



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“ESTUDIO DEL ROL DE LOS GENES
Rv0191 Y *Rv1258c* EN EL EFLUJO DE
ÁCIDO PIRAZINOICO Y LA
RESISTENCIA A PIRAZINAMIDA EN
Mycobacterium tuberculosis”

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

CARLOS ALONSO FLORES BANCAYAN

LIMA – PERÚ

2024

ASESOR

PhD. Patricia Sheen Cortavarría

CO ASESOR

PhD. Mirko Zimíc Peralta

CO ASESOR

MSc. Stefany Quiñones Garcia

JURADO DE TESIS

DR. LUIS JULIO CESAR DE STEFANO BELTRÁN

PRESIDENTE

DR. DANIEL GUERRA GIRALDEZ

VOCAL

DR. HOLGER MAITA MALPARTIDA

SECRETARIO

DEDICATORIA

A mis seres más preciados, queridos y amados quienes han estado desde el inicio de mi vida, a los que perdí en el camino, pero siguen arraigados en mi corazón y a los que fueron incorporándose en el camino, brindándome incansablemente la fortaleza para no desistir del intrincado camino de la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, que ha representado para mí una fuente de fortaleza, resiliencia y quién me ha brindado la sabiduría suficiente para entender los momentos adecuados para aprender, escuchar con humildad y poner en práctica lo asimilado.

Agradezco a mis familiares, quienes han sido testigos del avance de este trabajo de investigación, a mi padre, Carlos Flores, quien siempre me ha enseñado el sentido de responsabilidad y a nunca desistir ante las adversidades. A mi hermana, Carolina Flores, quien me ha apoyado siempre cuando lo he necesitado y es para mí fuente de orgullo. A mi tía Teresa Bancayan, una segunda madre para mí, quien me ha inculcado el sentido académico y de superación en cada etapa de mi vida. A Diana Paniura Marín, quien con su amor y sabiduría me ha mostrado siempre la vía y los modos adecuados de solventar adversidades, además de recordarme que existen muchos aspectos importantes de la vida, que nunca se deben descuidar y representa para mí admiración, y un motivo importante. A Teo, quien, aunque nunca entenderá estas palabras, y probablemente no lo sepa, siempre me ha hecho feliz incondicionalmente luego de un largo día, con sus lamidas, juegos y saltos.

Agradezco a los Dres. Patricia Sheen y Mirko Zimic, quienes con su vasta experiencia me han asesorado, apoyado y guiado en el desarrollo de este proyecto de investigación y por haberme aceptado en el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). A mis profesores del programa de maestría quienes con sus enseñanzas han ido formándome en el sentido académico mostrándome un panorama completo en el

mundo de la ciencia. A la Dra. Maritza Calderón, quien ha sido una mentora para mí, y me ha enseñado el sentido crítico en todo momento. Agradezco al Dr. Robert Gilman y al Dr. Héctor Garcia por apoyarme con el programa de financiamiento *P10089 Training in Parasitic Diseases and Central Nervous System Infections in Peru* y financiar parte de mi formación en el programa de posgrado.

A mis amigos del laboratorio, empezando por la Msc. Stefany Quiñones por guiarme y ampliarme la visión hacia el desarrollo de este estudio. A la Lic. Candy León, por su paciencia al enseñarme, aconsejarme y por su apoyo más allá del entorno del laboratorio. A Fresie Maciel, Mishell Landa, Maria de Grecia Cauti, Kevin Obando, Luis Canales, Briguitte Rivera, Angela Ríos y Andrea Diestra, quienes en diferentes puntos de esta etapa me han apoyado, y han hecho que este camino sea más llevadero, con ellos jamás faltó la compañía, las risas y las enseñanzas. A Kiara Aricoché, por apoyarme incansablemente en los diferentes momentos de este estudio, quien se encuentra aprendiendo y mejorando cada vez más como profesional.

Finalmente agradezco a cada una de las personas que en algún punto del desarrollo de este estudio me han motivado a seguir, brindándome su amistad y apoyo.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB),

Proyecto N°: CRP/PER22-02, SIDISI N° 211034

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	05	AGOSTO	2024
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	FLORES BANCAYAN CARLOS ALONSO		
PROGRAMA DE POSGRADO	MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2021		
TÍTULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	ESTUDIO DEL ROL DE LOS GENES <i>Rv0191</i> Y <i>Rv1258c</i> EN EL EFLUJO DE ÁCIDO PIRAZINOICO Y LA RESISTENCIA A PIRAZINAMIDA EN <i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
MODALIDAD DE TRABAJO DE GRADO	Tesis		
Declaración del Autor			
<p>El presente Trabajo de Grado es original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.</p>			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	991498243		
E-mail	Carlos.flores.b@upch.pe		



Firma del Egresado
DNI 71834177

ESTUDIO DEL ROL DE LOS GENES Rv0191 Y Rv1258c EN EL EFLUJO DE ÁCIDO PIRAZINOICO Y LA RESISTENCIA A PIRAZINAMIDA EN *Mycobacterium tuberculosis*

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

7%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

repositorio.upch.edu.pe

Fuente de Internet

2%

2

Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia

Trabajo del estudiante

1%

3

hdl.handle.net

Fuente de Internet

1%

4

eprints.uanl.mx

Fuente de Internet

1%

5

Gómez Camacho, Andromeda Celeste, Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Genètica i de Microbiologia. "Estudio de la implicación de los genes Rv1686c-Rv1687c y Rv3161c de *Mycobacterium tuberculosis* en la resistencia a fármacos", [Barcelona] : Universitat Autònoma de Barcelona,, 2014

Fuente de Internet

<1%

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del Problema	6
1.3. Justificación.....	9
1.4. Pregunta de Investigación.....	12
II. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo Principal.....	13
2.2. Objetivos Específicos	13
III. HIPOTESIS	14
IV. MARCO TEORICO	15
4.1. Agente etiológico, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTB).....	15
4.2. Mecanismo de acción de la PZA	16
4.3. Resistencia a la PZA.....	21
4.4. Rol de las bombas de eflujo en el mecanismo de resistencia a PZA.....	23
4.5. CRISPR/dCas9 de interferencia (CRISPRi).....	25
4.6. Tecnología de recombinación mediada por oligonucleótido seguida del direccionamiento por una integrasa Bxb1 (ORBIT)	28
V. METODOLOGÍA	30
5.1. Tipo de Estudio.....	30
5.2. Diseño de Estudio.....	30
5.3. Área de Estudio	31
5.4. Material Biológico.....	31
5.5. Procedimiento Experimental	32
VI. RESULTADOS	59
6.1. Identificación y selección de genes que codifican bombas de eflujo	59

6.2. Represión génica de <i>Rv0191</i> y <i>Rv1258c</i> mediante CRISPRi en MTB H37Rv	61
6.3. Delección génica de <i>Rv0191</i> y <i>Rv1258c</i> mediante ORBIT en MTB H37Rv. 75	
6.4. Evaluación del crecimiento bacteriano bajo los sistemas de represión y delección génica	79
6.5. Evaluación de la concentración acumulada y velocidad de eflujo inicial de POA extracelular.	81
6.6. Evaluación de la susceptibilidad a PZA	87
VII. DISCUSIONES.....	90
7.1. Implementación de los sistemas de modificación genética en MTB H37Rv.	91
7.2. Los sistemas de modificación genética en los genes <i>Rv0191</i> y <i>Rv1258c</i> no alteran el crecimiento en MTB H37Rv.	95
7.3. La concentración y velocidad de eflujo de POA disminuye en cepas bajo represión y delección génica	98
7.4. La reducción de la concentración y velocidad de eflujo de POA altera la susceptibilidad a PZA en MTB H37Rv.....	105
VIII. CONCLUSIONES	113
IX. LIMITACIONES.....	114
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
XI. ANEXOS.....	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Material Biológico del estudio	33
Tabla 2. Secuencias sgRNA <i>Rv0191</i> y <i>Rv1258c</i> y valores predichos.....	34
Tabla 3. Cebadores para amplificación de los genes a evaluar.	44
Tabla 4. Genes que codifican para bombas de eflujo en MTB H37Rv asociados a resistencia a antibióticos.	60
Tabla 5. Genes asociados a resistencia a PZA	61
Tabla 6. Concentración de ARN crudo extraído a partir de cepas MTB H37Rv bajo el sistema de represión génica inducido (ATc +).....	67
Tabla 7. Concentración de ARN crudo extraído a partir de cepas MTB H37Rv bajo el sistema de represión génica no inducido (ATc -).....	67
Tabla 8. Porcentajes de eficiencia calculados para los cebadores empleados en el análisis de expresión génica	69
Tabla 9. Valores de ciclo de threshold y análisis de expresión empleando el método de Livak en la réplica biológica 1	71
Tabla 10. Valores de ciclo de threshold y análisis de expresión empleando el método de Livak en la réplica biológica 2.	71
Tabla 11. Valores de ciclo de threshold y análisis de expresión empleando el método de Livak en la réplica biológica 3	72
Tabla 12. Valores de ciclo de threshold y análisis de expresión empleando el método de Livak en la réplica biológica 1 y 2 para el gen blanco <i>groEL</i>	72
Tabla 13. Nivel de ARNm relativo en cepas bajo represión génica.....	73
Tabla 14. Valores de crecimiento máximo y velocidad de crecimiento.	81
Tabla 15. Valores de acumulación extracelular de POA obtenidos en todos los puntos de tiempo evaluados (0 – 140 h).....	86
Tabla 16. Valores de velocidad inicial de eflujo de POA obtenidos en todos los puntos de tiempo evaluados (0 – 140 h).....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistemas relacionados al mecanismo de acción de la pirazinamida	20
Figura 2. Esquema de la represión transcripcional mediada por CRISPRi.....	27
Figura 3. Deleción del gen objetivo y procesos de recombinación en el sistema ORBIT.....	29
Figura 4. Flujograma de trabajo	31
Figura 5. Secuencias de los genes <i>Rv0191</i> y <i>Rv1258c</i> tomando en cuenta 200 pb <i>up-stream</i> y <i>down-stream</i>	46
Figura 6. Esquemas de ensayo de susceptibilidad a PZA	56
Figura 7. Linealización de plásmido pLJR965 digerido con 5U de enzima BsmBI.	62
Figura 8. Clonación del sistema CRISPRi en <i>E. coli</i> NovaBlue.....	62
Figura 9. Alineamiento múltiple del resultado de secuenciación de SANGER....	63
Figura 10. Electroporación de pLJR965:sgRNA <i>Rv0191</i> y <i>Rv1258c</i>	64
Figura 11. Alineación de los resultados de la secuenciación del ADNg en MTB.	65
Figura 12. Electroforesis de agarosa 1.5 % del ARN tratado con ADNasa I y purificado	68
Figura 13. Niveles de ARNm y LOG2FC.....	74
Figura 14. Nivel de represión de cada sgRNA evaluado para los genes de interés.	75
Figura 15. Electroporación en MTB H37Rv:pKM461	76
Figura 16. Electroforesis de productos PCR de MTB H37Rv <i>Rv0191</i> y <i>Rv1258c</i> delecionados.....	77
Figura 17. Alineamiento entre el resultado de secuenciación Oxford Nanopore y el Oligonucleótido guía esperado para los genes <i>Rv0191</i> y <i>Rv1258c</i> delecionados.	78
Figura 18. Curvas de crecimiento de las cepas evaluadas	80
Figura 19. Dinámica de eflujo de POA en cepas bajo represión génica	81
Figura 20. Eflujo de POA en cepas reprimidas y delecionadas frente a la cepa control MTB H37Rv	84
Figura 21. Susceptibilidad a PZA y POA en las cepas control del estudio	88
Figura 22. Ensayo de MIC fenotípico 7H10 en cepas bajo deleción génica	89

LISTA DE ABREVIATURAS

TB: Tuberculosis

MDR: Multidrogo resistente

MDR/RR: Multidrogo resistente/Resistente a Rifampicina

XDR: Extensamente resistente

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

MSMEG: *Mycobacterium smegmatis*

OADC: Suplemento de crecimiento a base de ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa

T80: Tween 80

K: Kanamicina

H: Higromicina

PZAsa: Pirazinamidasas

PZA: Pirazinamida

POA: Ácido pirazinoico

OD₆₀₀: Densidad óptica medida a 600 nanómetros.

OD₄₅₀: Densidad óptica medida a 450 nanómetros.

ATc: Anhidrotetraciclina

CRISPRi: CRISPR de interferencia

sgRNA: ARN guía

KD: *Knockdown*

ORBIT: Oligonucleotide-mediated Recombineering followed by Bxb1 integrase Targeting

KO: *Knockout*

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria

NIC: Concentración No Inhibitoria

RESUMEN

La lucha contra la tuberculosis enfrenta desafíos debido a su extenso régimen de tratamiento y la presencia de resistencia a múltiples antibióticos, incluyendo a la pirazinamida, capaz de reducir el régimen de 12-9 a 6 meses. Develar por completo el mecanismo de acción de este antibiótico permitiría comprender los eventos que conducen a la resistencia; sin embargo, el entendimiento actual en este punto es limitado. Se han propuesto modelos que indican que la conversión de pirazinamida a ácido pirazinoico, el compuesto activo del antibiótico, por acción de la pirazinamidasa (gen *pncA*) es necesaria para su acción bactericida, aunque difieren en el mecanismo de acción posterior a esta conversión. Solo un modelo destaca la importancia del sistema de eflujo del compuesto activo, cuyo reingreso permite una acumulación intracelular que ocasiona la disrupción del potencial de membrana y la muerte bacteriana. Aquí, exploramos el rol de las bombas de eflujo *Rv0191* y *Rv1258c* en el mecanismo de acción de la pirazinamida, y su potencial participación en una vía alternativa de resistencia, en ausencia de mutaciones en el gen *pncA*. Mediante el estado de represión y delección de estos genes en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, evidenciamos una reducción significativa en la concentración acumulada de ácido pirazinoico y la velocidad inicial de eflujo en el medio extracelular. Además de este efecto, se observó un crecimiento en presencia de hasta 1600 µg/ml de pirazinamida en un entorno ácido. El mecanismo de acción de la PZA en relación con el efecto de las bombas de eflujo en el transporte de ácido pirazinoico sugiere que el sistema de eflujo es multifactorial y que su alteración en la expresión génica puede conducir a un fenotipo resistente.

PALABRAS CLAVES: TUBERCULOSIS, RESISTENCIA, PIRAZINAMIDA, ÁCIDO PIRAZINOICO, BOMBAS DE EFLUJO

ABSTRACT

The fight against tuberculosis faces challenges due to its lengthy treatment regimen and the presence of resistance to multiple antibiotics, including pyrazinamide, which can reduce the regimen from 12-9 months to 6 months. Fully elucidating the mechanism of action of this antibiotic would allow us to understand the events leading to resistance; however, our current understanding in this area is limited. Models have been proposed indicating that the conversion of pyrazinamide to pyrazinoic acid, the active compound of the antibiotic, by the action of pyrazinamidase (*pncA* gene) is necessary for its bactericidal action, although they differ in the mechanism of action following this conversion. Only one model highlights the importance of the efflux system of the active compound, whose reentry allows intracellular accumulation, causing disruption of membrane potential and bacterial death. Here, we explore the role of the *Rv0191* and *Rv1258c* efflux pumps in the mechanism of action of pyrazinamide and their potential involvement in an alternative resistance pathway in the absence of mutations in the *pncA* gene. By repressing and deleting these genes in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, we observed a significant reduction in the accumulated concentration of pyrazinoic acid and the initial efflux rate in the extracellular medium. Besides this effect, growth was observed in the presence of up to 1600 µg/ml of pyrazinamide in an acidic environment. The mechanism of action of PZA in relation to the effect of efflux pumps on the transport of pyrazinoic acid suggests that the efflux system is multifactorial and that its alteration in gene expression can lead to a resistant phenotype.

KEYWORDS: TUBERCULOSIS, RESISTANCE, PYRAZINAMIDE, PYRAZINOIC ACID, EFFLUX PUMP

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades con mayor impacto a nivel global, y causa el doble de muertes en comparación al VIH/SIDA. En 2022, se registraron 1.3 millones de muertes de manera global por TB (95 % IC: 1.18 – 1.43 millones) y se estimó que 10.6 millones de personas contrajeron la enfermedad (95 % IC: 9.9 – 11.4 millones) (1). El agente etiológico, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), puede permanecer viable en un estado persistente durante años, esta cualidad establece una infección latente caracterizada por la ausencia de síntomas clínicos. Se estima que el 25% de la población mundial está infectada con MTB persistente, cuyo riesgo de reactivación es del 5 – 10 %, especialmente en pacientes con el sistema inmune comprometido, como los coinfectados con el VIH (2).

La aparición de infecciones por MTB resistente a los antibióticos ha complicado el control de la enfermedad. Esta resistencia ha sido clasificada en varias categorías: TB resistente a isoniazida, TB resistente a rifampicina (TB-RR), TB multidrogo resistente (TB-MDR) caracterizada por resistencia a isoniazida y rifampicina, TB pre-extensamente drogo-resistente (TB-pre-XDR) con resistencia a rifampicina y/o cualquier fluoroquinolona; y TB extensamente drogo-resistente (TB-XDR) con resistencia a rifampicina, cualquier fluoroquinolona y al menos a uno de los siguientes antibióticos: bedaquilina o linezolid (1–5).

Globalmente se estima que 410 mil personas desarrollaron TB-MDR/RR en 2022 (1). En 2020, la cuarta encuesta nacional sobre resistencia a antibióticos

antituberculosos en Perú, reportó que el 29% (638/2180, IC 95%: 27.4 – 31.2) de pacientes mostró resistencia a antibióticos de primera línea. El 8.4 % (IC 95%: 7.3 – 9.6) fue diagnosticado con TB-MDR y el 9.5 % (IC 95%: 8.3 – 10.8) con TB-MDR/RR (6). El número de casos de TB-MDR ha aumentado gradualmente, en 2022, se reportaron tasas de incidencia y morbilidad de 50.1 y 88.9 por 100 mil habitantes, respectivamente y un total de 2066 casos, en comparación a 1753 casos el año anterior (7, 8).

Desde el 2016 el tratamiento para la TB-MDR incluye un antibiótico inyectable y fluoroquinolonas como moxifloxacino, levofloxacino gatifloxacino con una duración de 18 a 20 meses o más (9). Para reducir el régimen de tratamiento de 12 a 9 meses se estableció un perfil nuevo que consiste en bedaquilina, levofloxacino/moxifloxacino, etionamida, etambutol, dosis elevadas de isoniazida, pirazinamida y clofazimina. La disponibilidad de estos antibióticos no es uniforme a nivel mundial debido a barreras económicas, logísticas y de infraestructura sanitaria. En países de ingresos medios y bajos, solo el 57% de los pacientes con TB-MDR tienen acceso al tratamiento adecuado, según el informe de la OMS de 2022 (10).

La pirazinamida (PZA) es un componente crítico en el tratamiento de primera línea debido a que elimina a las micobacterias de crecimiento lento permitiendo reducir el tratamiento de 12-9 meses a 6 meses (11). La PZA es un análogo estructural de la nicotinamida con actividad en medio ácido característico de las zonas de necrosis caseosa en los granulomas (12).

Existen diferentes modelos que buscan explicar cómo la PZA ejerce su efecto bactericida luego que ingresa por difusión pasiva al citoplasma, donde es hidrolizada por la enzima pirazinamidasa (PZAsa) para formar el ácido pirazinoico (POA), el cual es el compuesto activo (13).

Zhang y cols., plantean un modelo que implica la expulsión de POA al medio extracelular en su forma disociada (POA^-) a través de un sistema de eflujo deficiente, el cual no ha sido caracterizado hasta el momento. En un entorno ácido ($\text{pH} < 6.6$), el POA^- adquiere un protón (H^+), transformándose en su forma no disociada (HPOA), la cual puede atravesar fácilmente la membrana debido al diferencial de gradiente y su cualidad lipofílica (12, 14). El reingreso ocasiona una acumulación intracelular de POA^- y reduce el potencial de membrana alterando la captación de uracilo y aminoácidos, lo que disminuye la síntesis de macromoléculas (ARN y proteínas) finalizando en la muerte de MTB (15).

Baughn y cols. proponen un modelo que demuestra el efecto bactericida en condiciones de pH neutro mediante la activación de una respuesta al estrés celular en MTB, inducida experimentalmente por inhibidores de la síntesis de peptidoglicano. Este proceso es mediado por la señalización de PknB, que conduce a la degradación del factor anti-sigma RseA y libera el factor sigma extracitoplasmático E (sigE) (16). SigE regula la respuesta al estrés de la envoltura celular, activando la transcripción de genes que ayudan a la célula a reparar el daño,

resultando en una remodelación metabólica que establece un estado susceptible a PZA (16).

Finalmente, un modelo que abarca las contribuciones de diferentes autores incluye el rol del POA al unirse a blancos intracelulares, como la aspartato descarboxilasa (PanD), inhibiendo procesos metabólicos clave como la biosíntesis de coenzima A (CoA) crucial para la síntesis de ácidos grasos y la generación de energía celular (17-19). El POA también afecta la integridad de la membrana celular y la homeostasis de la energía mediante la interacción con el complejo proteico ClpC1-ClpP, promoviendo la degradación de *PanD* y aumentando la susceptibilidad a la PZA (19).

