideal para evaluar el efecto de la expresión controlada del gen de *pncA* más su promotor y su efecto en la susceptibilidad a PZA.

Diversos trabajos han abordado las mutaciones de *pncA* con estrategias funcionales y genómicas. Por un lado, los enfoques isogénicos en *M. tuberculosis* han sido clave para probar causalidad: la construcción $\Delta pncA$ por intercambio alélico y su complementación demostraron que la actividad de *pncA* gobierna el fenotipo a PZA (24). Más recientemente, Yadon et al. transformaron una H37Rv *pncA*-nula con una biblioteca de variantes de *pncA* utilizando un vector integrativo L5 bajo el promotor MOP, lo que generó sobreexpresión y hipersusceptibilidad a PZA. Y mediante ensayos fenotípicos, incluyendo MGIT, catalogaron centenares de sustituciones causales distribuidas a lo largo de todo *pncA* (45). En contraste con esa sobreexpresión bajo promotor fuerte, nuestro estudio estandariza una complementación cromosómica de copia única bajo promotor nativo y evalúa el efecto de la incorporación de una secuencia específica con Wayne y TEMA en un fondo isogénico, minimizando artefactos de dosis génica y permitiendo atribuir directamente el efecto del alelo sobre la susceptibilidad.

Por otro lado, en aislados clínicos, estudios multicéntricos han correlacionado secuenciación de *pncA* con pruebas fenotípicas y actividad PZasa, mostrando una amplia dispersión de mutaciones (lo que limita pruebas moleculares basadas en “hotspots”) y revelando casos de mezcla de subpoblaciones o grandes deleciones que confunden la interpretación.(46,47). En paralelo, los predictores estructurales de *pncA* proponen clasificar variantes según su impacto sobre la estructura de la enzima y han mostrado buena concordancia con cohortes clínicas (48). En este panorama, nuestro aporte se posiciona como un ensayo causal, isogénico y estandarizado que conecta el genotipo con el fenotipo bajo expresión nativa.

En muestras clínicas es habitual encontrar múltiples mutaciones tanto en *pncA* como en otros genes vinculados a la respuesta a PZA (por ejemplo, Rv1258c o *panD*), e incluso la presencia de varias sustituciones en el mismo gen. Esta complejidad puede distorsionar las lecturas de MGIT 960/Wayne/TEMA respecto del genotipo. En este contexto, evaluar en nuestro sistema isogénico el haplotipo clínico completo de *pncA* (todas las variantes en cis, bajo expresión nativa y copia única) permite estimar su efecto funcional neto sobre la sensibilidad a PZA. Cuando el haplotipo no rescata plenamente el fenotipo, se podría evaluar cada mutación utilizando métodos complementarios para identificar la(s) variante(s) causal(es) y distinguir alelos funcionales, hipomorfos o de pérdida de función.

X. CONCLUSIONES

En conclusión, la integración estable de una única copia del gen *pncA* silvestre, junto con su promotor nativo, en el locus attB de MTB-KO restauró la expresión, la producción de POA y la sensibilidad a PZA. Esto confirma que el sistema de integración de genes mediante el vector pMV306hsp funciona como una herramienta genética para restaurar la actividad biológica de un gen, y que la integración precisa del gen y su promotor en el genoma de la cepa knockout, favorece una expresión estable y equiparable a la cepa de referencia MTB-H37Rv.

XI. LIMITACIONES

Aunque este modelo integrativo demuestra eficazmente la restauración de la actividad de *pncA* y la sensibilidad a PZA en condiciones de cultivo controladas, presenta la siguiente limitación; La estabilidad de la integración se comprobó a corto plazo y bajo presión selectiva mínima; su mantenimiento tras múltiples pases en ausencia de antibiótico o en condiciones de estrés (pH ácido) no fue analizado. Además, se podrían determinar los niveles de expresión de la proteína de PZA tras la integración exitosa del gen de interés mediante Western Blot.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2024 [Internet]. 2024 Oct [cited 2025 Feb 15]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240101531>
2. WHO global lists of high burden countries for tuberculosis (TB), TB/HIV and multidrug/rifampicin-resistant TB (MDR/RR-TB), 2021-2025 Background document. 2021 [cited 2025 Sep 27]; Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
3. Zumla AI, Gillespie SH, Hoelscher M, Philips PPJ, Cole ST, Abubakar I, et al. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: Needs, advances, and future prospects. Vol. 14, *The Lancet Infectious Diseases*. 2014.
4. Nunn AJ, Jindani A, Enarson DA. Results at 30 months of a randomised trial of two 8-month regimens for the treatment of tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2011;15(6).
5. Whitfield MG, Soeters HM, Warren RM, York T, Sampson SL, Streicher EM, et al. A global perspective on pyrazinamide resistance: Systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(7).
6. Rahman A, Ferdous SS, Ahmed S, Rahman SMM, Uddin MKM, Pholwat S, et al. Pyrazinamide Susceptibility and pncA Mutation Profiles of Mycobacterium tuberculosis among Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients in Bangladesh. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 22];61(9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28630193>
7. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med*. 1996;2(6).
8. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, et al. Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(3).
9. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, López-Llano J, Fuentes P, Valencia E, et al. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* [Internet]. 2009 Mar [cited 2019 Apr 16];89(2):109–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19249243>
10. Liu J, Shi W, Zhang S, Hao X, Maslov DA, Shur K V, et al. Mutations in Efflux Pump Rv1258c (Tap) Cause Resistance to Pyrazinamide, Isoniazid, and Streptomycin in M. tuberculosis. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jun 11];10:216. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30837962>
11. Zhang S, Chen J, Shi W, Liu W, Zhang W, Zhang Y. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2013 Jun [cited