El mecanismo principal de adquisición de resistencia a PZA está asociado con mutaciones en el gen *pncA*, que codifica la metaloenzima PZAsa e impiden la hidrólisis de PZA a POA (20-24). También se han identificado inserciones y deleciones que provocan un cambio en el marco de lectura, dando lugar a una estructura no funcional o truncada (21, 22). Al menos el 70% de muestras clínicas resistentes a PZA presentan mutaciones en el sitio catalítico y el sitio de unión al metal en este gen, asociado con la pérdida de función de la PZAsa (25).

La resistencia a la PZA en casos TB-MDR se estima en un 57% a nivel global. Las tasas más altas de resistencia se observan en las regiones del Pacífico Occidental (32%), Sudeste Asiático (37%) y Mediterráneo Oriental (78%) (26). En Perú, Velásquez y cols. han reportado casos de resistencia a PZA en 121 pacientes con

MDR-TB bajo tres métodos, empleando el método estándar de oro, BACTEC MGIT 960, se identificó un 58.7%; mediante el método de Wayne, un 49,6%; y mediante secuenciación del gen *pncA*, un 56,2% (27). En otro estudio, Calderón y cols. revelaron una prevalencia de 6.6% en 3277 pacientes evaluados, y 47.7% en 405 pacientes con TB-MDR (28). En el estudio de Calderón y cols., el método de Wayne mostró una concordancia del 83.9% con BACTEC MGIT 960 (Kappa: 0.66), demostrando ser eficaz para identificar resistencia a PZA.

En el Laboratorio de Bioinformática, Biología Molecular y Desarrollos Tecnológicos, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), se han desarrollado investigaciones con el objetivo de elucidar el mecanismo de acción y vías alternativas de resistencia a la PZA, que involucran bombas de eflujo y metalochaperonas de PZAsa. Estas investigaciones emplean técnicas genéticas como CRISPR de interferencia (CRISPRi) para reprimir la expresión génica y la recombinación mediada por oligonucleótidos seguida por la integrasa BxB1 (ORBIT, por sus siglas en inglés) para delecionar genes.

Empleando CRISPRi en *Mycobacterium smegmatis* (MSMEG) se estableció un modelo de estudio comparable a MTB, demostrando la relación de genes que codifican bombas de eflujo (*MSMEG_0250*, *MSMEG_0241*, *MSMEG_0410*, *MSMEG_3815* y *MSMEG_5046*) con su capacidad para transportar POA al medio extracelular. Se observó una disminución significativa del 70% de la velocidad inicial de eflujo de POA cuando el gen *MSMEG_0250* se encuentra reprimido (29).

Por otro lado, usando ORBIT se han delecionado genes que codifican a metalochaperonas putativas de la enzima PZAsa (*Rv2059*, *Rv2102* y *Rv0944*). Se ha demostrado que la delección de los genes *Rv2102* y *Rv0944* no afecta el crecimiento del micobacteria, pero está asociada con una disminución de la velocidad inicial de eflujo de POA y resistencia a PZA, aunque no a POA. Además, se ha identificado que la metalochaperona *Rv2059* actúa como un factor activador de la PZAsa y su delección afecta el eflujo de POA, disminuyendo de manera parcial su expulsión al medio extracelular (información no publicada).

1.2. Planteamiento del Problema

Aunque los modelos propuestos para explicar el mecanismo de acción de la PZA presentan evidencia científica sólida, aún no se han caracterizado completamente. El modelo propuesto por Zhang se basa principalmente en la expulsión de POA⁻ a través de un sistema de eflujo deficiente y resalta la necesidad de un entorno extracelular ácido para generar una acumulación intracelular de POA y la reducción del potencial de membrana lo que conduce a la muerte celular (12-15, 30).

El entorno extracelular ácido, donde la PZA ejerce su acción según Zhang, se relaciona con la zona de necrosis caseosa del granuloma. Los estudios sobre los niveles de pH de esta zona no son homogéneos, demostrando un rango amplio entre 6.1 – 7.5 (31). Se ha reportado que el pH de las lesiones caseosas grandes, en modelo murino C3HeB/FeJ infectado con MTB H37Rv, se encuentra entre 7.19 y 7.54. En estos animales la acción de la PZA fue incapaz de eliminar a las micobacterias, reforzando la necesidad de un entorno ácido para ejercer su función

y resalta una controversia sobre el momento de acción del antibiótico. Es probable que el efecto bactericida durante la estadía de MTB en el fagolisosoma macroalveolar, sin embargo, es necesario profundizar en esta posibilidad.

Por otro lado, se ha demostrado que POA, a diferencia de otros antibióticos, es capaz de trasladar protones desde el espacio extracelular al intracelular, lo que disminuye el pH intracelular de MTB a niveles por debajo de 6.5 dentro de 48 horas y está asociado con una reducción significativa en la viabilidad bacteriana (32, 33). Sin embargo, no se ha elucidado por completo cómo este proceso se integra con otros aspectos del metabolismo, por ejemplo, la respuesta al estrés celular debido a condiciones diferentes a la acidez del entorno extracelular o la unión del POA a blancos intracelulares (14, 15).

Por otro lado, el modelo de Baughn minimiza el rol del sistema de eflujo, centrándose en la activación de una respuesta de estrés celular mediada por el factor SigE. El estrés celular puede ser inducido por la inhibición de la síntesis del peptidoglicano o la presencia de un entorno ácido, que altera la homeostasis celular y aumenta la susceptibilidad a la PZA (16). Sin embargo, este proceso aún no se explica por completo. Se desconocen los eventos bioquímicos que vinculan la activación de los genes regulados por SigE y cómo esta activación remodela el metabolismo para conferir susceptibilidad al antibiótico.

El modelo de Baughn no contempla la evidencia sobre la acidificación intracelular de MTB en presencia de la PZA, que puede ser explicada por el rol del sistema de

eflujo en la expulsión de POA^- , el reingreso de HPOA y su disociación intracelular a POA^- e H^+ (31). El POA^- acumulado intracelularmente puede interactuar con posibles blancos celulares, como *panD* y el complejo ClpC1-ClpP, alterando el metabolismo de MTB (17).

Se ha destacado que el CoA es crucial en el mecanismo de acción de la PZA, ya que la decarboxilasa de aspartato (PanD), es esencial en la biosíntesis de CoA. El POA al inhibir la actividad enzimática de PanD, reduce la biosíntesis de CoA, lo que interfiere con la síntesis de ácidos grasos y la generación de energía celular (18, 19). Sin embargo, a pesar de la evidencia, el modelo de Baughn no explica la relación entre la activación de SigE y la regulación de los niveles de CoA.

Es de notar que el 30 % de los casos clínicos con resistencia a la PZA no se explican por la presencia de mutaciones en el gen *pncA* (26, 34), lo que sugiere la existencia de vías alternativas involucradas en la adquisición de resistencia. Es posible inferir que la alteración del sistema de eflujo en MTB, puede contribuir a una mayor o menor eficiencia para expulsar POA^- , inhibiendo alguno de los procesos relacionados con la actividad bactericida de la PZA (35-38).

Sin embargo, la falta de identificación de los genes que codifican bombas de eflujo involucrados en este sistema dificulta la comprensión completa de este proceso. Esto representa una desventaja para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y limita el avance en la comprensión de nuevas vías de resistencia, especialmente en ausencia de mutaciones del gen *pncA*.

1.3. Justificación

Comprender el mecanismo de acción de la PZA, haciendo énfasis en el sistema de eflujo de POA en MTB, es crucial debido a la evidencia que sugiere que este sistema está involucrado en la susceptibilidad a la PZA (12-15, 31-34). Aunque los modelos actuales, como los de Zhang y Baughn, ofrecen aproximaciones valiosas, no abordan completamente la complejidad de estos procesos. Específicamente, el estudio de Zhang y cols. no ha logrado caracterizar completamente el sistema de eflujo. Existe una necesidad urgente de identificar los genes de las bombas de eflujo que participan en este proceso para desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas y comprender mejor las vías de resistencia a la PZA.

Las bombas de eflujo son mecanismos críticos en la resistencia a los antibióticos en MTB, ya que facilitan la expulsión activa de compuestos antibióticos fuera de las células bacterianas, reduciendo así su concentración intracelular y efectividad. Se han identificado más de 30 bombas de eflujo implicadas en la resistencia a una variedad de antibióticos en MTB, principalmente pertenecientes a las superfamilias: mayor de facilitadores (MFS), de unión a ATP (ABC) y de resistencia-nodulación-celular (RND) (40 - 44).

Investigaciones recientes en cepas de MTB susceptibles y resistentes a la PZA han demostrado que la sobreexpresión de ciertos genes de bombas de eflujo con afinidad de unión a POA, como *Rv0191*, *Rv1667c*, *Rv3008* y *Rv3756c*, puede contribuir significativamente a la resistencia a la PZA, con una concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) superior a 200 µg/ml (36).

Además, se ha observado que mutaciones específicas en la bomba de eflujo *Rv1258c*, particularmente las variantes V219A y S292L, confieren una resistencia marcada no solo a la PZA, sino también a la isoniazida (INH) y a la estreptomicina (SM). Los autores infieren que las mutaciones en *Rv1258c* incrementan la capacidad de eflujo del POA, evidenciado por una baja acumulación intracelular de POA marcado con C₁₄ en comparación a la cepa MTB H37Ra silvestre (37).

Se ha reportado previamente que la acumulación de POA extracelular es un potencial predictor de resistencia a PZA con una sensibilidad del 92.8% y especificidad del 100% (44 - 46). En un estudio de 24 cepas resistentes a la PZA, 10 tenían el gen *pncA* de tipo silvestre y la mayoría de las cepas tenían una tasa de eflujo baja (2.48 (SD=1.89) nmol POA/(mg de proteína)/min) en comparación con cepas susceptibles (8.83 (SD = 4.14) nmol POA/(mg de proteína)/min, p valor < 0.0001) (44). Además, se reportó que una cepa resistente de MTB con la mutación V139A tenía una tasa de eflujo tres veces superior a la media de las cepas susceptibles (26.49 nmol POA/(mg de proteína)/min). El 60% de las cepas resistentes estudiadas mostraron una asociación significativa con la disminución de la velocidad de eflujo de POA (42).

Los hallazgos previos destacan la participación del sistema de eflujo de MTB en el mecanismo de acción y resistencia a la PZA. La evaluación del impacto en la concentración acumulada y la velocidad inicial de eflujo de POA en el medio extracelular en genes que codifican bombas de eflujo bajo represión transcripcional por CRISPRi o delección génica por ORBIT se presenta en este estudio como una

estrategia innovadora para comprender el rol de estos genes en el mecanismo de acción y resistencia a la PZA.

La tecnología de CRISPRi, empleando el sistema dCas9 de *Streptococcus thermophilus* (dCas9_{StH1}), ha demostrado ser una plataforma robusta y versátil para la represión génica dirigida en micobacterias (47 - 50). Este avance permite una manipulación genética eficaz y específica, esencial para investigar la función y la regulación de genes involucrados en la resistencia a antibióticos. La técnica es escalable genómicamente siendo capaz de generar bibliotecas de diversos genes a reprimir, lo que posibilita una evaluación sistemática en diversos contextos experimentales, desde cultivos axénicos *in vitro* hasta modelos de infección en animales (48).

Por otro lado, ORBIT combina dos sistemas eficientes de recombinación, el sistema RecT de recombinación homóloga del fago Che9c y la integrasa Bxb1, permitiendo la integración específica de secuencias de ADN sin necesidad de preparar sustratos de recombinación de ADN de doble hebra, es decir, evita el uso de procesos de clonación difíciles de estandarizar. ORBIT utiliza un oligonucleótido guía diseñado de manera específica de acuerdo al gen de interés a eliminar, además emplea un par de plásmidos (pKM461 y pKM464) que permiten la integración del oligonucleótido guía al genoma de MTB en reemplazo del gen silvestre (51, 52).

1.4. Pregunta de Investigación

Se plantea la siguiente pregunta:

¿La represión y delección de los genes Rv0191 y Rv1258c, que codifican bombas de eflujo en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, impactan la concentración acumulada y la velocidad inicial de eflujo del ácido pirazinoico (POA) en el medio extracelular, y esta alteración afecta la susceptibilidad a la pirazinamida bajo condiciones de crecimiento in vitro en un entorno ácido?

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Principal

Evaluar el efecto de la represión y deleción de los genes *Rv0191* y *Rv1258c* que codifican las bombas de eflujo sobre la concentración acumulada y velocidad inicial de eflujo de ácido pirazinoico en MTB H37Rv y su potencial rol en el mecanismo de acción y resistencia a pirazinamida.

2.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar genes que codifiquen para bombas de eflujo en MTB H37Rv involucrados en la resistencia a pirazinamida.
- Reprimir la transcripción de los genes *Rv0191* y *Rv1258c* que codifican para bombas de eflujo en MTB H37Rv mediante la técnica de CRISPR de interferencia (CRISPRi).
- Delecionar los genes *Rv0191* y *Rv1258c* que codifican para bombas de eflujo en MTB H37Rv mediante la técnica de ORBIT.
- Cuantificar la concentración y velocidad inicial de eflujo del ácido pirazinoico en el medio extracelular en MTB H37Rv bajo los sistemas de represión y deleción genética.
- Evaluar la susceptibilidad a PZA en MTB H37Rv en cepas modificadas genéticamente que demuestren una alteración en la concentración y velocidad inicial de eflujo de ácido pirazinoico.

III. HIPOTESIS

El presente estudio busca resolver dos hipótesis. En primer lugar, planteamos que, si se establecen modificaciones genéticas para la represión y delección de los genes *Rv0191* y *Rv1258c* que codifican para bombas de eflujo en MTB H37Rv, entonces se demostrará que al menos uno de estos genes se encuentra involucrado en el eflujo de POA, medido por la concentración acumulada de POA en el medio extracelular y la velocidad inicial a la que este compuesto es expulsado en un intervalo de tiempo definido (0-140 horas).

En segundo lugar, planteamos que si la reducción de la acumulación extracelular y velocidad inicial de eflujo alteran la susceptibilidad a PZA en un entorno ácido (pH 6.2), entonces las cepas crecerán por encima de los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de PZA conocidos para MTB H37Rv (50-250 µg/ml). La supervivencia de estas cepas modificadas a concentraciones elevadas implicará que el sistema de eflujo de POA, mediado por *Rv0191* y *Rv1258c*, tiene un rol importante en el mecanismo de acción de la PZA, donde la expulsión del POA, es necesaria para ejercer un efecto bactericida.

Además, la presencia de crecimiento por encima del MIC de la cepa silvestre implicará que alteraciones en la expresión de estos genes pueden conducir a un estado de adquisición de resistencia, reduciendo la expulsión del POA al medio extracelular.

IV. MARCO TEORICO

4.1. Agente etiológico, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)

MTB, el agente etiológico de la tuberculosis (TB), es un patógeno que ha coexistido con la humanidad durante milenios, adaptándose continuamente a los desafíos impuestos por las intervenciones terapéuticas (53, 54). A lo largo de la historia, la evolución de MTB ha sido marcada por su capacidad para desarrollar resistencia a cada régimen antibiótico introducido. Esto complica significativamente su tratamiento, reduce las tasas de recuperación y amenaza el control global de la TB (55).

La biología de MTB presenta características únicas que contribuyen tanto a su virulencia como a su capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos. Por ejemplo, su pared celular es una estructura compleja y única caracterizada por su contenido rico en lípidos, incluidos los ácidos micólicos de cadena larga, que le confieren propiedades hidrofóbicas y contribuyen a su resistencia natural a muchos agentes antibacterianos (56, 57). Además, la presencia de complejos de lipoarabinomano y peptidoglicano en la pared celular no solo facilita la evasión de la detección inmune por parte del huésped, sino que también dificulta la penetración de compuestos antimicrobianos (58 – 61).

MTB tiene la capacidad de entrar en un estado de latencia, caracterizado por una reducción significativa de su metabolismo. Durante la latencia, MTB puede adaptarse a condiciones hostiles como la hipoxia, el estrés oxidativo, entornos ácidos y la limitación de nutrientes, permitiendo su persistencia a largo plazo en el

huésped (61). El 90% de los casos de infección a individuos inmunocompetentes desarrolla un estado de latencia y menos del 10% de estos individuos puede experimentar una falla inmunitaria, reactivando la TB (62).

MTB en estado latente entra en un estado no replicativo, lo que genera la disminución de algunos procesos biológicos que son blancos de antibióticos como isoniazida y rifampicina. La isoniazida inhibe la síntesis de ácidos micólicos en la pared celular de MTB. y la rifampicina bloquea la transcripción del ARN. Ambos procesos requieren una replicación activa; por esta razón, en este estado se reduce significativamente la eficacia de ambos antibióticos (61, 62).

4.2. Mecanismo de acción de la PZA

La PZA es un antibiótico cuya fórmula molecular es $C_5H_5N_3O$, un análogo de la nicotinamida descubierto en la década de 1940 por la farmacéutica Lederle. Su estructura consiste en un anillo de pirazina, donde un grupo carboxamida ($-CONH_2$) está unido al anillo pirazínico (12). Es conocida por su singularidad al requerir un pH ácido para ejercer su efecto bactericida contra MTB, a diferencia de la mayoría de los agentes antibacterianos. Su rol esencial en el acortamiento de la terapia se debe a su capacidad para eliminar a MTB en estado de latencia bajo un entorno ácido, los cuales no son afectados por otros antibióticos (14).

Konno y cols., en 1966, demostraron que la PZA requiere de la enzima PZAse para ser hidrolizada a POA a un pH óptimo entre 6.8 – 7.0. La adición de 10 μ moles de sustrato PZA produce alrededor de 1.9 μ moles de amonio (NH_3) en cepas

susceptibles. Sin embargo, las cepas resistentes a PZA, bajo la misma cantidad de sustrato, producen solo 0.10 μ moles de NH_3 . Demostraron que existe una correlación entre la actividad de la PZAsa y la susceptibilidad o resistencia a la PZA debido a una actividad disminuida de la enzima en cepas resistentes (13). Estos hallazgos resaltaron a la PZAsa como factor clave en el mecanismo de acción de la PZA.

Ying Zhang y cols. en la Universidad Johns Hopkins, emplearon $[^{14}\text{C}]$ PZA y $[^{14}\text{C}]$ POA para demostrar que a pH ácido (5.5), el POA se acumula dentro de las células de MTB H37Ra, alcanzando concentraciones mayores que a pH neutro o alcalino, donde el POA se encuentra principalmente fuera de las células (31). Esta acumulación fue observada utilizando técnicas de cromatografía en capa fina y contadores de centelleo líquido, con valores de centelleo que indicaban una acumulación intracelular significativa bajo condiciones de pH ácido. Por ejemplo, a 320 minutos, la radioactividad medida en las células fue de aproximadamente 2500 cpm/mg en pH 5.5, mientras que a pH 6.6, fue significativamente menor (31).

El sistema de eflujo es crucial en este modelo porque explica la susceptibilidad única de MTB a la PZA a través de la expulsión de POA^- . En un entorno extracelular ácido, el POA^- se protona a su forma no disociada (HPOA), que puede difundir pasivamente a través de la membrana celular por su carácter lipofílico. Una vez dentro de la célula, donde el pH es más neutro, el HPOA se desprotona y vuelve a su forma disociada (POA^-), que no puede salir fácilmente de la célula debido a su carga negativa (15, 31).

Este proceso es facilitado por la fuerza motriz de protones, un gradiente electroquímico creado por la diferencia en la concentración de protones (H⁺) a ambos lados de la membrana celular. La deficiencia del sistema de eflujo en MTB impide la expulsión eficiente de POA⁻, resultando en su acumulación intracelular (15, 31).

La adición de inhibidores de la reserpina y la valinomicina aumentaba significativamente la acumulación de POA. Por ejemplo, la reserpina a una concentración subletal de 20 mM permitió una acumulación notable de POA en MTB, sugiriendo un mecanismo de eflujo activo en esta bacteria (31). Además, encontraron que la tasa de expulsión de POA en MTB (aproximadamente 0.3 pmol/mg/min) era más de dos órdenes de magnitud menor que en MSMEG (aproximadamente 70 pmol/mg/min), que tiene un sistema de eflujo altamente activo (15).

Bajo las mismas condiciones de pH midió el potencial de membrana utilizando [3H]tetrafenilfosfonio bromuro (TPP⁺) observando que POA disminuía significativamente el potencial, con valores de -62.26 ± 6.44 mV para las células semidormantes y -121.1 ± 3.85 mV para células en fase logarítmica. Además, evaluó la captación de nutrientes, utilizando L-[14C]serina, [35S]metionina y [3H]uracilo como precursores radiactivos demostrando que el POA inhibía significativamente la captación de estos a pH ácido (5.0), pero no a pH neutro (7.0). (15, 31, 61). Estos hallazgos demuestran que el POA intracelular causa el colapso

de la fuerza motriz de protones y bloquea la captación de nutrientes esenciales, llevando a la muerte celular.

Por otro lado, Baughn y cols. han identificado a SigE, una proteína reguladora de respuesta al estrés del sobre celular, como esencial en la susceptibilidad a la PZA y POA. SigE es un factor sigma que regula la expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés y en la homeostasis del sobre celular en MTB (16). Observaron que la delección de SigE resultó en un incremento significativo en la resistencia a PZA, con valores de MIC incrementados comparados con la cepa *silvestre* aumentando de 50 µg/ml a 400 µg/ml (pH:5.8), y la MIC de POA incrementó de 200 µg/ml a más de 800 µg/ml (pH: 6.6) (16).