2019 Jun 11];2(6):e34. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26038471>

12. Dillon NA, Peterson ND, Rosen BC, Baughn AD. Pantothenate and Pantetheine Antagonize the Antitubercular Activity of Pyrazinamide. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2014 Dec [cited 2019 Jun 11];58(12):7258–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25246400>
13. Sheen P, Lozano K, Gilman RH, Valencia HJ, Loli S, Fuentes P, et al. PncA gene expression and prediction factors on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2013 Sep;93(5):515–22.
14. Chang KC, Yew WW, Zhang Y. Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2019 Apr 15];55(10):4499–505. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21768515>
15. Ramirez-Busby SM, Valafar F. Systematic review of mutations in pyrazinamidase associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2015 Sep [cited 2019 Apr 15];59(9):5267–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26077261>
16. Cui Z, Wang J, Lu J, Huang X, Zheng R, Hu Z. Evaluation of methods for testing the susceptibility of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates to pyrazinamide. *J Clin Microbiol*. 2013;51(5).
17. Sharma B, Pal N, Malhotra B, Vyas L, Rishi S. Comparison of MGIT 960 & pyrazinamidase activity assay for pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian Journal of Medical Research*. 2010;132(7).
18. Mong Hong Lee, Hatfull GF. *Mycobacteriophage L5* integrase-mediated site-specific integration in vitro. *J Bacteriol* [Internet]. 1993 [cited 2022 Nov 14];175(21):6836. Available from: [/pmc/articles/PMC206807/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11111111/)
19. Lee Hong M, Pascopella L, Jacobs WR, Hatfull GF. Site-specific integration of *Mycobacteriophage L5*: Integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guérin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(8).
20. Camus JC, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology (N Y)*. 2002 Oct 1;148(10):2967–73.
21. Otum CC, Rivière E, Barnard M, Loubser J, Williams MJ, Streicher EM, et al. Site-directed mutagenesis of *Mycobacterium tuberculosis* and functional validation to investigate potential bedaquiline resistance-causing mutations. *Sci Rep*. 2023;13(1).

22. Advani MJ, Rajagopalan M, Reddy PH. Calmodulin-like protein from *M. tuberculosis* H37Rv is required during infection. *Sci Rep.* 2014;4.
23. Armitige LY, Jagannath C, Wanger AR, Norris SJ. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Effect on growth in culture and in macrophages. *Infect Immun.* 2000;68(2).
24. Cauna Orocollo Y. Estandarización de una técnica de complementación del gen *pncA* en *Mycobacterium tuberculosis pncA*-knockout: herramienta para el estudio de la relación entre mutaciones en *pncA* y parámetros fenotípicos [Internet]. [Lima]: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2019 [cited 2025 Feb 17]. Available from: https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/6972/Estandarizacion_CaunaOrocollo_Yudith.pdf?sequence=1&isAllowed=y
25. Liu B, Su P, Hu P, Yan M, Li W, Yi S, et al. Prevalence, Transmission and Genetic Diversity of Pyrazinamide Resistance Among Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Hunan, China. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2024 [cited 2025 Jul 6];17:403–16. Available from: </doi/pdf/10.2147/IDR.S436161?download=true>
26. Global Tuberculosis Report 2024 [Internet]. [cited 2025 Jul 6]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>
27. Cauna Orocollo Y, Sheen Cortavarría P, Zimic Peralta M. Estandarización de una Técnica de Complementación del Gen *pncA* en *Mycobacterium tuberculosis pncA*-knockout: Herramienta Para el Estudio de la Relación Entre Mutaciones en *pncA* y Parámetros Fenotípicos. 2019 [cited 2025 Jul 6]; Available from: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/12690>
28. Boshoff HIM, Mizrahi V. Expression of *Mycobacterium smegmatis* pyrazinamidase in *mycobacterium tuberculosis* confers hypersensitivity to pyrazinamide and related amides. *J Bacteriol.* 2000;182(19).
29. Goude R, Roberts DM, Parish T. Electroporation of mycobacteria. *Methods in Molecular Biology.* 2015;1285.
30. Van Soolingen D, Hermans PWM, De Haas PEW, Soll DR, Van Embden JDA. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1991 [cited 2025 Jul 6];29(11):2578–86. Available from: </doi/pdf/10.1128/jcm.29.11.2578-2586.1991?download=true>
31. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath.* 2013;3(3).

32. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4).
33. Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *AMERREVRESPDIS*. 1974;109(1).
34. Meinzen C, Proaño A, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Zimic M, et al. A quantitative adaptation of the Wayne test for pyrazinamide resistance. *Tuberculosis*. 2016;99.
35. Siddiqi SH, Rüsç-Gerdes S. For BACTEC™ MGIT 960™ TB System (Also applicable for Manual MGIT) Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) Culture and Drug Susceptibility Demonstration Projects. 2006;
36. Moore DAJ, Mendoza D, Gilman RH, Evans CAW, Delgado MGH, Guerra J, et al. Microscopic observation drug susceptibility assay, a rapid, reliable diagnostic test for multidrug-resistant tuberculosis suitable for use in resource-poor settings. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10).
37. Amilah WN, Lukman M, Suraiya S, Izani N. Direct tetrazolium microplate assay (TEMA) for rapid drug susceptibility test screening of Mycobacterium tuberculosis. *Trop Biomed*. 2016;33(4):814–23.
38. Somerville W, Thibert L, Schwartzman K, Behr MA. Extraction of Mycobacterium tuberculosis DNA: a Question of Containment. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2005 Jun [cited 2022 Nov 15];43(6):2996. Available from: [/pmc/articles/PMC1151963/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/151963/)
39. Jacobs WR, Kalpana G V., Cirillo JD, Pascopella L, Snapper SB, Udani RA, et al. Genetic Systems for Mycobacteria. *Methods Enzymol*. 1991;204(C).
40. Arnold FM, Hohl M, Remm S, Koliwer-Brandl H, Adenau S, Chusri S, et al. A uniform cloning platform for mycobacterial genetics and protein production. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2020 Jul 1];8(1):1–16. Available from: www.nature.com/scientificreports
41. Perrone F, De Siena B, Muscariello L, Kendall SL, Waddell SJ, Sacco M. A Novel TetR-like transcriptional regulator is induced in acid-nitrosative stress and controls expression of an efflux pump in mycobacteria. *Front Microbiol*. 2017;8(OCT).
42. Andreu N, Zelmer A, Fletcher T, Elkington PT, Ward TH, Ripoll J, et al. Optimisation of bioluminescent reporters for use with mycobacteria. *PLoS One* [Internet]. 2010 [cited 2020 Jul 1];5(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20520722/>
43. Zhang S, Chen J, Shi W, Cui P, Zhang J, Cho S, et al. Mutation in *clpC1* encoding an ATP-dependent ATPase involved in protein degradation is associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2017 Jan 15 [cited 2019 Mar 22];6(1):1–2. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2017.1>

44. 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*. 2012;92(1).
45. Yadon AN, Maharaj K, Adamson JH, Lai YP, Sacchetti JC, Ioerger TR, et al. A comprehensive characterization of PncA polymorphisms that confer resistance to pyrazinamide. *Nature Communications* 2017 8:1 [Internet]. 2017 Sep 19 [cited 2025 Aug 20];8(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-017-00721-2>
46. Li K, Yang Z, Gu J, Luo M, Deng J, Chen Y. Characterization of pncA Mutations and Prediction of PZA Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates From Chongqing, China. *Front Microbiol* [Internet]. 2021 Jan 11 [cited 2025 Oct 2];11:594171. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
47. Kim NY, Kim DY, Chu J, Jung SH. pncA Large Deletion is the Characteristic of Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* belonging to the East Asian Lineage. *Infect Chemother* [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2025 Oct 2];55(2):247. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10323538/>
48. Karmakar M, Rodrigues CHM, Horan K, Denholm JT, Ascher DB. Structure guided prediction of Pyrazinamide resistance mutations in pncA. *Scientific Reports* 2020 10:1 [Internet]. 2020 Feb 5 [cited 2025 Aug 20];10(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-58635-x>