Se demostró que la activación constitutiva de la respuesta de estrés del sobre celular, mediante la delección del gen anti-sigma *rseA*, también potenció la susceptibilidad a PZA, lo que sugiere que la activación de esta vía es crucial para su acción, independiente del pH ambiental dado que este efecto fue evidenciado en un entorno neutro a través de la exposición a inhibidores de la síntesis de peptidoglicano, como meropenem, que desencadenaron una respuesta de estrés en el membrana celular, destacando que la regulación por SigE puede potenciar la acción de PZA sin necesidad de acidificación del medio (16).

Adicionalmente, se plantea un modelo de blancos intracelulares de POA. Shi et al. estudiaron la proteína PanD, una decarboxilasa de aspartato esencial en la biosíntesis de coenzima A (CoA). La adición de β-alanina o pantotenato

antagonizaba la actividad de POA, sugiriendo que POA inhibe la actividad enzimática de PanD y reduce la biosíntesis de CoA, interfiriendo con la síntesis de ácidos grasos, un proceso crucial para la supervivencia de MTB en estados de latencia (19, 64).

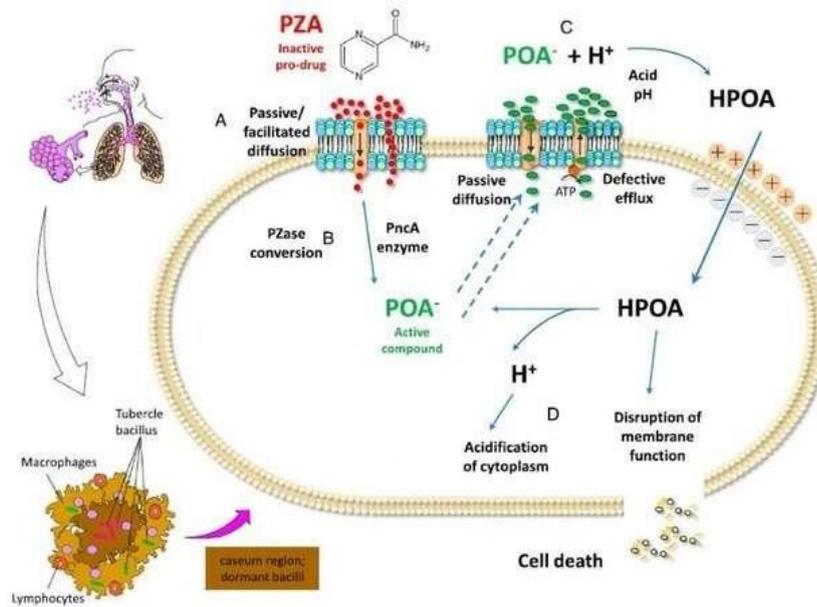


Figura 1. Sistemas relacionados al mecanismo de acción de la pirazinamida. A. Sistema de transporte de membrana de la PZA por difusión pasiva; **B.** Hidrólisis de la PZA a POA^- mediante la enzima PZAsa (*pncA*); **C.** Expulsión de POA^- a través de un sistema de eflujo no conocido **D.** Ingreso de HPOA y disociación a $POA^- + H^+$ causando acidificación y acumulación intracelular debido a un eflujo deficiente. Este efecto causa reducción del potencial de membrana afectando el transporte de uracilo y aminoácidos (serina y metionina) llevando a la muerte de MTB. **PZA** = pirazinamida. **HPOA** = ácido pirazinoico protonado; **POA^-** = ácido pirazinoico disociado (Modificado, Fuente (65)).

4.3. Resistencia a la PZA

La principal vía de adquisición de resistencia a la PZA se da a través de una pérdida o disminución de la actividad PZAsa, lo que impide la hidrólisis de PZA a POA. La falta de actividad enzimática se asocia a mutaciones en el gen *pncA*, que codifica para la enzima PZAsa. La frecuencia de estas mutaciones en aislados resistentes oscila entre el 72% y el 98% (22-26, 66)

Las mutaciones que afectan al gen *pncA* son principalmente de tipo sin sentido y cambios de un solo nucleótido que causan sustituciones de aminoácidos. También se producen algunas sustituciones en la región promotora del gen. La diversidad de las mutaciones está demostrada por más de 400 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) descritos en 78 estudios publicados (26, 67).

Aunque estas mutaciones están dispersas por todo el gen, que codifica una proteína de 187 aminoácidos, la pérdida de actividad PZAsa está asociada con mutaciones que afectan al sitio activo (por ejemplo, D8, W68), que alteran el núcleo de la proteína (por ejemplo, Q10, I6, V44, V139, M175, F94, H137) y que interfieren directa o indirectamente con la coordinación del ion hierro (II) (por ejemplo, D49, H51, H57, H71) (68).

En ausencia de mutaciones en el gen *pncA* se han identificado vías alternativas que incluyen mutaciones en otros genes que codifican proteínas involucradas en los modelos que tratan de explicar el mecanismo de acción de la PZA. De esta manera, en experimentos con cepas de MTB H37Ra en cultivo *in vitro*, se observó que

mutaciones en el dominio carboxilo-terminal de PanD están asociadas con resistencia a PZA. Las cepas mutantes presentaban una MIC de 200-800 µg/ml de POA a pH 6.8, significativamente mayor a la cepa silvestre (17). Mediante la secuenciación del genoma completo de MTB y el análisis de mutaciones específicas, se identificó que la mutación M117I, es la más frecuente en el gen *panD*, presente en el 80% de los mutantes (17).

Estudios recientes han señalado que mutaciones en *clpC1*, una ATPasa asociada con la degradación de proteínas mal plegadas y la regulación de la respuesta al estrés, conducen a la selectividad de sustrato del complejo ClpC1-ClpP, provocando resistencia a POA, de manera similar a las mutaciones en *panD*. Los estudios de sobreexpresión y unión demostraron que PanD es el objetivo directo de POA, mientras que las mutaciones en *clpC1* indirectamente causaban resistencia. Esto sugiere que el POA estimula la degradación de PanD a través de ClpC1-ClpP, y no simplemente inhibe su función enzimática (18, 19).

Por otro lado, el gen *rpsA* fue considerado un factor importante en la resistencia a la PZA en MTB como un potencial objetivo del POA. Sin embargo, estudios recientes sugieren que las mutaciones en este gen no están necesariamente vinculadas con la resistencia. Análisis de *rpsA* y su promotor en aislamientos clínicos de MTB han revelado mutaciones tanto en PZA-resistentes como en PZA-susceptibles, con una frecuencia estadística no significativa, lo que sugiere que *rpsA* no es parte del mecanismo de resistencia a la PZA en MTB (64, 69).

4.4. Rol de las bombas de eflujo en el mecanismo de resistencia a PZA.

Las bombas de eflujo son mecanismos de defensa cruciales en las bacterias, que permiten expulsar una amplia gama de compuestos antibacterianos y otros agentes tóxicos, contribuyendo así a la resistencia antimicrobiana y a la supervivencia bacteriana en entornos hostiles (36, 37, 70, 71). Las superfamilias de bombas de eflujo como *ATP-binding cassette* (ABC), *Resistance-Nodulation-Division* (RND), *Major Facilitator Superfamily* (MFS), *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE), *Small Multidrug Resistance* (SMR) y *Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux* (PACE) son fundamentales en la resistencia a antibióticos en una amplia variedad de bacterias (43).

Estos sistemas expulsan diversos antibióticos y compuestos tóxicos, contribuyendo a la supervivencia bacteriana en condiciones adversas. Las bombas ABC, por ejemplo, utilizan ATP para expulsar antibióticos y se han observado en patógenos como *Streptococcus pneumoniae*. Las RND son esenciales en bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, relacionados con antibióticos como tetraciclina y rifampicina (72). MFS, es crucial contra fluoroquinolonas y macrólidos en organismos como *Streptococcus pneumoniae* (73 – 75). Por otro lado, MATE ha mostrado un papel en la resistencia a antibióticos en *Escherichia coli* y *Trueperella pyogenes* (76 – 79).

Los estudios recientes detallan la relevancia de las bombas de eflujo en la resistencia de MTB a la PZA, a través de las mutaciones en el gen *Rv1258c*. Específicamente, las mutaciones puntuales V219A y S292L en este gen confieren

resistencia no solo a PZA sino también a isoniazida (INH) y estreptomina (SM), siendo la mutación S292L responsable de una resistencia elevada a INH (32 µg/ml) y a PZA (800 µg/ml), una característica no observada con la mutación V219A, la cual muestra un nivel de resistencia más bajo (100-200 µg/ml para PZA (36). Este patrón de resistencia a múltiples antibióticos, en particular a PZA, es notable porque en este reporte el gen *Rv1258c* es asociado con una disminución intracelular de POA, lo que sugiere un mecanismo adicional de resistencia a la PZA (36).

Por otro lado, se han identificado otros genes de bombas de eflujo como *Rv0191*, *Rv1667c*, *Rv3008* y *Rv3756c*, cuya sobreexpresión en la cepa H37Ra de MTB indujo una resistencia de nivel bajo a PZA y POA, pero no a otros antibióticos. La resistencia observada a PZA en estas cepas sobreexpresadas alcanzó una concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) de aproximadamente 200 µg/ml, en contraste con el control vectorial pOLYG que mostró un MIC de alrededor de 100 µg/ml (37).

Adicionalmente, la inhibición de las bombas de eflujo con compuestos como la piperina reveló un aumento en la susceptibilidad a PZA, lo que refuerza el rol de estas proteínas en el mecanismo de resistencia. Las mutaciones clínicas encontradas en los genes de estas bombas de eflujo, en particular *Rv0191* donde se identificaron mutaciones puntuales en el codón 213 (no sinónima, GCT a ACT) y en el codón 66 (sinónima, GCC a GCT). La mutación no sinónima en el codón 213 fue la más común entre 299 de las 406 cepas estudiadas y sugiere una posible relación con la resistencia clínica a la PZA (37).

4.5. CRISPR/dCas9 de interferencia (CRISPRi)

La tecnología CRISPR-Cas9, derivada del estudio de mecanismos de defensa en bacterias y arqueas, ha innovado el campo de la biotecnología y la ingeniería genética. Este sistema se basa en secuencias CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) y en la enzima Cas9, que juntas facilitan cortes específicos y precisos en el ADN (80).

El sistema emplea secuencias de ARN, que dirigen la proteína Cas9 al sitio blanco para ejercer su acción endonucleasa, lo que permite la edición del genoma. CRISPR-Cas9 edita el genoma con mayor eficiencia en comparación con tecnologías previas como las nucleasas dedo de zinc (ZFNs) y las nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (TALENs) (81, 82). El sistema emplea los mecanismos naturales de reparación del ADN para realizar inserciones, deleciones o modificaciones específicas en las secuencias genéticas, lo que permite explorar funciones génicas de manera específica (81).

La aplicación de CRISPR-Cas9 trasciende la edición genética. La variante dCas9, una forma inactiva de la enzima Cas9, permite realizar modular la expresión genética sin alterar la secuencia del ADN, facilitando estudios detallados sobre la regulación genética y la interacción entre genes y enfermedades. Esta tecnología, denominada CRISPR-dCas9 de interferencia (CRISPRi), utiliza la enzima inactiva junto a un ARN guía (sgRNA) para modular específicamente la expresión génica sin alterar la secuencia del ADN (83).

Los plásmidos pLJR965 y pLJR962 son vectores diseñados para la implementación de la tecnología CRISPRi en MTB y MSMEG, respectivamente. Ambos expresan la proteína dCas9, el sgRNA específico y un marcador de resistencia a kanamicina. Bajo el control de un promotor regulador por el represor de tetraciclina (TetR). La expresión de estos componentes se induce en presencia de anhidrotetraciclina (ATc) o doxiciclina, permitiendo la represión génica transcripcional dirigida (83).

Este sistema se basa en el bloqueo físico que realiza el complejo dCas9/sgRNA en el ADN, impidiendo así la iniciación o elongación de la transcripción por parte de la RNA polimerasa (84). La especificidad de CRISPRi proviene de la necesidad de una secuencia corta adyacente al objetivo denominada motivo adyacente a protospaciador (PAM) que es esencial para el reconocimiento y la unión del complejo dCas9 (Figura 2). Este método tiene aplicaciones en la regulación de la expresión de múltiples genes de manera simultánea con alta especificidad, lo que representa una herramienta valiosa en campos como la biología sintética y la reingeniería metabólica.

CRISPRi ha mostrado un potencial importante en la investigación de TB, especialmente en la comprensión y combate de la resistencia a los medicamentos. Utilizando dCas9 en combinación con sgRNAs específicos, ha permitido la regulación fina de la expresión genética en MTB, el patógeno causante de la TB, sin alterar la secuencia de ADN subyacente (47, 48). Esta capacidad para modular la expresión de genes específicos ha facilitado el análisis detallado de genes involucrados en la resistencia a múltiples antibióticos, ofreciendo una plataforma

para explorar nuevos blancos terapéuticos y entender los mecanismos subyacentes de la resistencia.

Esta herramienta también ha sido fundamental para definir la vulnerabilidad de genes específicos en MTB, proporcionando una plataforma para la detección de nuevos blancos farmacológicos y optimizando el uso de los medicamentos existentes (48). La aplicación de CRISPRi ha permitido la generación de bibliotecas de alta diversidad de sgRNAs que apuntan a prácticamente todos los genes de MTB, facilitando una exploración exhaustiva de las vulnerabilidades genéticas del patógeno. La capacidad de sintonizar la expresión genética y cuantificar la vulnerabilidad de genes esenciales abre nuevas avenidas para la investigación y el desarrollo de terapias dirigidas que podrían revolucionar el tratamiento de la TB en el futuro.

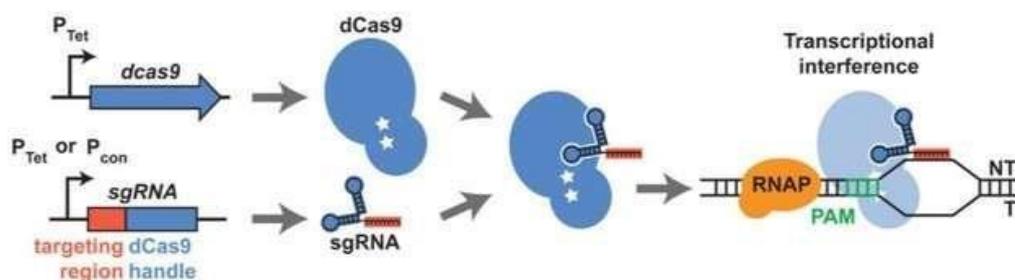


Figura 2. Esquema de la represión transcripcional mediada por CRISPRi. El *dcas9* inducible por anhidrotetraciclina (ATc) (P_{Tet}) se dirige a dianas de ADN específicas mediante sgRNA inducible por ATc o expresado constitutivamente (P_{con}), lo que impide el inicio o la elongación de la transcripción. Fuente: Rock J. (85).

4.6. Tecnología de recombinación mediada por oligonucleótido seguida del direccionamiento por una integrasa Bxb1 (ORBIT)

La técnica ORBIT ha sido fundamental en el avance del entendimiento molecular y la intervención sobre MTB. Fue desarrollada por Kenan C. Murphy en el año 2018. Esta técnica ha permitido generar modificaciones genómicas precisas y su evaluación directa en contextos de patogenicidad y resistencia a antibióticos en MTB y MSMEG (50). El sistema emplea un oligonucleótido guía de 188 pares de bases (pb), que incorpora la secuencia específica del sitio de recombinación Bxb1 (attP) flanqueada por secuencias que coinciden con el sitio específico en el cromosoma de MTB que se desea modificar o eliminar (50).

El sistema, además del oligonucleótido guía, emplea dos plásmidos denominados pKM461 y pKM464. En primer lugar, el plásmido pKM461 se electroporó a MTB para inducir la expresión de la enzima RecT anelasa y la integrasa Bxb1 empleando ATc. Posteriormente, la co-electroporación del oligonucleótido guía y el plásmido de selección pKM464 permiten que las enzimas RecT y Bxb1 recombinen e integren el oligonucleótido guía, el cual presenta la secuencia attP, en reemplazo de la secuencia silvestre del gen blanco y su posterior selección en cultivo *in vitro* (Figura 3A) (50, 85).

El plásmido de selección pKM464, carece de origen de replicación en micobacterias (OriM) pero contiene una secuencia attB, que reconoce la secuencia attP del oligonucleótido guía en el genoma de MTB. La ausencia de OriM asegura que la permanencia del plásmido en las células de MTB solo sea posible a través de

la recombinación sitio específica mediada por la integrasa Bxb1, utilizando el nuevo sitio attP creado en el cromosoma (Figura 3B).

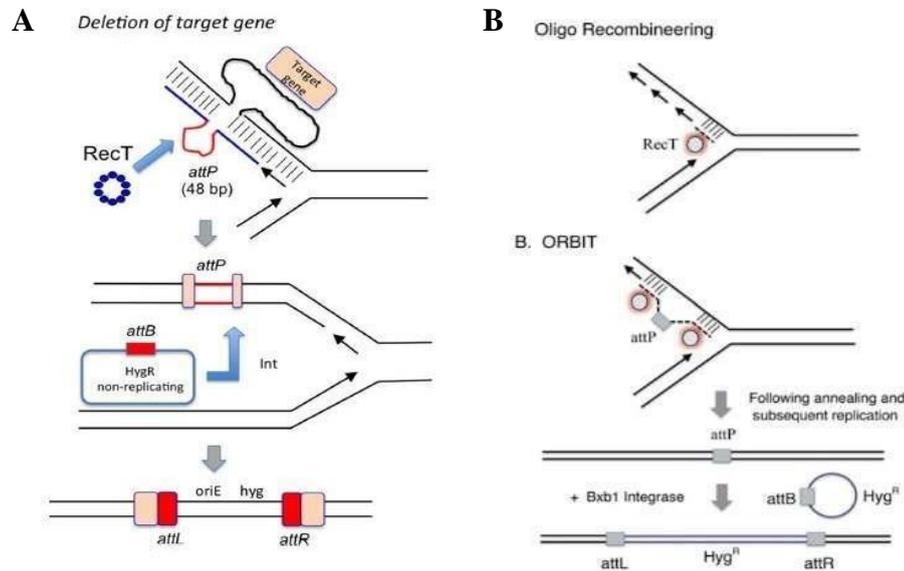


Figura 3. Delección del gen objetivo y procesos de recombinación en el sistema ORBIT. **A.** Electroporación de oligonucleótido guía que mantiene la secuencia attP y el plásmido pKM464 que mantiene la secuencia attB en MTB. RecT integra attP en el cromosoma eliminando la secuencia silvestre del gen blanco. **B.** Recombinación oligomérica: Se visualiza la anelasa Che9c-RecT uniendo un oligonucleótido guía, que incorpora la secuencia attP de Bxb1, a la hebra rezagada del ADN bacteriano durante la replicación del cromosoma. **B. ORBIT:** Posteriormente, en la misma fase de replicación, la integrasa Bxb1 inserta el vector de carga pKM464 en el cromosoma a través de la recombinación específica de sitio en el nuevo punto attP. Este vector lleva la secuencia attB y el gen de resistencia a higromicina (Hyg^R), permitiendo la selección de mutantes que han perdido el gen blanco. Fuente: Kenan M. (50)

V. METODOLOGÍA

5.1. Tipo de Estudio

Estudio exploratorio y correlacional, complementado con un enfoque analítico-experimental.

5.2. Diseño de Estudio

El estudio se divide en 4 etapas

1. Selección de genes candidatos que codifican bombas de eflujo mediante herramientas bioinformáticas y revisión bibliográfica.
2. Implementación del sistema CRISPRi, que comprendió el diseño del sgRNA para cada gen a evaluar, la clonación del sgRNA en el vector pLJR965 y su verificación en *E. coli*. El plásmido recombinante verificado se incorporó en el genoma de MTB por electroporación y se verificó por secuenciación de SANGER. Finalmente, se evaluó el nivel de expresión génica de los genes blanco reprimidos.
3. Delección mediante ORBIT de los genes seleccionados. Se emplearon oligonucleótidos diseñados (secuencia attP), seguido de una selección y verificación de la delección génica mediante secuenciación por Oxford Nanopore.
4. Evaluación de las represiones y deleciones en el eflujo del POA y la susceptibilidad a PZA (Figura 4).

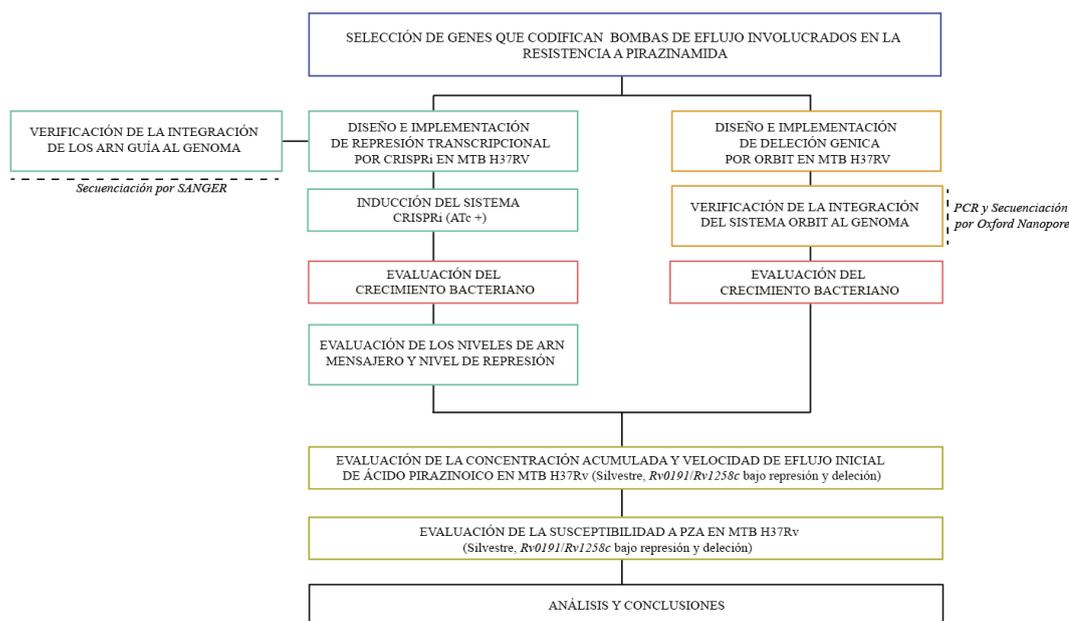


Figura 4. Flujograma de trabajo.

5.3. Área de Estudio

El presente estudio fue ejecutado en las instalaciones de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), ubicadas en la Facultad de Ciencias y Filosofía, dentro de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID). Los ensayos para el cultivo *in vitro* de MTB H37Rv se llevaron a cabo en un ambiente controlado, en el Laboratorio de *Mycobacterium* 118, con un nivel de bioseguridad III, garantizando la contención apropiada de este agente patógeno. Los experimentos moleculares se ejecutaron en el Laboratorio de Bioinformática, Biología Molecular y Desarrollos Tecnológicos, que cuenta con un nivel de bioseguridad II.

5.4. Material Biológico

Los plásmidos pKM461 y pKM464, esenciales para la eliminación de los genes de interés, fueron proporcionados por el Dr. Anthony Baughn de la Universidad de Minnesota, en el Departamento de Microbiología e Inmunología. Asimismo, el

plásmido pLJR965, para generar la represión génica, fue cortesía del Dr. Jeremy Rock de la Universidad Rockefeller, del Laboratorio de Biología de Patógenos y Huéspedes. Los oligonucleótidos guía y los ARNs guía fueron sintetizados por la empresa biotecnológica Integrated DNA Technologies (IDT). El inventario del material biológico utilizado se encuentra detallado en la Tabla 1.

Tabla 1. Material Biológico del estudio

Ítem	Material Biológico	Descripción	Almacenamiento
1	Bacteria	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> cepa H37Rv	-80°C
2	Bacteria	<i>Escherichia coli</i> cepa NovaBlue	-80°C
3	Vector	pLJR965	-20°C
4	Vector	pKM461	-20°C
5	Vector	pKM464	-20°C

5.5. Procedimiento Experimental

5.5.1. Identificación de genes que codifican bombas de eflujo en MTB H37Rv asociadas a la resistencia a PZA.

Los genes que codifican para bombas de eflujo se identificaron mediante la base de datos Mycobrowser (<https://mycobrowser.epfl.ch/>), se tomaron en cuenta los ID de cada proteína para realizar su búsqueda mediante la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), solo tomando los genes depositados en el genoma de referencia de MTB cepa H37Rv (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000195955.2/, genoma ensamblado ASM1959v2).

Posteriormente, se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica para identificar genes que codifican bombas de eflujo involucrados en la resistencia a antibióticos, utilizando como criterio de selección la presencia de mutaciones y alteraciones en su expresión, encontradas bajo su relación con la resistencia a PZA y su papel crítico en el sistema de eflujo de ácido POA.

5.5.2. Diseño del sistema CRISPR de interferencia (CRISPRi) en MTB H37Rv.

5.5.2.1. Diseño e hibridación del ARN guía (sgRNA).

Los sgRNA se diseñaron empleando el protocolo de Rock et al. 2017 (85). Brevemente, en la cadena reversa complementaria a la cadena no molde se identificó una secuencia PAM con una capacidad de represión superior a 50 pliegues (Anexo 1). Se eligieron entre 20 – 25 nucleótidos con terminación en citosina (C) o timina (T), siendo esta secuencia el cebador *reverse*, y su complementario el cebador *forward*. A los mismos se le agregaron en sentido 5' los nucleótidos GGGA (*forward*) y los nucleótidos AAAC (*reverse*).

Los sgRNA diseñados fueron identificados en la base de datos Pebble (<https://pebble.rockefeller.edu/>) donde se anotaron valores de fuerza de represión predicha, logaritmo de cambio de pliegue (LOG2FC, por su abreviación en inglés) predicho y el índice de vulnerabilidad (IV) para los genes de interés descritos en la Tabla 2, en esta tabla las secuencias de cebadores correspondientes al sgRNA del gen *groEL*, cumplen la función de verificar el correcto funcionamiento del sistema de represión, este gen se ha reprimido y evaluado con éxito a nivel de laboratorio (no mostrados).

Finalmente, los sgRNA fueron sintetizados por la compañía IDT. Los sgRNA fueron reconstituidos con agua grado molecular (100 μM) y diluidos 1:100 (1 μM). Para formar el sgRNA para cada gen de interés, se tomaron 2 μl de cada oligonucleótido forward y reverse (1 μM) y se añadieron a 46 μl de solución tampón de hibridación compuesta por 50 mM de TRIS pH 7.5, 50 mM NaCl y 1 mM de EDTA usando un termociclador Quant Studio 5 (Applied Biosystems, USA) a 95 °C por 2 minutos, disminuyendo la temperatura hasta 25 °C a una tasa de 0.1 °C/segundo.

Tabla 2. Secuencias sgRNA *Rv0191* y *Rv1258c* y valores predichos.

Nota. Gen target: gen blanco, PAM: Motivo adyacente al protospaciador, LOG2FC: logaritmo en base 2 de cambio de pliegue, ND: No determinado. Los valores predichos han sido tomados de la plataforma Pebble.com realizada por Bosch y cols. (46). *Los niveles de represión corresponden a valores reportados por Rock y cols. (45).

5.5.2.2. Clonación del plásmido pLJR965:sgRNA en *E. coli* cepa NovaBlue.

5.5.2.2.1. Linealización de plásmido pLJR965 e hibridación de sgRNA.

La cepa de *E. coli* NovaBlue con el plásmido pLJR965 crio conservada a -70°C, se reactivó inoculándola en agar Luria-Bertani (LB) suplementado con antibiótico tetraciclina (concentración final de 12.5 $\mu\text{g/ml}$) y kanamicina (concentración final de 40 $\mu\text{g/ml}$), seguida de una incubación a 37 °C por 24

horas. Con la finalidad de propagar el plásmido, una colonia reactivada y aislada se cultivó en 10 ml de caldo LB con tetraciclina y kanamicina en las mismas concentraciones. La extracción del ADN plasmídico pLJR965, se realizó empleando el kit Analytikjena innuPREP DNA/RNA Mini Kit (Catálogo #845-KS- 20800050).

Se digirió 1 µg del plásmido pLJR965 con 5 unidades (U) de la enzima BsmBI, NEB (Catálogo #R0739S) a 55 °C en baño maría durante 12 horas con agitaciones intermitentes cada 30 minutos para prevenir la condensación del vapor. La verificación de la linealización se efectuó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, a 90V durante 55 minutos, teñido con SYBR safe DNA gel stain Invitrogen (Catálogo #S33102). Finalmente, se purificó el plásmido con el kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, Zymoresearch (Catálogo #D4001).

5.5.2.2.2. Ligación de plásmido pLJR965 y producto de hibridación.

El plásmido pLJR965 linealizado y purificado se ligó a los sgRNA hibridados para cada gen de interés. En un microtubo de 0.2 ml se preparó la siguiente reacción: 9 ng de plásmido pLJR965 linealizado y purificado, 0.5 µl de sgRNAs (concentración final de 1 µM), 0.5 µl de solución tampón de la enzima T4 ADN ligasa y enzima T4 ligasa (concentración final de 1U/µl), Thermo Scientific (Catálogo #EL0014). La reacción se completó con agua grado molecular hasta un volumen de 5 µl y fue incubada a 16 °C durante 20 horas.

Adicionalmente, se realizó una reacción de control autoligado. Esta reacción contuvo todos los componentes mencionados previamente, excepto los sgRNAs hibridados. Finalmente, la reacción de ligación con los plásmidos recombinantes pLJR965:sgRNA fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

5.5.2.2.3. Transformación de plásmido recombinante en *E. coli* NovaBlue

Ambos plásmidos recombinantes pLJR965:sgRNA fueron transformados en células de *E. coli* NovaBlue quimio-competente previamente elaboradas (Anexo 2). 100 µl de células competentes y 5 µl del producto de ligación (pLJR965:sgRNA) se incubaron en hielo durante 2 minutos; luego a 37°C durante 40 segundos y nuevamente en hielo durante 30 minutos.

Rápidamente, se agregó 1 ml de medio caldo SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*), Invitrogen (Catálogo #15544-034) y se incubó a 37°C durante 1 hora para recuperar la viabilidad de las células de *E. coli* transformadas.

Rápidamente, se agregó 1 ml de medio caldo SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*), Invitrogen (Catálogo #15544-034) a la reacción (células competentes + producto de ligación) y se incubaron a 37°C durante 1 hora con la finalidad de recuperar la viabilidad de las células de *E. coli* NovaBlue transformadas.

Finalmente, se sembró 100 µl del cultivo recuperado en agar LB conteniendo tetraciclina y kanamicina a 37°C durante 24 horas, de esta manera se seleccionaron las colonias que integraron el plásmido con éxito. El proceso se repitió para el control autoligado, que solo contenía el plásmido pLJR965 ligado.

5.5.2.2.4. Verificación de la clonación.

Entre 4 a 8 colonias E. coli NovaBlue transformantes fueron cultivadas en medio caldo LB con tetraciclina y kanamicina durante 24 horas a 37°C. Las bacterias fueron colectadas mediante centrifugación a 10 000 x g por 15 minutos, con la finalidad de realizar la extracción del plásmido recombinante empleando el kit Analytikjena innuPREP DNA/RNA Mini Kit (Catálogo #845-KS- 20800050) siguiendo los pasos descritos por el fabricante.

La integridad de los plásmidos recombinantes fue verificada en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 90V durante 55 minutos. En este punto, no fue posible verificar la presencia de los sgRNAs en los plásmidos debido a que los sgRNAs contienen aproximadamente 20 pares de bases. Los plásmidos fueron cuantificados por NanoDrop 2000, ThermoFisher (#Catálogo ND2000).

La región del sgRNA fue secuenciado mediante el método SANGER (Psomagen) usando el cebador que se hibrida en el plásmido pLJR965 y flanquea el sgRNA de cada gen. Primer 1834_Rv: 5'-TTC CTG TGA AGA

GCC ATT GAT AATG3', Tm: 66.8 °C, 5 µM. Las secuencias fueron alineadas empleando el programa MEGA11 y se verificó que la secuencia del sgRNA no tenga mutaciones, inserciones o deleciones.

5.5.2.2.5. Preparación de células competentes en MTB H37Rv y electroporación con el plásmido pLJR965 recombinante.

En primer lugar, se reactivó la cepa MTB H37Rv previamente crio-conservada tomando 50 µl de cepa y sembrándola en agar 7H10 suplementado con 10% de OADC (Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y 0.2% de glicerol (7H10-O). Las placas de cultivo fueron incubadas durante 3 semanas a 37 °C.

Luego de 3 semanas, se tomó una asada de la cepa reactivada y se sembró en 5 ml de caldo 7H9, suplementado con OADC y Tween-80 al 0.05 % (7H9-O-T80) e incubada durante 7 días (OD₆₀₀ inicial de 0.05 – OD₆₀₀ final de 1.0) a 37 °C en agitación constante (200 rpm). Posteriormente, se tomaron 3 ml de esta cepa y se trasladó a un matraz con 47 ml de caldo 7H9-O-T80. El volumen final de 50 ml fue incubado durante 3 días a 37°C (OD₆₀₀ inicial de 0.05 – OD₆₀₀ final de 0.7).

Luego de 3 días de crecimiento se agregaron 5 ml de glicina 2M para inducir el estado de competencia celular. Luego de 16 horas de incubación a 37°C en constante movimiento, las células MTB competentes fueron colectadas en dos tubos de 50 ml y precipitadas a 3000 x g durante 20 minutos en una centrifuga refrigerada a 17 °C. En este punto el proceso de centrifugado puede generar calor, por este motivo mantener las células en refrigeración asegura su

viabilidad para el proceso de electroporación. El precipitado fue resuspendido en 10 ml de glicerol al 10% y fue precipitado nuevamente a la misma velocidad, este proceso se repitió dos veces. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 1 ml de glicerol al 10 %.

Seguidamente, la electroporación se realizó tomando 200 μ l de MTB competentes y 200 ng de plásmido recombinante en un volumen de 4 μ l. Las condiciones de electroporación fueron un pulso de 2.5 kV, 25 μ F, 1000 ohmios, con un tiempo de pulso óptimo de 22 mili segundos (ms). Como control de electroporación se empleó 4 μ l de agua grado molecular.

Inmediatamente, el contenido de cada electroporación se cultivó en 5 ml de caldo 7H9-O-T80, y fueron incubados a 37 °C en agitación constante (200 rpm) durante 16 horas. Posteriormente, se realizaron 2 diluciones seriadas del cultivo (1:10 y 1:100) en un volumen de 1 ml. De esta manera, además de la siembra directa, se sembraron 100 μ l de cada dilución a placas con agar 7H10-O suplementado con antibiótico kanamicina (concentración final de 25 μ g/ml), cada placa de cultivo se incubó durante 3 semanas a 37 °C.

Se seleccionaron 3 colonias aisladas de MTB H37Rv recombinante para cada sgRNA y se sembraron en 5 ml de caldo 7H9-O-T80 suplementado con kanamicina (25 μ g/ml) durante 7 días (OD_{600} inicial de 0.05 – OD_{600} final de 1.0). Luego, el cultivo fue cosechado y precipitado en un tubo de 15 ml, con la

finalidad de realizar extracción de ADN genómico (ADNg) empleando el método de proteínasa K (Anexo 3).

Finalmente, la integridad del ADNg se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 90V por 55 minutos (Anexo 4), el mismo fue purificado y enviado para secuenciación de SANGER a la empresa Psomagen. Para este fin, se emplearon los cebadores 2436 5'-TGCGGCGCTTTTTTTTTTGAATTC-3' (Temperatura melting: 65.4 °C) y 2438 5'-CTGCGTTATCCCCTGATTCTG-3' (Temperatura melting: 63.5 °C) a una concentración inicial de 5 µM y final de 0.1 µM para amplificar la hebra sentido (5'-3') y anti-sentido (3'-5'), respectivamente, que flanquean el sgRNA y el plásmido pLJR965 integrados al genoma de MTB.

5.5.2.3. Inducción del sistema CRISPRi en H37rv:pLJR965-sgRNA.

Las clonas de MTB recombinantes con cada sgRNA fueron sembradas en 5 ml de caldo 7H9-O-T80 suplementado con kanamicina (25 µg/ml) a 37 °C en agitación a 100 rpm durante 7 días (OD₆₀₀ inicial de 0.05 - OD₆₀₀ final de 1.0). Posteriormente, se sembró 1 ml de cepa recombinante en 9 ml de caldo 7H9 bajo las mismas condiciones durante 4-5 días (OD₆₀₀ inicial de 0.05 a OD₆₀₀ final de 0.8), luego de este periodo se trasladaron entre 4-5 ml de cultivo con caldo 7H9 bajo las mismas condiciones para llegar a un volumen total de 20 ml con la finalidad de obtener un OD₆₀₀ entre 0.15-0.20.

En este punto, se dispusieron 2 recipientes rectangulares de cultivo por cada gen a evaluar, un recipiente con el sistema inducido a represión génica mediante ATc (concentración final de 100 ng/ml) y otro control negativo sin inducción. Cada recipiente fue envuelto en papel aluminio y se incubó a 37 °C en agitación constante (100 rpm) durante 5 días (OD₆₀₀ inicial de 0.15-0.20 y OD₆₀₀ final de 1.2).

5.5.2.4. Cuantificación relativa de la abundancia del ARN mensajero (ARNm) en cepas MTB H37Rv bajo represión génica.

5.5.2.4.1. Extracción de ARN.

La extracción de ARN se efectuó tanto en bacterias inducidas (ATc +) y no inducidas (ATc -). Se colectó el contenido de los recipientes de cultivo a tubos de 50 ml, luego se centrifugaron a 3000 x g durante 20 minutos a 4 °C en centrifuga refrigerada. El precipitado se resuspendió en 1 ml de TRI reagent (Zymo Research, Catálogo #R2050-1-200) en un tubo que contenía perlas de zirconio de 0.1 mm para la lisis celular física empleando el equipo FastPrep-24 (MP Biomedicals, USA) a 6.5 m/s durante 30 segundos (en dos ocasiones). Posteriormente, los cultivos lisados se centrifugaron a 12 000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Al sobrenadante resultante se le añadió 200 µl de cloroformo, se homogenizó por inversión durante 10 segundos y se incubó por 5 minutos en hielo.

Seguidamente, la mezcla fue centrifugada a 12 000 x g durante 15 minutos. La fase acuosa se mezcló con un volumen igual de etanol frío y se transfirió a una columna del kit Directzol RNA (Zymo Research, Catálogo #R2051), donde se

incubó a 4 °C durante 10 minutos. Luego, se centrifugó a 16 000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el tubo colector y los lavados de columna se realizaron con 400 µl y 700 µl de Directzol RNA pre-wash (Zymo Research, Catálogo #R2051), utilizando centrifugaciones a 16 000 x g durante 30 segundos y 2 minutos a 4 °C.

Finalmente, el ARN se eluyó con 35 µl de agua libre de ARNasas (DEPC), y su concentración se determinó por cuantificación en el equipo Nanodrop 2000, mientras que su integridad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90V durante 55 minutos en TBE 0.5X.

5.5.2.4.2. Tratamiento de ADNasa I y purificación de ARN.

El ARN extraído se trató con el kit Turbo DNase I (Invitrogen, Catálogo # AM2238) para eliminar cualquier traza de ADN. Se añadieron 2.5 µg de ARN, 1 µl de DNase I, 5 µl de buffer 10X y agua DEPC hasta completar un volumen final de 50 µl, siguiendo las indicaciones del fabricante. La incubación se realizó a 37 °C durante 30 minutos. Las muestras de ARN previamente tratadas se purificaron empleando el kit RNA *Clean & Concentrator* (Zymo Research, Catálogo #R1017) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.5.2.4.3. Retro-transcripción para la generación de ADNc.

Quinientos ng de ARN fue retro-transcrito; brevemente, la reacción se realizó en tres secciones, 1) Se mezcló 1 µl (cantidad 0.2 µg) de *Random Hexamer Primer* (Thermo Scientific, Catálogo #SO142), 1 µl (concentración 10 mM) de dNTPs (Thermo Scientific, Catálogo #R0182), ARN tratado y purificado (500

ng) y se completó la reacción con agua grado molecular a un volumen de 15 μ l, seguidamente se incubó la reacción a 65 °C durante 10 minutos. 2).

A la reacción previa se agregó 4 μ l (concentración final 1X) de buffer *First Strand M-MLV 5X* (Invitrogen, Catálogo #28025013), 2 μ l de DTT (Thermo Scientific, Catálogo #R0861) y 0.5 μ l (20 U) de RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Catálogo #10777-019), seguidamente se incubó la reacción a 37 °C durante 2 minutos e inmediatamente se dispuso la reacción en hielo y 3) A la reacción se agregó 0.5 μ l (100 U) de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, Catálogo #28025013).

Al tubo control se le agregó 0.5 μ l de agua grado molecular, seguidamente se incubó a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 1 hora, 72 °C por 15 minutos y a 4 °C hasta ser retirados del termociclador T100 (BIO-RAD,USA). Finalmente, el producto de ADNc fue alicuotado en tubos de 1.5 ml y almacenado a – 20 °C hasta su uso.

5.5.2.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) relativa.

La amplificación y cuantificación relativa de los niveles de ARNm se realizó usando ADNc como molde en PCR en tiempo real utilizando SYBR Green. Los cebadores (Tabla 3) fueron diseñados para regiones diana en el extremo 3' de las secuencias complementarias de los sgRNA de cada gen. En la amplificación se usaron los cebadores en una concentración de 0.1 μ M junto con 2.5 μ l de SYBR Green (1X) (Applied Biosystems, Catalogo #4309155), 4.5 μ l de agua grado molecular y 1 μ l de ADNc en un volumen total de 10 μ l (25 ng/ μ l).

El programa de ciclado térmico consistió en una denaturación inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 61 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 10 segundos, finalizando con una curva de melting que comenzó a 95 °C durante 5 segundos, 65 °C durante 1 minuto y 97 °C en el termociclador Quant Studio 5 (Applied Biosystems, USA).

Finalmente, para evaluar la represión genética, se realizó una cuantificación relativa del ARNm mediante RT-PCR. El análisis se llevó a cabo utilizando el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (90), tomando el gen *SigA* como referencia para la expresión constitutiva y normalizar los datos bajo las condiciones de estudio, que incluyeron el tratamiento de inducción de represión con ATc y sin inducción.

Tabla 3. Cebadores para amplificación de los genes a evaluar.

Gen Blanco	Cebador <i>forward</i> (5'–3')	Cebador <i>Reverse</i> (5'–3')
<i>Rv0191</i>	CGTAATCCTCGCCTGGTCAA	CAGATTCGGCCCACGTACA
<i>Rv1258c</i>	CTACGAGGCGATCCTCAACC	CGAGGATGGACAACCCGAAT
<i>groEL</i>	TGTCGGCATACTTCGTTACC	AGCGAGCTGATCTTGTCTTG
<i>SigA</i>	CCATCCCGAAAAGGAAGACC	TCGAGGTCTGGTTCAGCGTC

5.5.3. Diseño e implementación del sistema ORBIT en MTB H37Rv

5.5.3.1. Diseño de oligonucleótidos

En el proceso de replicación cromosómica de MTB, el oligonucleótido guía utilizado en la técnica ORBIT se inserta en el gen objetivo imitando un

fragmento de Okazaki. Por esta razón, es crucial que las secuencias adyacentes de los oligonucleótidos guía estén configuradas para ser complementarias inversas de la cadena molde que se replica de manera rezagada. El diseño del oligonucleótido guía comienza con la creación de una secuencia precursora. Para ello, se toma la secuencia de ADN a partir de la cadena codificante de los genes objetivo, comenzando 200 pares de bases antes del codón de inicio y extendiéndose 200 pares de bases después del codón de parada.

Cada uno de los extremos flanqueantes de la secuencia precursora del oligonucleótido guía constará de 70 bases que corresponden a los extremos flanqueantes de cada gen objetivo, incluyendo los primeros y últimos 10 codones. La secuencia attP reconocida por la integrasa Bxb1 (GGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAA ACC) se insertará en el medio de las secuencias flanqueantes extraídas de cada gen objetivo. En ambos casos, la secuencia del oligonucleótido guía se selecciona como el complemento inverso de la hebra rezagada de cada gen objetivo. Identificamos la orientación y ubicación del gen a través del NCBI en el genoma de referencia de MTB H37Rv. Adicionalmente, se evita tomar regiones que contemplen genes adyacentes, de esta manera los oligonucleótidos diseñados se representan en la figura 5.

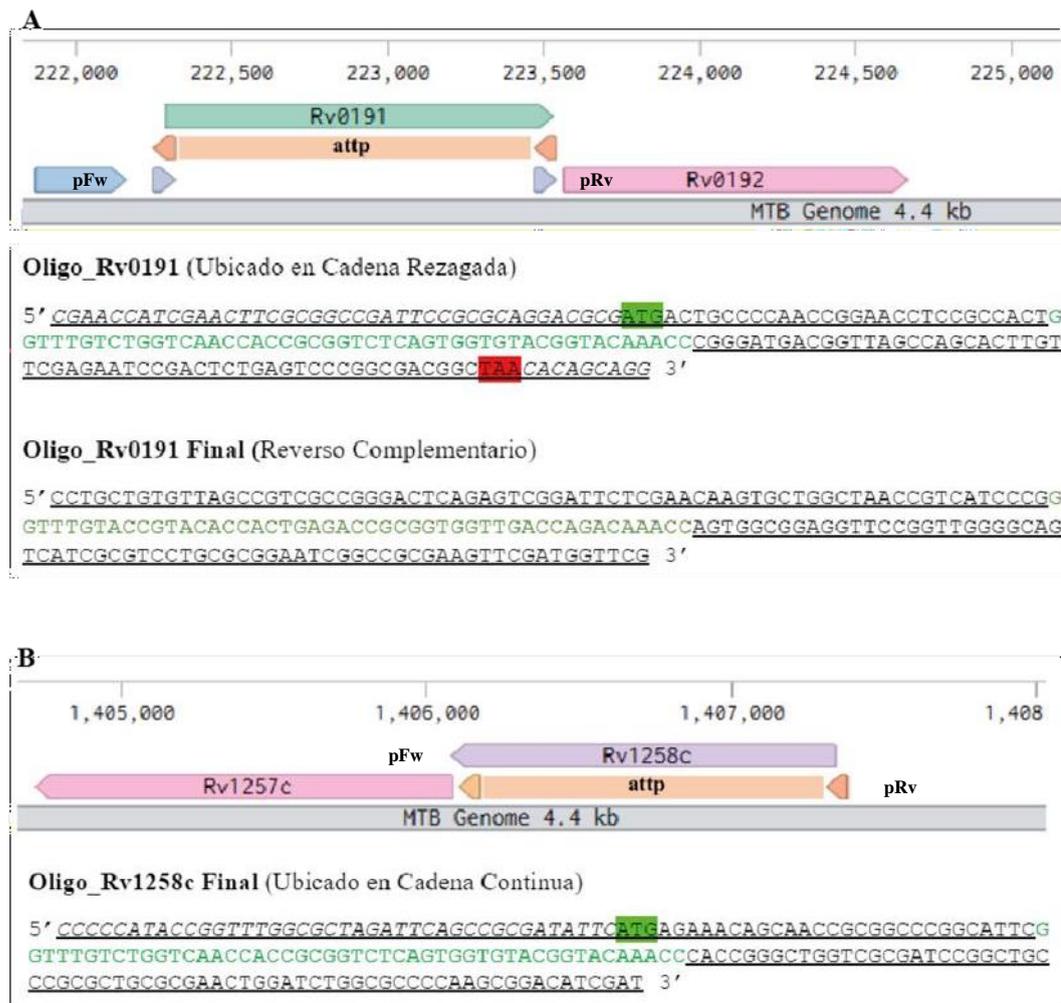


Figura 5. Secuencias de los genes *Rv0191* y *Rv1258c* tomando en cuenta 200 pb *up-stream* y *down-stream*. A. Ubicación de las secuencias mencionadas en el genoma de MTB H37Rv, pFw y pRv corresponden a los cebadores *forward* y *reverse* diseñados para la verificación por PCR de la presencia del oligonucleótido guía indicando un tamaño de producto de 478 pb. **Oligo_Rv0191** representa la secuencia ubicada en la cadena rezagada del oligonucleótido, en verde, secuencia attP. **Oligo_Rv0191 Final.** Muestra la secuencia reverso complementario al oligonucleótido seleccionado, esta conforma el oligonucleótido guía final para generar la delección de *Rv0191*. **B.** Ubicación de las secuencias mencionadas en el genoma de MTB H37Rv, producto de 435 pb. **Oligo_Rv1258c Final.** Muestra la secuencia ubicada en la cadena continua del oligonucleótido, la región de color verde corresponde a la secuencia attP, esta conforma el oligonucleótido guía final para generar la delección *Rv1258c*.

5.5.3.2. Electroporación de plásmido pKM461

A 200 μ l de células competentes se le añadieron 4 μ l del plásmido pKM461 (200 ng/ μ l). La mezcla fue electroporada en una cubeta con un pulso de 2.5 kV, 25 μ F, 1000 ohmios, y un tiempo de pulso óptimo de 22 ms. Inmediatamente se trasladó el contenido electroporado a un tubo de 5 ml de medio caldo 7H9-O-T80 suplementado con kanamicina (25 μ g/ml) (7H9-O-T80-K) y se incubó a 37°C en agitación constante durante 4 días.

Posteriormente, se precipitaron las células por centrifugación a 3000 x g durante 10 min a 17 °C y se resuspendieron en 1 ml de medio 7H9-OADC. A partir de esta resuspensión se prepararon diluciones 1:10 y 1:100 en un volumen de 1 ml empleando como diluyente, 7H9-OADC. Seguidamente se sembraron 100 μ l de cada dilución y 10 μ l de siembra directa a placas que contenían agar 7H10-OADC y kanamicina (25 μ g/ml) e incubados a 37 °C durante 3 semanas.

Luego de este periodo de tiempo, se seleccionaron 3 colonias recombinantes. Cada colonia se sembró a un matraz con 50 ml de caldo 7H9-O-T80-K. Se incubaron durante 4 días a 37 °C con agitación constante (100 rpm) (OD₆₀₀ final entre 1.5-1.8). Posteriormente, las células fueron cosechadas y precipitadas en un tubo de 50 ml a 3000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Luego, cada tubo fue resuspendido con 3 ml de 7H9-O-T80 y glicerol al 50%. Finalmente, se alicuotó 1 ml de la suspensión celular en tubos crioviales de 1.2 ml y fueron almacenados inmediatamente a - 70 °C hasta su uso.

5.5.3.3. Electroporación del vector plasmídico pKM464 y Oligonucleótidos guía en MTB H37Rv pKM461.

Se tomaron 500 μ l de una suspensión de MTB H37Rv conteniendo el plásmido pKM461 fue cultivado con agitación constante a 100 rpm a 37°C (OD₆₀₀ final de 0.8). En este punto, se añadió ATc (500 ng/ μ l), y se continuó con la incubación a 37°C con la agitación durante 8 horas. Posteriormente, se agregó 5 ml de glicina 2 M y se incubó por 16 horas adicionales a 37°C con agitación para inducir la formación de células competentes. Las células MTB:pKM461 competentes fueron precipitadas a 3000 x g durante 10 minutos a 17 °C y se resuspendieron en 30 ml de glicerol al 10 % (en dos ocasiones).

Finalmente, las células se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 10 %. Seguidamente, se dispusieron 200 μ l de células competentes en un tubo de 1.5 ml, al cual se le añadieron entre 3.6 μ l del plásmido pKM464 (previamente extraído), a una concentración de 200 ng/ μ l, y 3 μ l de oligonucleótido guía para cada gen de interés a una concentración de 10 μ M. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación donde se llevó a cabo un pulso de 2.5 kV, 25 μ F, 1000 ohmios, y un tiempo de pulso óptimo de 22 ms. Inmediatamente se trasladó el contenido electroporado a un tubo de 5 ml de medio caldo 7H9-OADC suplementado con higromicina (50 μ g/ml) y kanamicina (25 μ g/ml) (7H9-O-T80-KH), luego se incubó a 37°C en agitación constante (100 rpm) durante 5 días.

Posteriormente, las células se recuperaron por centrifugación a 3000 x g durante 10 min a 17 °C y se resuspendieron en 1 ml de medio 7H9-OADC. A partir de

esta resuspensión se prepararon diluciones 1:10 y 1:100 en un volumen de 1 ml empleando como diluyente, 7H9-O-T80. Finalmente, se sembraron 100 µl de cada dilución y 10 µl de siembra directa a placas que contenían agar 7H10-OADC, higromicina (50 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml) y fueron incubadas a 37 °C durante 3 semanas.

5.5.3.4. Verificación de la incorporación del oligonucleótido guía al ADN_g de MTB H37Rv.

Una colonia aislada para cada oligonucleótido guía (MTB:pKM461+pKM464+Oligo *Rv0191/Rv1258c*), previamente seleccionada en placas de agar 7H10-OADC y higromicina (50 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml), fue sembrada en 10 ml de caldo 7H9-O-T80 se incubó durante 7 días. Posteriormente, las células fueron centrifugadas y se realizó la extracción de ADN genómico utilizando el método de proteinasa K (Anexo 3).

Se emplearon cebadores previamente diseñados para la amplificación de la región del ADN que contenía la secuencia attP para cada gen de interés (Figuras 6B y 7B). Para verificar el oligonucleótido guía *Rv0191* se utilizaron los cebadores *forward* 5'-TGACGGCAAGCTGGCAGAG-3', *reverse* 5'-CATCAGCACCGCAACCACT-3'. Para verificar el oligonucleótido guía *Rv1258c* se emplearon los cebadores *forward* 5'-GCTCTACCGGGGACCTGAA-3' y *reverse* 5'-TGATTGCCAGCGGTTTGCC-3.

Se utilizó la enzima Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer (NEB, Catálogo #M0531S) a una concentración final de 1X, adicionando los cebadores *forward* y *reverse* a una concentración final de 0.5 µM y 200 ng de ADN_g de MTB. La reacción se completó a un volumen total de 25 µl con agua grado molecular. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes, denaturación inicial de 94 °C por 5 minutos, ciclaje de 94 °C durante 40 segundos, hibridación a 66.1 °C (para ambos cebadores), extensión a 72 °C durante 1 minuto y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Inmediatamente, los amplicones fueron cuantificados y verificados por electroforesis de agarosa al 1% en TAE 1X durante 55 minutos a 90V. Adicionalmente, los productos de PCR fueron purificados empleando el kit High Pure PCR *Product Purification* (Roche, Catálogo # 11 732 668 001). Los amplicones se verificaron por secuenciación Oxford Nanopore a una concentración de 5.56 ng/µl y se analizaron mediante alineamiento empleando el programa CLUSTAL Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>).

5.5.4. Evaluación del crecimiento bacteriano en cepas modificadas genéticamente.

Las cepas de MTB H37Rv silvestre y modificadas genéticamente se cultivaron en medio 7H9-O-T80 a 37 °C en movimiento (150 rpm). Bajo el sistema de represión, al medio de cultivo se añadió kanamicina a una concentración de 25 µg/ml y el inductor ATc a una concentración de 100 ng/µl. Bajo este sistema los cultivos iniciaron con un OD₆₀₀ de 0.20. Respecto al sistema de delección génica, al medio se añadió kanamicina e higromicina a concentraciones de 25 y 50 µg/ml, respectivamente. Bajo este sistema los cultivos iniciaron con 0.05. El monitoreo del crecimiento se evaluó durante 5 días, mediante mediciones del OD₆₀₀ cada 24 horas.

Los valores de OD₆₀₀ fueron adaptados a una curva de crecimiento logístico bajo el siguiente modelo: $Y = \frac{YM \times Y0}{(YM - Y0)e^{-k \times X} + Y0}$, donde Y0 representa la población inicial del cultivo a evaluar, YM (Ymax) es la población máxima a la que el cultivo puede llegar de acuerdo a las condiciones de cultivo y al impacto de las modificaciones genéticas, k es la constante de velocidad a la que crecen las colonias evaluadas (unidades inversas de X) y 1/k es la coordenada X del primer punto de inflexión. El número de puntos empleados para ajustar el modelo logístico fueron 18 en todos los casos, los valores evaluados corresponden a 3 y 2 réplicas biológicas para el sistema bajo represión y delección génica, respectivamente.

5.5.5. Cuantificación de POA en el medio extracelular en cepas modificadas genéticamente.

5.5.5.1. Elaboración de curva estándar de POA

A partir de un cultivo en caldo 7H9-O-T80 de la cepa MTB H37Rv, se preparó una suspensión bacteriana a un OD₆₀₀ de 0.20, luego se incubó a 37°C durante 4 días. Seguidamente, las células fueron precipitadas por centrifugación a 3000 x g por 10 min a 17°C, y el sobrenadante fue esterilizado empleando un filtro estéril 0.22 µm. Este sobrenadante filtrado se empleó como diluyente para la preparación de los puntos de concentraciones conocidas que conformaron la curva estándar de POA (0, 0.01, 0.05, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mM). Posteriormente, se realizó la reacción de Wayne a cada una de las soluciones estándares para conocer los valores de absorbancia a OD₄₅₀.

Brevemente, se añadieron 300 µl de la solución estándar a un tubo de 1.5 ml, se agregaron 30 µl de sulfato de amonio ferroso al 10%, se homogenizó vigorosamente y se centrifugó dos veces a 10,000 x g durante 10 minutos. Luego, se transfirieron 100 µl del sobrenadante a una placa de 96 pocillos por triplicado y se procedió a leer en un espectrofotómetro SpectraMax 190 (Molecular Devices, USA).

Las lecturas obtenidas fueron promediadas y ajustadas para la elaboración de la curva estándar. Para ajustar las lecturas de los estándares, se tomaron 10 lecturas de blanco, que estuvieron conformadas solo por el sobrenadante estéril de H37Rv y sulfato de amonio ferroso al 10%. Finalmente, se calculó el coeficiente de correlación (R^2) para evaluar la linealidad de la curva estándar.

5.5.5.2. Preparación de cepas MTB H37Rv modificadas genéticamente para la cuantificación de POA

Las cepas bajo el sistema de represión génica para los genes de interés fueron evaluadas en fase logarítmica (OD_{600} : 1.0). Se tomo como control a la cepa MTB H37Rv:pLJR965, que no reprime ningún gen. Las cepas se evaluaron bajo dos condiciones de tratamiento: inducidas con (ATc +) y no inducidas (ATc -). De la misma manera, bajo el sistema de delección génica se inició la evaluación en cepas cultivadas en fase logarítmica.

Los cultivos modificados genéticamente se diluyeron a un OD_{600} de 0.5. Posteriormente, se alicuotaron 900 μ l de cultivo a 6 tubos estériles de 5 ml y 100 μ l de PZA a una concentración final de 800 μ g/ml. Cada tubo correspondió a un punto de evaluación siendo: 0, 25, 54, 85, 111 y 140 horas. Con la finalidad de normalizar los datos posteriores, se monitorearon los valores de OD_{600} en cada punto de tiempo.

En cada punto de tiempo, se colectaron las células mediante centrifugación a 10,000 x g por 10 min. El sobrenadante se trasladó a otro tubo de 1.5 ml y se inactivó a 95°C por 30 min en un bloque térmico. Cada sobrenadante inactivo se almacenó a -20°C hasta su uso en la reacción de Wayne cuantitativo. Este procedimiento se repitió para las cepas control (MTB H37Rv silvestre y MTB H37Rv:pLJR965).

5.5.6. Evaluación de la susceptibilidad a PZA

Los ensayos de susceptibilidad a PZA se realizaron empleando dos procedimientos, empleando un ensayo de MIC en microplaca y en placas de agar 7H10, empleando diferentes concentraciones de PZA y POA. El ensayo de MIC en microplaca se realizó a un pH de 6.0 solo para las cepas control MTB H37Rv silvestre y MTB H37Rv:pLJR965. Por otro lado, el ensayo de MIC en placas de agar 7H10 se realizó a pH 6.2 para las cepas MTB H37Rv silvestre y MTB H37Rv bajo delección génica.

5.5.6.1. Ensayo de MIC en microplaca.

La cepa control MTB H37Rv silvestre se reactivó sembrándola en caldo 7H9-O-T80 e incubada durante 7 días a 37°C en agitación constante (100 rpm). El cultivo inició con un OD₆₀₀ de 0.05, y finalizó con un valor entre 0.8-1.0. Se tomó 1 ml de cultivo reactivado y se sembró en 9 ml de caldo 7H9-O-T80 (OD₆₀₀ inicial: 0.05-0.10) durante 5 días o hasta llegar a un OD₆₀₀ de 1.0.

Por otro lado, al cuarto día de crecimiento de la cepa silvestre, se preparó la microplaca agregando PZA a diferentes concentraciones en dilución a la mitad desde 12800 hasta 0.0015 µg/ml, de la misma manera para POA desde 6400 hasta 0.2 µg/ml. Las diluciones de antibiótico se prepararon a partir de un stock de 15.1 mg/ml de PZA y 8 mg/ml de POA, el diluyente empleado fue caldo 7H9-O-T80 a pH 6.0. En cada pozo de microplaca se dispuso 100 µl de este medio, excepto en el pozo con la mayor concentración de droga (12800 µg/ml para PZA y 6400 µg/ml para POA).

El quinto día de crecimiento, la cepa silvestre en fase logarítmica se diluyó hasta un OD₆₀₀ final de 0.006 en 10 ml de caldo 7H9-O-T80. Se transfirieron 100 µl de la dilución a la microplaca, que contenía los antibióticos PZA y POA (Figura 6A). Se incubó a 37 °C durante 15 días y se midió el OD₆₀₀ en espectrofotómetro. Finalmente, Los valores de OD₆₀₀ se adecuaron al modelo de Gompertz para la determinación del MIC y NIC.

5.5.6.2. Ensayo de MIC en placas de agar 7H10.

Se reactivaron las cepas MTB H37Rv bajo delección génica previamente criopreservadas. En 5 ml de medio caldo 7H9-O-T80-KH, se inició la siembra con un OD₆₀₀ de 0.05, se incubó a 37 °C en agitación constante (100 rpm) hasta obtener OD₆₀₀ de 1.0. Posteriormente, se tomó 1 ml de la cepa reactivada y se sembró en 9 ml de caldo 7H9-O-T80 hasta un OD₆₀₀ de 0.7. Este procedimiento se repitió para la cepa control MTB H37Rv silvestre, sin embargo, durante su reactivación no se emplearon antibióticos.

Por otro lado, se preparó medio agar 7H10 suplementado con OADC al 10% y PZA a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 y 1600 µg/ml) a pH 6.2. Seguidamente, fueron incubadas a 37°C como control de crecimiento. Finalmente, las cepas en fase logarítmica se diluyeron de manera seriada 1:10 en un volumen final de 1 ml con solución fosfato salina (PBS 1X). Las muestras no diluidas y cada dilución (1:10, 1:100 y 1:1000) se sembraron por triplicado en un volumen de 10 µl en cada placa 7H10-OADC-PZA (Figura 6B). Luego

de 2 semanas de incubación a 37 °C se visualizaron los resultados de crecimiento.

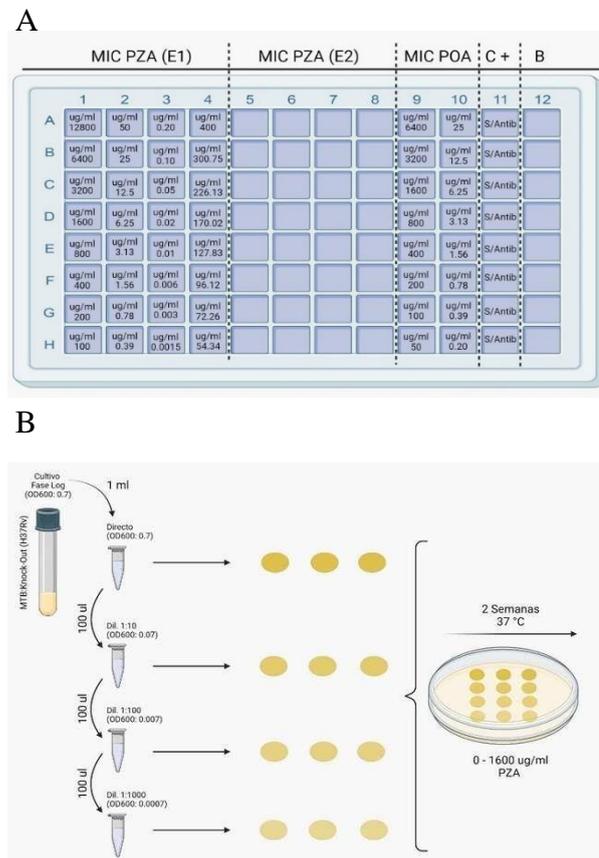


Figura 6. Esquemas de ensayo de susceptibilidad a PZA. A. Ensayo MIC en microplaca. Los valores de concentración indicados en “MIC PZA (E1)” se repiten en las columnas 5, 6, 7 y 8 que corresponden a “MIC PZA (E2)”, E1 y E2: Ensayo 1 y Ensayo 2, C+: Control de cepa H37Rv sin antibiótico, B: Blanco, que consiste en medio de cultivo 7H9, POA y PZA. **B.** Ensayo MIC en placa 7H10. A partir de un cultivo en fase de crecimiento logarítmico se realizaron diluciones 1:10 en un volumen de 1 ml (900 µl de PBS 1X + 100 µl de cepa). Fuente: Elaboración propia, creado en BioRender.com

5.5.7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados en los datos obtenidos en tres réplicas biológicas y tres ensayos técnicos por réplica. Los niveles de represión fueron comparados entre las cepas inducidas y no inducidas mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Además, se comparó el nivel de represión de la cepa control MTB H37Rv silvestre usando los valores de logaritmo de cambio de pliegue (LOG2FC). Para el análisis de las curvas de crecimiento, se midió la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀). Los datos se ajustaron a un modelo logístico que capturó la saturación de la población bacteriana, permitiendo caracterizar la tasa de crecimiento (k) y la capacidad de carga máxima (Y_{max}).

Los valores de concentración acumulada y velocidad inicial de eflujo de POA obtenidas en un intervalo de tiempo definido (0-140 horas) fueron ajustados a un modelo de regresión lineal $y = m(x) + b$. Las pendientes (m) de estas regresiones, que indican la tasa de cambio de la variable dependiente respecto a la variable independiente, se calcularon junto con sus errores estándar (ES). Si el valor t calculado superaba el valor crítico, se rechazaba la hipótesis nula, indicando diferencias significativas en la tasa de cambio entre las cepas modificadas genéticamente y el control silvestre.

Adicionalmente, los valores de OD₄₅₀ se agruparon en los diferentes puntos de tiempo de evaluación (0-140 horas) para realizar comparaciones entre cepas modificadas y no modificadas genéticamente, generando una comparación al 95% de confianza entre ambos grupos a través del estadístico T-student. Respecto al

análisis de susceptibilidad a PZA y POA, se evaluó el porcentaje de crecimiento en función de la concentración logarítmica de estos compuestos para determinar la MIC y la Concentración No Inhibitoria (NIC) para la cepa control MTB H37Rv silvestre. Se utilizó el modelo de Gompertz para ajustar los datos, con un total de 50 puntos para PZA y 32 para POA.

Finalmente, se realizó un ensayo de crecimiento fenotípico en placas de agar 7H10 a pH 6.2, limitado a cepas genéticamente modificadas que mostraron cambios en el eflujo de POA. Las variables analizadas y su operacionalización se muestran en el Anexo 5.

VI. RESULTADOS

6.1. Identificación y selección de genes que codifican bombas de eflujo

La Tabla 4 presenta 79 genes identificados empleando la plataforma Mycobrowser y seleccionados debido a su participación en la resistencia a los siguientes antibióticos: Pirazinamida (PZA), Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), Fluoroquinolonas (FQ), Estreptomina (STR), Ciprofloxacino (CIP), Etambutol (ETH), Bedaquilina (BDQ), Tetraciclina (TET), Kanamicina (KAN), Macrólidos (MAC), Cloranfenicol (CHL), Levofloxacina (LVZ). De este grupo identificamos por literatura 5 genes involucrados en la resistencia a PZA, entre ellos seleccionamos a los genes *Rv0191* y *Rv1258c* (Tabla 5).

De 5 genes asociados con la resistencia a PZA, se eligió a *Rv0191* y *Rv1258* teniendo como criterio la evidencia de la literatura que demuestra su relevancia en la resistencia a la PZA a través de literatura. Se ha reportado que, la sobreexpresión del gen *Rv0191* en MTB cepa H37Ra esta asociada con la resistencia a PZA, mostrando un crecimiento hasta 200 µg/ml.

Adicionalmente, mediante la búsqueda en la base de datos Genome-wide MTB variation (GMTV) se han reportado 406 mutaciones en *Rv0191* en cepas clínicas resistentes a la PZA. Específicamente, 299 mutaciones no sinónimas (GCT/ACT) presentes en el codón 213 y 87 mutaciones sinónimas (GCC/GCT) en el codón 66. Por otro lado, el gen *Rv1258c* presenta mutaciones V219A y S292L en aislados clínicos TB-MDR asociados con la adquisición de resistencia a estreptomina, isoniazida y PZA en MTB cepa H37Ra. La mutación S292L confirió un alto grado

de resistencia a la PZA con un MIC de 800 µg/ml, en comparación a la mutación V219A, con un MIC entre 100 y 200 µg/ml (27,28,65).

Tabla 4. Genes que codifican para bombas de eflujo en MTB H37Rv asociados a resistencia a antibióticos.

Nº	Genes de Bombas de Eflujo en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RV	Familia de Bomba de Eflujo	Resistencia Asociada	Referencia (DOI/enlace)
1	<i>Rv3065 (nmr)</i>	SMR	INH, LVZ	https://doi.org/10.3390/molecules24162873
2	<i>Rv2846c</i>	MFS	INH, ETH	10.1128/AAC.48.7.2415-2423.2004
3	<i>Rv0849</i>	MFS	INH, RIF	10.1128/AAC.06003-11
4	<i>Rv1218c</i>	ABC	INH, RIF	10.1128/AAC.06003-11
5	<i>Rv1687c</i>	ABC	MDR	10.3389/fmicb.2020.575828
6	<i>Rv0559c</i>	ND	PL	10.1016/j.tube.2017.11.002
7	<i>Rv0560c</i>	ND	PL	10.1016/j.tube.2017.11.002
8	<i>Rv0194</i>	ABC	CHL, TET, MAC	10.4172/2161-1068.1000222
9	<i>Rv0342</i>	ABC	RIF, INH, ETH, FQ	10.1111/1574-6968.12401
10	<i>Rv1217c</i>	ABC	INH, RIF	10.1007/s00284-012-0215-3
11	<i>Rv1456c</i>	ABC	RIF, INH, ETH, STR	10.4172/2161-1068.1000222
12	<i>Rv1457c</i>	ABC	RIF, INH, ETH, STR	10.4172/2161-1068.1000222
13	<i>Rv1458c</i>	ABC	RIF, INH, ETH, STR	10.4172/2161-1068.1000222
14	<i>Rv1473</i>	ABC	MAC	https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0207
15	<i>Rv1667c</i>	ABC	MAC, PZA	10.1128/AAC.00940-17
16	<i>Rv1668c</i>	ABC	MAC, PZA	10.1128/AAC.00940-17
17	<i>Rv1686c</i>	ABC	MAC	10.3389/fmicb.2020.575828
18	<i>Rv1819c</i>	ABC	RIF, INH, CHL, TET	10.1038/ja.2015.9
19	<i>Rv2477c</i>	ABC	MAC, FQ	10.1089/mdr.2009.0054
20	<i>Rv2686c</i>	ABC	FQ	10.1128/AAC.48.8.3175-3178.2004
21	<i>Rv2687c</i>	ABC	FQ	10.1128/AAC.48.8.3175-3178.2004
22	<i>Rv2688c</i>	ABC	FQ	10.1128/AAC.48.8.3175-3178.2004
23	<i>Rv2936</i>	ABC	ETH, RIF, TET	10.1042/BJ20020615
24	<i>Rv2937</i>	ABC	ETH, RIF, TET	10.1042/BJ20020615
25	<i>Rv2938</i>	ABC	ETH, RIF, TET	10.1042/BJ20020615
26	<i>Rv3756c</i>	ABC	PZA	10.1128/AAC.00940-17
27	<i>Rv0037c</i>	ABC	RIF	10.1038/ja.2015.9
28	<i>Rv0191</i>	MFS	RIF, PZA	10.1128/AAC.00940-17
29	<i>Rv0783c</i>	ABC	INH, RIF	10.4172/2161-1068.1000222
30	<i>Rv0842</i>	ABC	RIF	10.1038/ja.2015.9
31	<i>Rv0849</i>	ABC	INH, RIF	10.1371/journal.pone.0119013
32	<i>Rv1250</i>	ABC	INH, RIF	10.1038/ja.2015.9
33	<i>Rv1410c</i>	ABC	INH, RIF, TET	10.1128/AAC.45.3.800-804.2001 , https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119013
34	<i>Rv1877</i>	MFS	INH, RIF, TET, KAN	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119013
35	<i>Rv2209</i>	MFS	RIF	https://doi.org/10.1038/ja.2015.9
36	<i>Rv2265</i>	MFS	INH, RIF	https://doi.org/10.1038/ja.2015.9
37	<i>Rv2333c</i>	MFS	RIF, TET	10.1093/jac/dk1510
38	<i>Rv2456c</i>	MFS	INH, RIF	https://doi.org/10.1038/ja.2015.9
39	<i>Rv2459</i>	MFS	INH, RIF	10.4103/ijmr.LJMR 2079 17 , 10.2174/187153031966619009153834
40	<i>Rv2508c</i>	MFS	ND	https://doi.org/10.1007/s00232-017-9982-x
41	<i>Rv2846c</i>	MFS	INH, RIF, FQ	10.4103/ijmr.LJMR 2079 17
42	<i>Rv3239c</i>	MFS	INH, RIF	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119013
43	<i>Rv3728</i>	MFS	INH, RIF, ETH	https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0054
44	<i>Rv2836c</i>	MATE	ND	10.1128/JB.01724-12
45	<i>Rv0676c</i>	RND	TET	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102135
46	<i>Rv0677c</i>	RND	TET	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102135
47	<i>Rv2942</i>	RND	INH	10.4172/2161-1068.1000222
48	<i>Rv3008</i>	MFS	PZA	doi/10.1128/AAC.00940-17
49	<i>Rv2994</i>	MFS	INH	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119013
50	<i>Rv1634</i>	MFS	FQ	https://scielosp.org/pdf/rsap/2018.v20n4/491-497/es
51	<i>Rv1519 (BacA)</i>	ABC	ND	https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(21)00123-2
52	<i>Rv3085 (Mmr)</i>	SMR	ND	https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(21)00123-2
53	<i>Rv0878c (MmpL5)</i>	RND	ND	https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(21)00123-2
54	<i>Rv0678</i>	ND	BDQ	https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(21)00123-2
55	<i>Rv3066</i>	ND	MDR	https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(21)00123-2
56	<i>Rv3762</i>	ABC	RIF	https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.575828/full
57	<i>Rv3763</i>	ABC	RIF	https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.575828/full
58	<i>Rv3765</i>	ABC	RIF	https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.575828/full
59	<i>Rv1683c</i>	ND	RIF, CIP	https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.575828/full
60	<i>Rv1219</i>	ND	Químicos tóxicos	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24424575/
61	<i>Rv0342</i>	ND	INH, ETH	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15752203/
62	<i>Rv1747</i>	ND	INH	https://academic.oup.com/femsre/article/24/4/449/510478
63	<i>Rv0933</i>	ND	INH, RIF, CIP, ETH	https://www.ijmyco.org/article.asp?issn=2212-
64	<i>Rv1348</i>	ND	ND	https://academic.oup.com/femsre/article/24/4/449/510478
65	<i>Rv1349</i>	ND	MDR	https://academic.oup.com/femsre/article/24/4/449/510478
66	<i>Rv1272</i>	ND	MDR	https://academic.oup.com/femsre/article/24/4/449/510478
67	<i>Rv1273</i>	ND	MDR	https://academic.oup.com/femsre/article/24/4/449/510478
68	<i>Rv3000</i>	ND	MDR	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23561272/
69	<i>Rv1463</i>	ABC	ND	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19451293/
70	<i>Rv1687</i>	ABC	Triclosan	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27193696/
71	<i>Rv1747</i>	ABC	MDR	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2715638/
72	<i>Rv2136c</i>	ND	RIF	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15057575/
73	<i>Rv0677c (MmpS5)</i>	RND	INH	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29050760/
74	<i>Rv0676c (MmpL5)</i>	RND	INH	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29050760/
75	<i>Rv1258c (TAP)</i>	ABC	PZA, INH, STR	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6389670/pdf/fmicb-10-00216.pdf doi: 10.3389/fmicb.2019.00216
76	<i>Rv0507 (MmpL2)</i>	RND	INH, RIF	doi: 10.1016/j.tube.2015.01.005
77	<i>Rv1634</i>	MFS	NOR, CIP (FQ), RIF	doi: 10.1371/journal.pone.0117771
78	<i>Rv1877</i>	MFS	RIF	doi: 10.1016/j.tube.2015.01.005
79	<i>Rv1819</i>	MFS	ND	doi: 10.1016/j.tube.2015.01.006

Tabla 5. Genes asociados a resistencia a PZA.

Nº	Gen (MTB H37Rv)	Gen Esencial	Resistencia Asociada	Familia de Bomba de Eflujo	ID Genbank	DOI, enlace
1	Rv0191	NO	PZA, RIF	MFS	886770	10.1128/AAC.00940-17
2	Rv1667/68c	NO	PZA, MAC	ABC	885518	10.1128/AAC.00940-17
3	Rv3756c	NO	PZA	ABC	885534	10.1128/AAC.00940-17
4	Rv3008	NO	PZA	MFS	888530	10.1128/AAC.00940-17
5	Rv1258c	NO	PZA, INH, STR	ABC	887056	10.3389/fmicb.2019.00216

6.2. Represión génica de *Rv0191* y *Rv1258c* mediante CRISPRi en MTB H37Rv

6.2.1. Implementación del sistema CRISPRi en *E. coli* y MTB H37Rv

El plásmido pLJR965 se obtuvo de manera íntegra a una concentración de 125 ng/µl, indicando un tamaño esperado de 8631 pb. Se visualiza la conformación circular, lineal y superenrollada del plásmido (Figura 7, carril 3), 1000 ng de plásmido previamente digerido mediante la enzima BsmBI, destacándose la conformación lineal que corrobora la adecuada digestión enzimática (Figura 7, carril 2). La purificación del plásmido linealizado mediante gel obtuvo ratios A260/280 y A260/230 de 1.79 y 2.11, respectivamente.

Los plásmidos pLJR965 recombinantes sgRNA de *Rv0191*, *Rv1258c* y *groEL* (control positivo de represión génica) propagados en *E. coli* NovaBlue, se contabilizaron luego de un cultivo de 24 horas, obteniendo 946, 632 y 870 colonias, respectivamente, y solo 10 colonias del control autoligado. La probabilidad calculada de obtener un autoligado en cada caso fue 1 cada 95, 63 y 87 colonias, respectivamente (Figura 8).

Los resultados de secuenciación demuestran la correcta incorporación de las secuencias del sgRNA para cada gen en el plásmido pLJR965, de esta manera

para sgRNA:*Rv0191* 8 clonas presentaron la secuencia esperada, sin mutaciones. De la misma manera, el sgRNA:*Rv1258c* en 4 clonas evaluadas mantiene la secuencia esperada sin mutaciones (Figura 9).

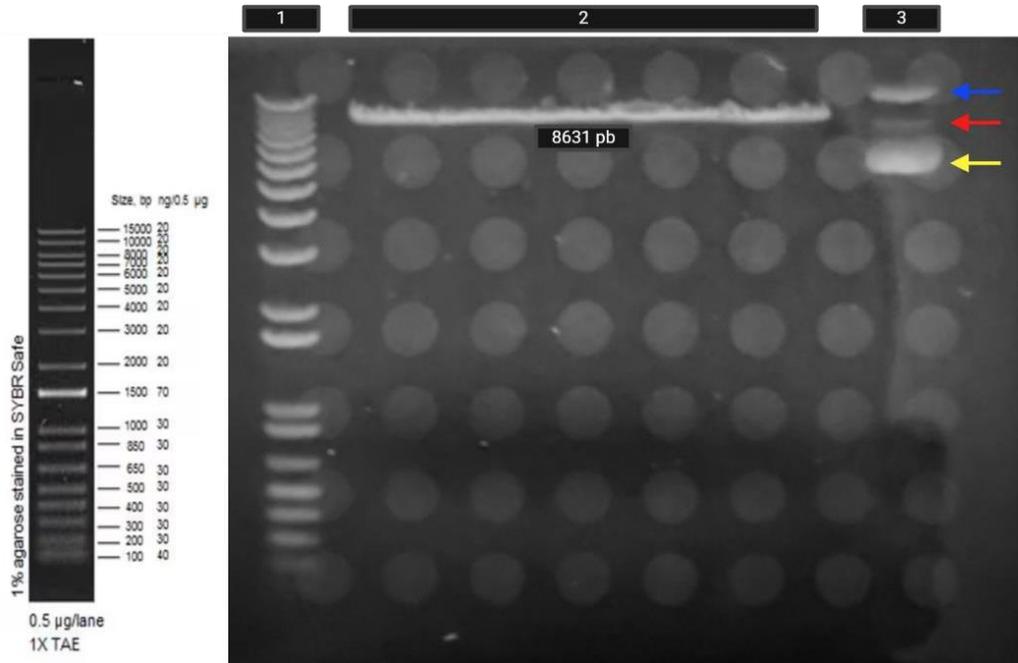


Figura 7. Linealización de plásmido pLJR965 digerido con 5U de enzima BsmBI. Electroforesis de agarosa al 0.8 % en TAE 1X. **Carril 1:** Marcador de ADN 1 kb Plus (Invitrogen, Catálogo #10787018), **Carril 2:** Plásmido pLJR965 digerido, se muestra la conformación lineal. **Carril 3:** Plásmido pLJR965 sin digerir, la flecha azul indica la conformación circular; la roja, la conformación lineal y la amarilla, la conformación superenrollada. Fuente: Elaboración propia.

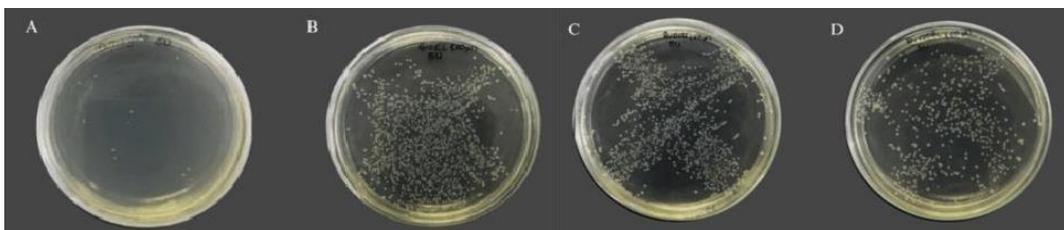


Figura 8. Clonación del sistema CRISPRi en *E. coli* NovaBlue. **A.** Control de autoligado. **B.** *E. coli* NovaBlue recombinante pLJR965:*groEL*. **C.** *E. coli* NovaBlue recombinante pLJR965:*Rv0191*. **D.** *E. coli* NovaBlue recombinante pLJR965:*Rv1258c*. Fuente: Elaboración propia.

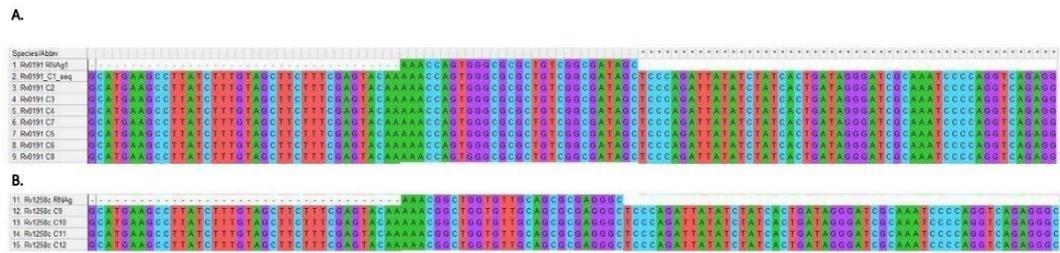


Figura 9. Alineamiento múltiple del resultado de secuenciación de SANGER.
A. Se muestran las secuencias de las clonas C1 – C8 para el plásmido recombinante pLJR965:sgRNA *Rv0191* y la secuencia esperada “Rv0191 RNAg1”. **B.** Secuencias de las clonas C9 – C12 para el plásmido recombinante pLJR965:sgRNA *Rv1258c* y la secuencia esperada “Rv1258c RNAg”. El análisis se realizó mediante el software MEGA 11.

El crecimiento de MTB H37Rv electroporada con el plásmido recombinante pLJR965:sgRNA *Rv0191* y pLJR965:sgRNA *Rv1258c* fue evidente en ausencia y presencia del antibiótico kanamicina, sin embargo, en ausencia del antibiótico el crecimiento se muestra extenso y denso con colonias confluentes, indicando un crecimiento sin restricción (Figura 10).

Por otro lado, en presencia de kanamicina en una siembra directa se observan pequeñas colonias distribuidas por toda la placa, con una menor densidad en comparación a la placa sin antibiótico indicando la presencia solo de colonias que han electroporado con éxito el vector. Con una dilución del inóculo 1:10 y 1:100, la concentración bacteriana se reduce considerablemente en ambos casos (Imágenes no mostradas).

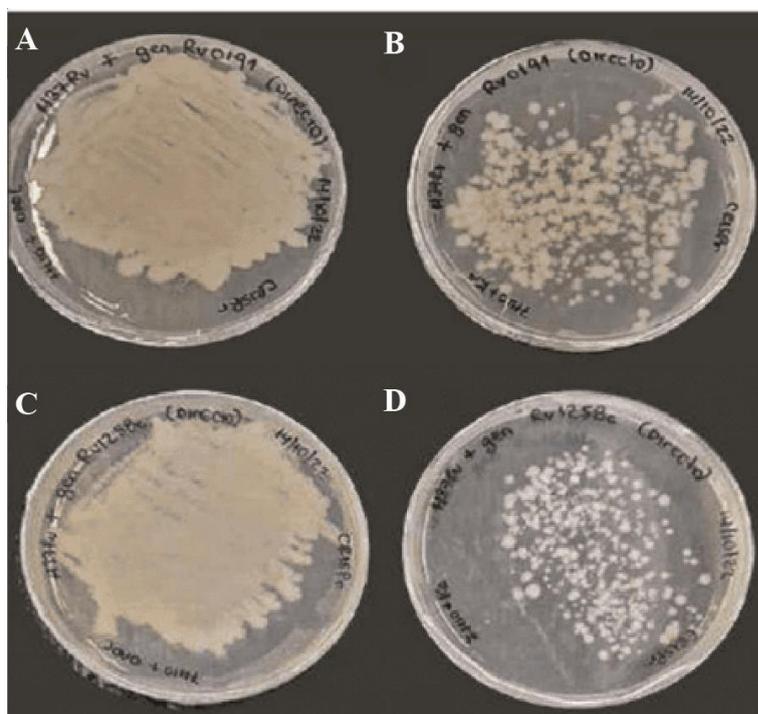


Figura 10. Electroporación de pLJR965:sgRNA *Rv0191* y *Rv1258c*. A-C. Medio 7H10 sin antibiótico de selección (kanamicina). **B-D.** Medio 7H10 con kanamicina (25 µg/ml). **A-B.** MTB H37Rv sgRNA:*Rv0191*. **C-D.** MTB H37Rv sgRNA:*Rv1258c*.

La verificación de la incorporación del sgRNA involucró la extracción de ADN de MTB H37Rv recombinante previamente seleccionadas con kanamicina. Dado que el plásmido pLJR965 contiene la región L5 attP y la L5 integrasa, es posible la integración del plásmido al genoma de MTB, confiriendo resistencia a kanamicina e introduciendo el sgRNA para cada gen de interés (*Rv0191* y *Rv1258c*) lo que permite su transcripción.

En ese sentido evidenciamos en el genoma de MTB la presencia del sgRNA *Rv0191* y *Rv1258c* y una secuencia parcial del plásmido pLJR965 que incluye 1 nucleótido en el sentido positivo (5'...CGTCTC(N)₁...3') y 5 nucleótidos en el sentido negativo (3'...GCAGAG(N)₅...5'). Estas secuencias corresponden a la

región de corte para la enzima BsmBI presentes en el vector para insertar los sgRNAs. Los nucleótidos presentes en el genoma luego de los sitios de restricción corresponden a una guanina (G) en el sentido de 5' a 3' y cinco adeninas (A) en el sentido de 3' a 5'. Estos nucleótidos se presentan contorneados de rojo en la figura 11.



Figura 11. Alineación de los resultados de la secuenciación del ADN_g en MTB. Secuencias sombreadas en celeste, secuencia *reverse* que forma el sgRNA para *Rv0191* y *Rv1258c*; en amarillo, secuencia *forward*; en naranja, sección de la secuencia amplificada del ADN genómico que flanquea la presencia del sgRNA. Las secuencias etiquetadas como A221221-016_A09, C09, I09 y K09 corresponden a los resultados de secuenciación proporcionados por Psomagen.

6.2.2. Inducción de la represión y evaluación de la expresión génica

Las tablas 6 y 7 presentan datos sobre la concentración y pureza del ARN extraído de cepas de MTB H37Rv bajo dos condiciones experimentales: con el sistema de represión inducido (ATc +) y no inducido (ATc -) y a través de 3 ensayos para 3 réplicas biológicas. Para el gen *Rv0191* reprimido se obtuvo en promedio 440 ng/μl (DS: 317), para el gen *Rv1258c* obtuvimos 407 ng/μl (DS: 271), para el gen *groEL* obtuvimos 828 ng/μl (DS: 598) y para el control H37Rv:pLJR965, 506 ng/μl (DS: 322). Los valores de pureza A260/280 fueron 1.85 (DS: 0.05), 1.82 (DS: 0.05), 1.89 (DS: 0.12) y 1.85 (DS: 0.05)

respectivamente, adicionalmente los valores de pureza A260/230 fueron 1.86 (DS: 0.25), 1.81 (DS: 0.23), 1.90 (DS: 0.31) y 2.00 (DS: 0.07) respectivamente.

Bajo el sistema no inducido, obtuvimos valores de concentración de ARN para el gen *Rv0191* en promedio 382 ng/μl (DS: 207), para el gen *Rv1258c* obtuvimos 851 ng/μl (DS: 446), para el gen *groEL* obtuvimos 718 ng/μl (DS: 427) y para el control H37Rv:pLJR965, 475 ng/μl (DS: 333). Los valores de pureza A260/280 fueron 1.84 (DS: 0.06), 1.79 (DS: 0.14), 1.91 (DS: 0.06) y 1.85 (DS: 0.09) respectivamente, adicionalmente los valores de pureza A260/230 fueron 1.94 (DS: 0.13), 1.79 (DS: 0.41), 1.94 (DS: 0.17) y 1.96 (DS: 0.08) respectivamente. El ARN extraído, tratado y purificado mediante electroforesis demostró tener una integridad adecuada evidenciando bandas que corresponden al ARN ribosomal de MTB, ARNr 23S, 16S y 5S (Figura 12).

Tabla 6. Concentración de ARN crudo extraído a partir de cepas MTB H37Rv bajo el sistema de represión génica inducido (ATc +)

Replica Biológica	Tratamiento	Gen Target	Concentración de ARN (ng/μl)			Pureza de ARN (A260/280)			Pureza de ARN (A260/230)		
			Promedio (n, 3)	DS	IC 95 %	Promedio (n, 3)	DS	IC 95 %	Promedio (n, 3)	DS	IC 95 %
1	ATc +	<i>Rv0191</i>	695	17,600	651 - 739	1,81	0,006	1,80 - 1,83	1,99	0,010	1,97 - 2,01
2	ATc +	<i>Rv0191</i>	84,4	0,404	83,4 - 85,4	1,83	0,006	1,81 - 1,84	1,58	0,006	1,57 - 1,60
3	ATc +	<i>Rv0191</i>	540	12,000	511 - 570	1,91	0,006	1,89 - 1,92	2,02	0,015	1,99 - 2,05
1	ATc +	<i>Rv1258c</i>	600	7,300	582 - 618	1,86	0,006	1,84 - 1,87	2,02	0,006	2,00 - 2,03
2	ATc +	<i>Rv1258c</i>	97,2	0,557	95,8 - 98,6	1,76	0,010	1,74 - 1,78	1,61	0,000	1,61 - 1,61
3	ATc +	<i>Rv1258c</i>	524	8,890	502 - 546	1,83	0,010	1,81 - 1,85	1,99	0,000	1,99 - 1,99
1	ATc +	<i>groEL</i>	1321	19,200	1274 - 1369	1,93	0,015	1,89 - 1,96	2,04	0,012	2,01 - 2,07
2	ATc +	<i>groEL</i>	163	0,577	162 - 165	1,76	0,006	1,75 - 1,78	1,55	0,015	1,52 - 1,59
3	ATc +	<i>groEL</i>	1001	10,300	976 - 1027	1,98	0,006	1,97 - 2,00	2,11	0,006	2,09 - 2,12
1	ATc +	H37Rv:pLJR965	854	20,300	803 - 904	1,86	0,006	1,85 - 1,88	2,08	0,036	1,99 - 2,17
2	ATc +	H37Rv:pLJR965	217	0,289	216 - 217	1,80	0,006	1,79 - 1,82	1,95	0,006	1,93 - 1,96
3	ATc +	H37Rv:pLJR965	448	2,690	441 - 454	1,9	0,006	1,89 - 1,92	1,97	0,006	1,95 - 1,98

Tabla 7. Concentración de ARN crudo extraído a partir de cepas MTB H37Rv bajo el sistema de represión génica no inducido (ATc -)

Replica Biológica	Tratamiento	Gen Target	Concentración de ARN (ng/μl)			Pureza de ARN (A260/280)			Pureza de ARN (A260/230)		
			Promedio (n, 3)	DS	IC 95 %	Promedio (n, 3)	DS	IC 95 %	Promedio (n, 3)	DS	IC 95 %
1	ATc -	<i>Rv0191</i>	488	17,300	445 - 531	1,77	0,017	1,73 - 1,81	1,99	0,010	1,97 - 2,01
2	ATc -	<i>Rv0191</i>	143	0,500	142 - 145	1,86	0,006	1,84 - 1,87	1,79	0,006	1,78 - 1,81
3	ATc -	<i>Rv0191</i>	514	3,090	507 - 522	1,88	0,017	1,84 - 1,92	2,03	0,010	2,01 - 2,05
1	ATc -	<i>Rv1258c</i>	1359	13,100	1327 - 1392	1,91	0,006	1,90 - 1,93	2,09	0,010	2,07 - 2,11
2	ATc -	<i>Rv1258c</i>	670	0,520	657 - 683	1,63	0,006	1,62 - 1,65	1,32	0,006	1,30 - 1,33
3	ATc -	<i>Rv1258c</i>	524	5,430	510 - 537	1,82	0,006	1,81 - 1,84	1,96	0,017	1,92 - 2,00
1	ATc -	<i>groEL</i>	1047	7,570	1028 - 1066	1,91	0,006	1,90 - 1,93	2,01	0,000	2,01 - 2,01
2	ATc -	<i>groEL</i>	235	0,551	234 - 237	1,85	0,006	1,84 - 1,87	1,75	0,006	1,73 - 1,76
3	ATc -	<i>groEL</i>	871	14,300	835 - 906	1,97	0,006	1,96 - 1,99	2,07	0,010	2,05 - 2,09
1	ATc -	H37Rv:pLJR965	835	0,208	834 - 835	1,93	0,006	1,91 - 1,94	2,05	0,012	2,02 - 2,08
2	ATc -	H37Rv:pLJR965	179	0,379	178 - 180	1,75	0,006	1,74 - 1,77	1,90	0,006	1,88 - 1,91
3	ATc -	H37Rv:pLJR965	410	3,13	403 - 418	1,86	0,000	1,86 - 1,86	1,94	0,006	1,92 - 1,95

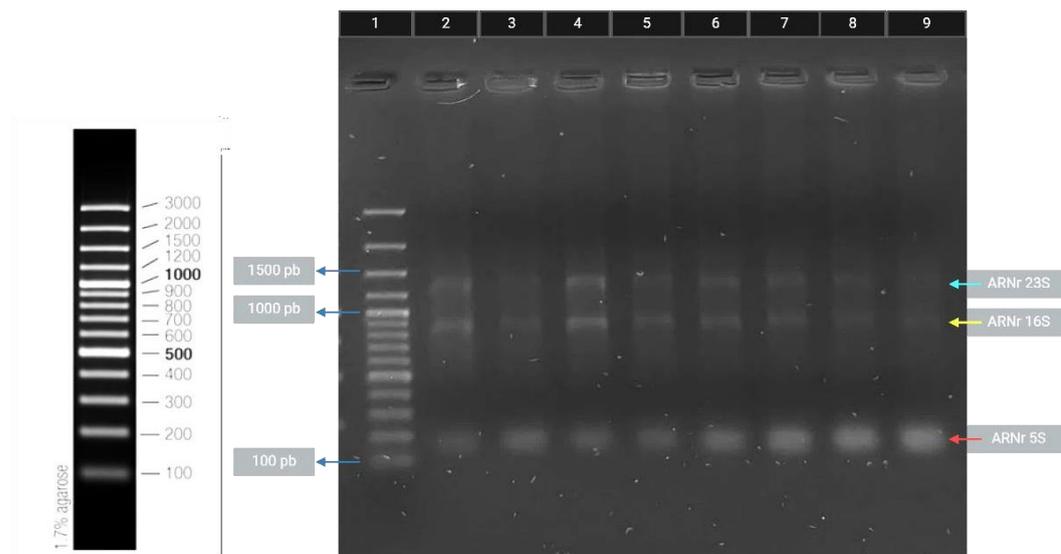


Figura 12. Electroforesis de agarosa 1.5 % del ARN tratado con ADNasa I y purificado. Carril 1: Marcador 100 pb plus (Thermo Scientific, Catálogo #MAN0013010). **Carril 2-9:** ARN tratado y purificado, las flechas indican el ARN ribosomal (ARNr) presente 23S, 16S y 5S respectivamente. **Carril 2-4:** MTB H37Rv pLJR965:sgRNA *Rv0191* ATc + (Replica Biológica 1, 2 y 3 respectivamente), **Carril 5-7:** MTB H37Rv pLJR965:sgRNA *Rv1258c* ATc + (Replica Biológica 1, 2 y 3 respectivamente). **Carril 8:** MTB H37Rv pLJR965:sgRNA *groEL* ATc + (Replica Biológica 2). **Carril 9:** MTB H37Rv pLJR965 ATc + (Ctrl Negativo). **Notas:** Ctrl: Control, ATc: Anhidrotetraciclina. +: Inducción positiva al sistema de represión.

El porcentaje de eficiencia de los cebadores empleados para el análisis de expresión génica, fueron mayores a 94% (Tabla 8). Los valores de ciclo de threshold (Ct) promedio para el gen constitutivo (*sigA*) fueron 18.81 y 18.11, para el gen blanco *Rv0191* fueron 21.35 y 24.08, para *Rv1258c* fueron 21.45 y 23.37 para la condición no inducida (ATc -) e inducida (ATc +), respectivamente. El control negativo de represión (MTB H37Rv:pLJR965) obtuvo valores de 19.86 y 20.87, y el control de represión, *groEL*, 16.60 y 24.92 (Tablas 9-12).

Tabla 8. Porcentajes de eficiencia calculados para los cebadores empleados en el análisis de expresión génica.

Gen Blanco	Pendiente (m)	Porcentaje de Eficiencia (%)
<i>Rv0191</i>	-3,33	99,81
<i>Rv1258c</i>	-3,38	97,57
<i>groEL</i>	-3,45	95,92
<i>SigA</i>	-3,47	94,07

Nota. Los porcentajes de eficiencia son calculados bajo la siguiente ecuación $(10^{\frac{-1}{m}} - 1) \times 100$. La concentración final de cebadores fue 0.1 μ M.

Se obtuvo una reducción del nivel de ARNm relativo del 91.09 % en promedio (n, 9) para el sgRNA:*Rv0191*, con un valor de 0.090 bajo represión génica en comparación de 1.010 sin inducción a represión. Para el sgRNA:*Rv1258c* se obtuvo 80.5%, con un valor de 0.195 en comparación de 1.000 sin inducción. De acuerdo a lo esperado, el sgRNA:*groEL* presentó un valor de 0.003 bajo represión frente a 1.000 bajo condición no inducida (Tabla 13).

Gráficamente podemos evidenciar estos resultados en la Figura 13, donde la comparación para los sgRNA:*Rv0191*, *Rv1258c* y *groEL* (ATc+ vs ATc-) muestran una diferencia significativa entre ambas condiciones con datos p valor de 0.0017, 0.0145 y 0.0007, respectivamente. Por otro lado, la cepa H37Rv:pLJR965, no mostró una diferencia significativa, p valor = 0.2059.

Por otro lado, los valores promedio del LOG2FC experimental fueron los siguientes, para sgRNA:*Rv0191*: -3.59 (n, 9) DS: 0.66, IC 95 %: -4.10 – -3.08, para sgRNA:*Rv1258c*: -2.46 (n, 9) DS: 0.59, IC 95 %: -2.91 – -2.01, para sgRNA:*groEL*: -8.51 (n, 6) DS: 0.45, IC 95 %: -8.98 – -8.04 y para el control

H37Rv:pLJR965: 0.27 (n, 9) DS: 0.30, IC 95 %: 0.04 – 0.50. La comparación estadística indica que el sistema bajo represión génica es significativamente diferente al control, con datos p valor de 0.0002, 0.0319 y menor a 0.0001, respectivamente (Figura 14).

Finalmente, en conjunto el fold de represión calculado a partir de la división de los niveles de ARNm del sistema no inducido entre el sistema inducido (ATc - / ATc +), fueron 13.33 (n, 9 – DS: 6.52, IC 95 %: 8.30 – 18.30) para el gen *Rv0191*, 5.94 (n, 9 – DS: 2.55, IC 95 %: 3.98 – 7.90) para el gen *Rv1258c*, 379 (n, 6 – DS: 117, IC 95 %: 255 – 502) para el gen *groEL* y 0.85 en promedio (n, 9 – DS: 0.17, IC 95 %: 0.72 – 0.974) para H37Rv:pLJR965, gráficamente se observan los datos en la Figura 15. Al igual que el nivel de ARNm y LOG2FC, la comparación estadística empleando Kruskal-Wallis indicó que existen diferencias significativas entre los grupos reprimidos frente a la cepa control, indicando datos de valor p de 0.0002 para el sgRNA:*Rv0191*, 0.0319 para el sgRNA:*Rv1258c* y menor a 0.0001 para el sgRNA:*groEL* (Figura 15).

Tabla 9. Valores de ciclo de threshold y análisis de expresión empleando el método de Livak en la réplica biológica 1.

Muestra	Ensayo	Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio	Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio	dCT	ddCT	2 ^{-(ddCT)}
Rv0191 ATc -	1	SigA	- ATc	19,10	19,55	19,33	Rv0191	- ATc	21,84	21,87	21,86	2,53	0,00	1,002
	2	SigA	- ATc	19,22	19,02	19,12	Rv0191	- ATc	21,71	21,59	21,65	2,53	0,00	1,002
	3	SigA	- ATc	18,68	19,69	19,19	Rv0191	- ATc	21,66	21,79	21,73	2,54	0,01	0,995
Rv0191 ATc +	1	SigA	+ ATc	17,88	17,97	17,93	Rv0191	+ ATc	23,48	23,77	23,63	5,70	3,17	0,111
	2	SigA	+ ATc	17,66	17,87	17,77	Rv0191	+ ATc	23,56	23,47	23,52	5,75	3,22	0,108
	3	SigA	+ ATc	17,92	18,06	17,99	Rv0191	+ ATc	23,28	23,26	23,27	5,28	2,75	0,149
Rv1258c ATc -	1	SigA	- ATc	20,09	20,37	20,23	Rv1258c	- ATc	22,32	22,44	22,38	2,15	-0,11	1,079
	2	SigA	- ATc	19,69	19,98	19,84	Rv1258c	- ATc	22,25	22,04	22,15	2,31	0,05	0,966
	3	SigA	- ATc	19,75	20,01	19,88	Rv1258c	- ATc	22,23	22,17	22,20	2,32	0,06	0,959
Rv1258c ATc +	1	SigA	+ ATc	18,46	18,29	18,38	Rv1258c	+ ATc	23,16	23,00	23,08	4,71	2,45	0,184
	2	SigA	+ ATc	18,25	18,15	18,20	Rv1258c	+ ATc	23,00	23,01	23,01	4,81	2,55	0,171
	3	SigA	+ ATc	18,23	18,46	18,35	Rv1258c	+ ATc	22,97	22,93	22,95	4,61	2,35	0,197
MTB:pLJR965 ATc -	1	SigA	- ATc	18,59	18,89	18,74	Rv1258c	- ATc	21,96	21,76	21,86	3,12	-0,22	1,165
	2	SigA	- ATc	18,24	18,36	18,30	Rv1258c	- ATc	21,86	21,68	21,77	3,47	0,13	0,914
	3	SigA	- ATc	18,19	18,53	18,36	Rv1258c	- ATc	21,70	21,88	21,79	3,43	0,09	0,940
MTB:pLJR965 ATc +	1	SigA	+ ATc	18,8	18,04	18,04	Rv1258c	+ ATc	21,29	21,12	21,21	3,17	-0,18	1,129
	2	SigA	+ ATc	17,89	17,83	17,86	Rv1258c	+ ATc	20,78	20,83	20,81	2,95	-0,40	1,315
	3	SigA	+ ATc	17,96	18,12	18,04	Rv1258c	+ ATc	20,57	20,67	20,62	2,58	-0,76	1,693

Tabla 10. Valores de ciclo de threshold y análisis de expresión empleando el método de Livak en la réplica biológica 2.

Muestra	Ensayo	Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio	Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio	dCT	ddCT	2 ^{-(ddCT)}
Rv0191 ATc -	1	SigA	- ATc	18,17	18,48	18,33	Rv0191	- ATc	21,76	21,71	21,74	3,41	-0,34	1,263
	2	SigA	- ATc	18,39	17,56	17,98	Rv0191	- ATc	21,84	21,93	21,89	3,91	0,16	0,893
	3	SigA	- ATc	18,42	17,58	18,00	Rv0191	- ATc	21,90	21,94	21,92	3,92	0,17	0,887
Rv0191 ATc +	1	SigA	+ ATc	17,27	17,10	17,19	Rv0191	+ ATc	24,18	24,12	24,15	6,97	3,22	0,107
	2	SigA	+ ATc	17,01	17,35	17,18	Rv0191	+ ATc	24,35	24,07	24,21	7,03	3,28	0,103
	3	SigA	+ ATc	17,05	17,15	17,10	Rv0191	+ ATc	24,30	24,27	24,29	7,19	3,44	0,092
Rv1258c ATc -	1	SigA	- ATc	17,50	17,60	17,55	Rv1258c	- ATc	21,46	21,75	21,61	4,06	-0,18	1,133
	2	SigA	- ATc	17,74	17,05	17,40	Rv1258c	- ATc	21,60	21,74	21,67	4,28	0,04	0,973
	3	SigA	- ATc	17,30	17,20	17,25	Rv1258c	- ATc	21,55	21,70	21,63	4,38	0,14	0,908
Rv1258c ATc +	1	SigA	+ ATc	17,87	17,72	17,80	Rv1258c	+ ATc	23,62	23,66	23,64	5,85	1,61	0,328
	2	SigA	+ ATc	17,79	17,33	17,56	Rv1258c	+ ATc	23,61	23,56	23,59	6,03	1,79	0,289
	3	SigA	+ ATc	17,20	17,32	17,26	Rv1258c	+ ATc	23,55	23,66	23,61	6,35	2,11	0,232
MTB:pLJR965 ATc -	1	SigA	- ATc	18,30	18,29	18,30	Rv1258c	- ATc	21,69	21,54	21,615	3,32	-0,02	1,014
	2	SigA	- ATc	18,84	17,87	18,36	Rv1258c	- ATc	21,36	21,30	21,33	2,98	-0,37	1,288
	3	SigA	- ATc	17,95	18,33	18,14	Rv1258c	- ATc	21,29	21,29	21,29	3,15	-0,19	1,141
MTB:pLJR965 ATc +	1	SigA	+ ATc	17,83	17,73	17,78	Rv1258c	+ ATc	20,99	20,99	20,99	3,21	-0,13	1,094
	2	SigA	+ ATc	17,51	17,73	17,62	Rv1258c	+ ATc	20,83	20,02	20,43	2,81	-0,54	1,449
	3	SigA	+ ATc	17,82	17,71	17,77	Rv1258c	+ ATc	20,63	20,65	20,64	2,88	-0,47	1,380

Tabla 11. Valores de ciclo de threshold y análisis de expresión empleando el método de Livak en la réplica biológica 3.

Muestra	Ensayo	Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio	Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio	dCT	ddCT	2 ^{-(ddCT)}
Rv0191 ATc -	1	SigA	- ATc	19,23	19,13	19,18	Rv0191	- ATc	20,46	20,43	20,45	1,27	0,09	0,942
	2	SigA	- ATc	19,69	19,37	19,53	Rv0191	- ATc	20,52	20,42	20,47	0,94	-0,24	1,180
	3	SigA	- ATc	19,15	19,19	19,17	Rv0191	- ATc	20,29	20,71	20,50	1,33	0,15	0,900
Rv0191 ATc +	1	SigA	+ ATc	18,96	18,90	18,93	Rv0191	+ ATc	24,49	24,61	24,55	5,62	4,44	0,046
	2	SigA	+ ATc	19,06	18,74	18,90	Rv0191	+ ATc	24,59	24,37	24,48	5,58	4,40	0,047
	3	SigA	+ ATc	19,02	19,10	19,06	Rv0191	+ ATc	24,60	24,72	24,66	5,60	4,42	0,047
Rv1258c ATc -	1	SigA	- ATc	18,36	18,36	18,36	Rv1258c	- ATc	20,43	20,62	20,53	2,17	0,19	0,879
	2	SigA	- ATc	18,75	18,61	18,68	Rv1258c	- ATc	20,44	20,39	20,42	1,74	-0,24	1,184
	3	SigA	- ATc	18,32	18,50	18,41	Rv1258c	- ATc	20,55	20,34	20,45	2,04	0,06	0,961
Rv1258c ATc +	1	SigA	+ ATc	18,25	18,39	18,32	Rv1258c	+ ATc	23,50	23,61	23,56	5,24	3,26	0,105
	2	SigA	+ ATc	18,47	18,37	18,42	Rv1258c	+ ATc	23,75	23,53	23,64	5,22	3,24	0,106
	3	SigA	+ ATc	18,25	18,63	18,44	Rv1258c	+ ATc	23,31	23,17	23,24	4,80	2,82	0,141
MTB:pLJR965 ATc -	1	SigA	- ATc	19,97	19,9	19,94	Rv1258c	- ATc	21,85	21,86	21,855	1,92	-0,03	1,019
	2	SigA	- ATc	20,01	20,04	20,03	Rv1258c	- ATc	21,67	21,76	21,72	1,69	-0,26	1,195
	3	SigA	- ATc	19,39	19,68	19,54	Rv1258c	- ATc	21,83	21,70	21,77	2,23	0,28	0,822
MTB:pLJR965 ATc +	1	SigA	+ ATc	18,34	17,99	18,165	Rv1258c	+ ATc	20,09	19,83	19,96	1,80	-0,15	1,111
	2	SigA	+ ATc	18,26	18,01	18,14	Rv1258c	+ ATc	19,89	19,92	19,91	1,77	-0,18	1,130
	3	SigA	+ ATc	18,02	18,16	18,09	Rv1258c	+ ATc	19,85	19,76	19,81	1,72	-0,23	1,174

Tabla 12. Valores de ciclo de threshold y análisis de expresión empleando el método de Livak en la réplica biológica 1 y 2 para el gen blanco *groEL*.

Muestra	Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio	Gen Target	Condición	CT1	CT2	Promedio	dCT	ddCT	2 ^{-(ddCT)}
groEL ATc -	SigA	- ATc	18,53	19,04	18,79	groEL	- ATc	15,19	15,18	15,19	-3,60	-0,40	1,323
	SigA	- ATc	18,67	18,04	18,36	groEL	- ATc	15,63	15,95	15,79	-2,57	0,63	0,645
	SigA	- ATc	19,31	19,16	19,24	groEL	- ATc	15,93	15,69	15,81	-3,43	-0,23	1,171
groEL ATc +	SigA	+ ATc	18,11	18,32	18,22	groEL	+ ATc	24,25	23,51	23,88	5,67	8,86	0,002
	SigA	+ ATc	20,14	17,71	18,93	groEL	+ ATc	24,36	23,83	24,10	5,17	8,37	0,003
	SigA	+ ATc	18,84	18,53	18,69	groEL	+ ATc	24,35	24,15	24,25	5,57	8,76	0,002
groEL ATc -	SigA	- ATc	19,28	19,20	19,24	groEL	- ATc	17,99	18,00	18,00	-1,25	0,14	0,908
	SigA	- ATc	19,60	19,35	19,48	groEL	- ATc	17,90	17,88	17,89	-1,59	-0,20	1,149
	SigA	- ATc	19,31	19,61	19,46	groEL	- ATc	18,17	18,10	18,14	-1,33	0,06	0,959
groEL ATc +	SigA	+ ATc	18,95	19,25	19,10	groEL	+ ATc	26,63	26,07	26,35	7,25	8,64	0,003
	SigA	+ ATc	18,78	18,70	18,74	groEL	+ ATc	25,99	25,94	25,97	7,23	8,61	0,003
	SigA	+ ATc	18,92	18,98	18,95	groEL	+ ATc	25,44	25,65	25,55	6,60	7,98	0,004

Tabla 13. Nivel de ARNm relativo en cepas bajo represión génica.

Gen Blanco	Sistema Inducido, Promedio (n: 9)	IC 95%	DS	Sistema no Inducido, Promedio (n: 9)	IC 95%	DS	Nivel de Represión	IC 95%	DS
<i>Rv0191</i>	0.090	0,060 - 0,118	0.036	1.010	0,906 - 1,110	0.132	13.33	8.30 – 18.30	6,52
<i>Rv1258c</i>	0.195	0,136 - 0,254	0.077	1.000	0,925 - 1,080	0.104	5.94	3.98 – 7.90	2,55
<i>groEL</i> (Ctrl KD)	0.003	0,002 - 0,004	0.019	1.000	0,908 - 1,100	0.091	379.00	255 – 502	117
MTB:pLJR965	1.280	1,120 - 1,430	0.203	1.060	0,939 - 1,170	0.152	0.85	0.72 – 0.974	0,17

Nota. Sistema Inducido: Sistema de represión activo mediante el inductor ATc. Sistema no Inducido: Sistema de represión inactivo, en ausencia de ATc. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%. DS: Desviación estandar.

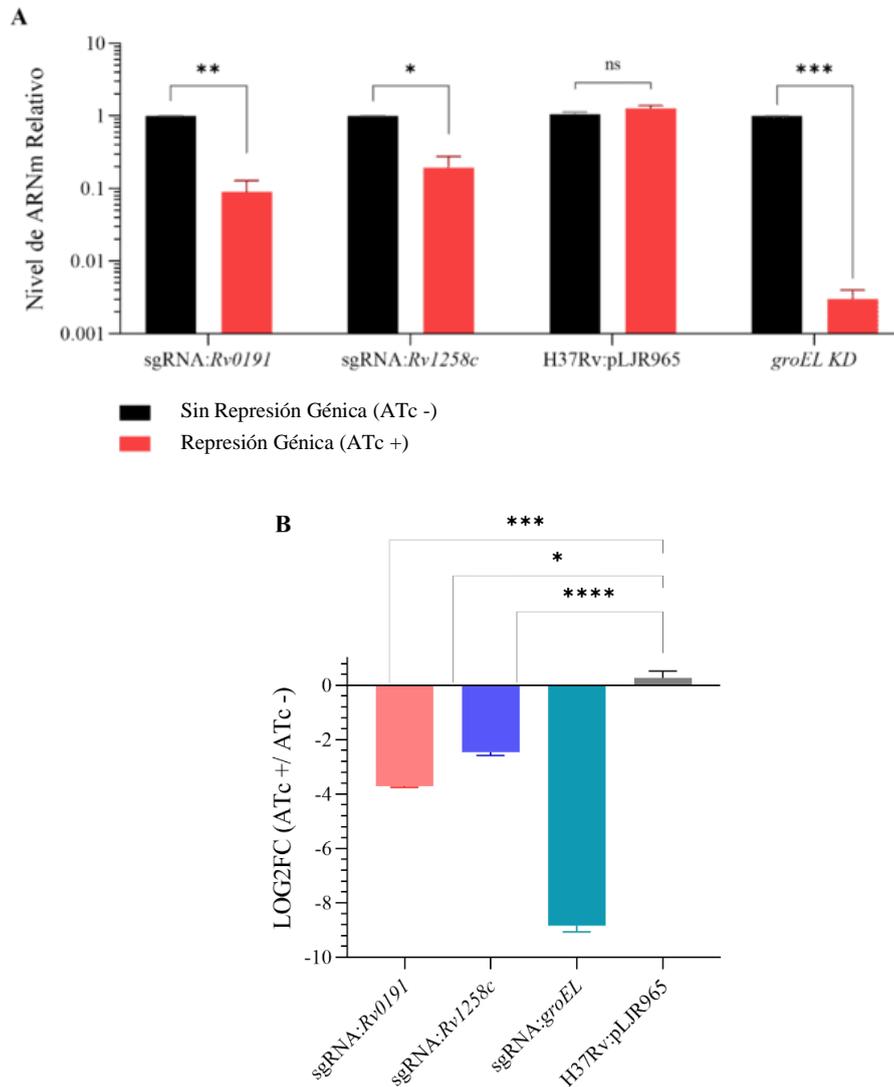


Figura 13. Niveles de ARNm y LOG2FC. A. ARNm bajo el sistema inducido (ATc+) y no inducido (ATc -) a represión génica. Los niveles de ARNm se expresan en unidades relativas, donde 0.001 indica represión casi completa, 1 indica nivel basal, y 10 indica inducción significativa. **B.** Para el logaritmo de cambio de pliegue (LOG2FC), la escala indica 0.001 (-10 en escala LOG2FC) en presencia de una fuerte represión, 1 (0 en LOG2FC) ningún cambio, y 10 (+3.32 en LOG2FC) presencia de una fuerte inducción.

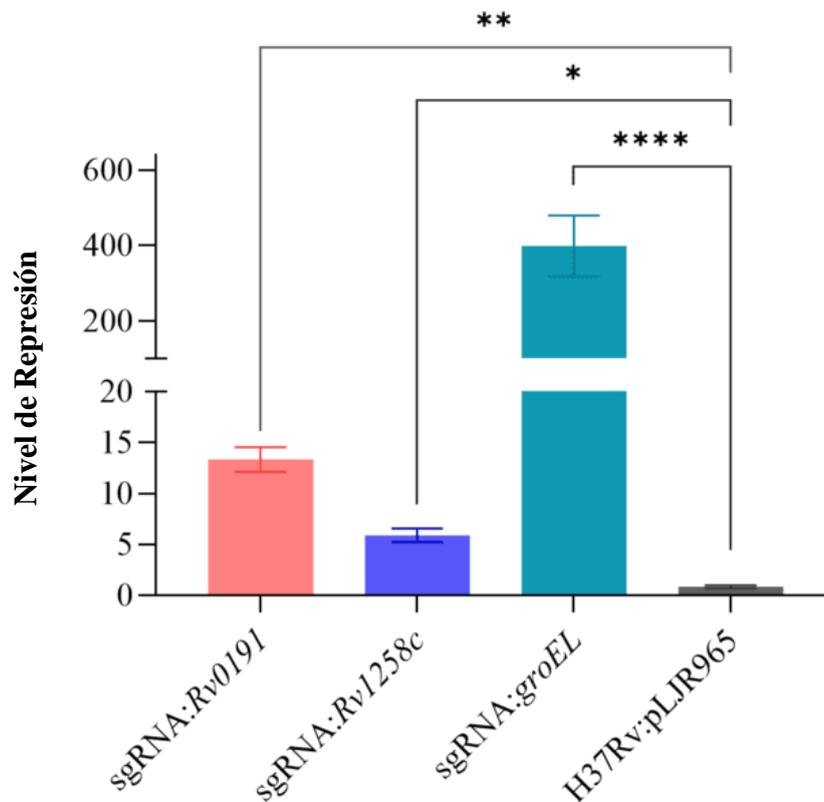


Figura 14. Nivel de represión de cada sgRNA evaluado para los genes de interés. Se muestra el nivel de represión calculado en diferentes cepas bajo el sistema inducido a represión génica: sgRNA:Rv0191, sgRNA:Rv1258c, H37Rv:pLJR965 y sgRNA:groEL. Cada barra representa el valor medio del nivel de represión para cada cepa, junto con la desviación estándar. **** Representa diferencia con p valor < 0.0001.

6.3. Deleción génica de *Rv0191* y *Rv1258c* mediante ORBIT en MTB

H37Rv.

6.3.1. Electroporación de plásmido pKM464 y oligonucleótidos guía

Se observó la ausencia de crecimiento de colonias de MTB H37Rv pKM461 que no presentaron electroporación del plásmido pKM464 y del oligonucleótido guía en placas 7H10 con kanamicina e higromicina (Figura 15A). Estos dos últimos son necesarios para conferir resistencia a la higromicina mediante la recombinación de los sitios attP (presente en el oligonucleótido guía que

reemplazó al gen de interés) y attB (presente en el plásmido pKM464 que confiere resistencia a la higromicina) por acción de la proteína integrasa BxB1. En ausencia de higromicina, las cepas que solo mantienen el plásmido pKM461 son capaces de crecer de manera extensa y confluyente (Figura 15B).

Por otro lado, las cepas MTB H37Rv bajo delección génica de *Rv0191* y *Rv1258c* crecieron en presencia de los antibióticos kanamicina e higromicina (25 y 50 µg/ml, respectivamente). Las colonias en ambos genes delecionados, fueron de tamaño regular y aisladas (Figura 15C/D).

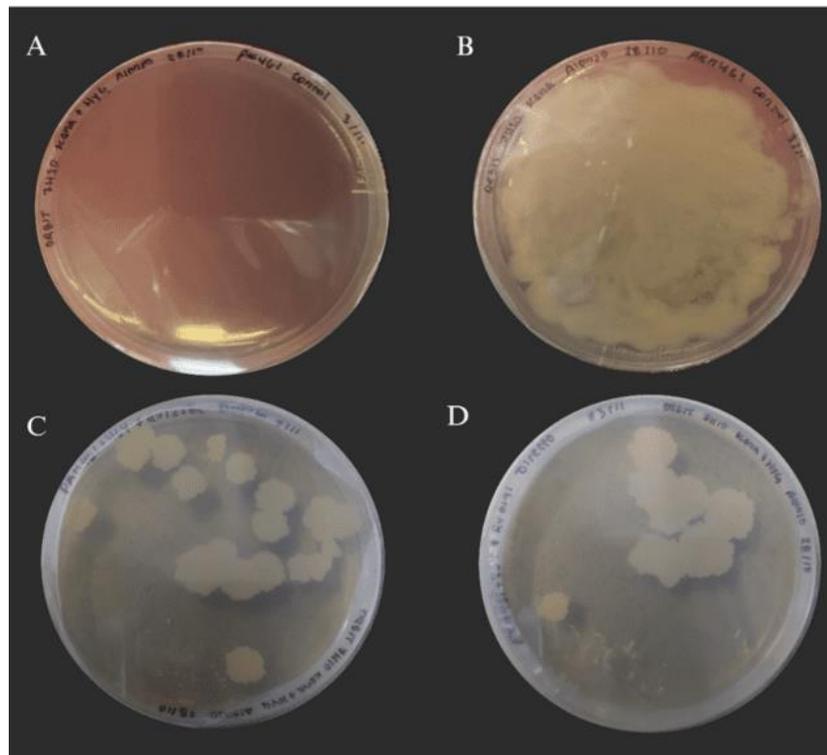


Figura 15. Electroporación en MTB H37Rv:pKM461. A. Control de electroporación de MTB H37Rv + pKM461 en agar 7H10 (Higromicina 50 µg/ml y kanamicina 25 µg/ml). B. Cepa MTB H37Rv + pKM461 en agar 7H10 (Kanamicina). C. Cepa MTB H37Rv con delección del gen *Rv1258c* (Higromicina y Kanamicina). D. En las mismas condiciones que C, se muestra la cepa MTB H37Rv *Rv0191*.

6.3.2. Verificación de la delección génica

Los productos de la amplificación usando el ADN genómico para cada oligonucleótido guía fueron 478 pb y 436 pb, respectivamente (Figura 16). Se evidencia la presencia de la secuencia del oligonucleótido guía insertado correctamente en el genoma, mediante el análisis de alineamiento observando el reemplazo de la secuencia silvestre de cada gen delecionado por la secuencia attP presente en el oligonucleótido guía (Figura 17).

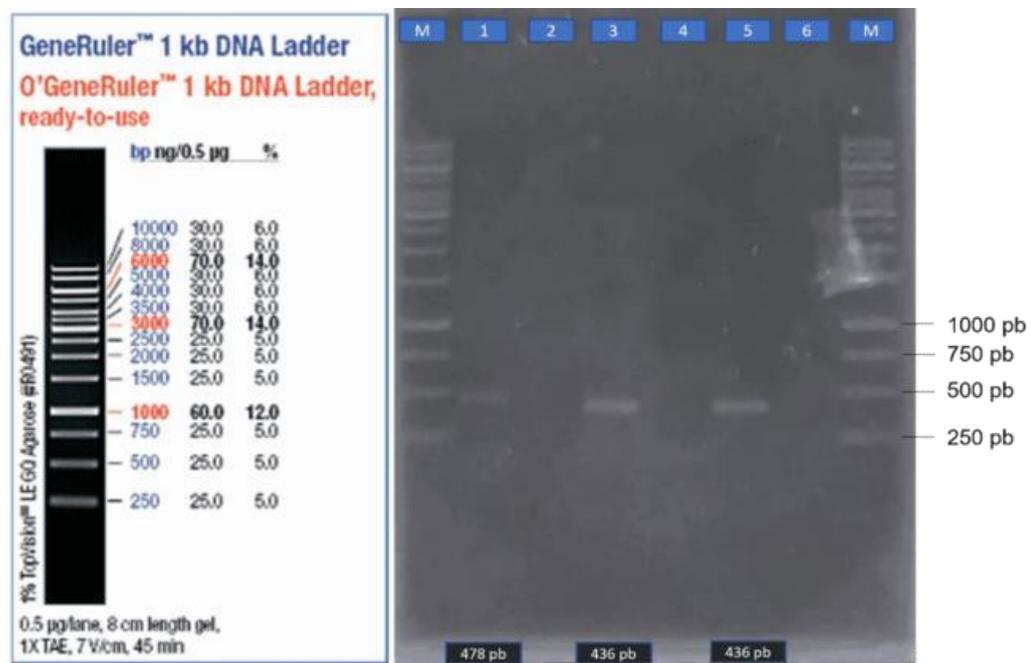


Figura 16. Electroforesis de productos PCR de MTB H37Rv *Rv0191* y *Rv1258c* delecionados. Carril 1, producto PCR de 478 pb correspondiente a la secuencia attP para delecionar al gen *Rv0191*. Carriles 3 y 5, productos PCR de 436 pb correspondientes a la secuencia attP para delecionar al gen *Rv1258c*. Se utilizó como referencia el marcador de 1 kb (Thermo Fisher, #SM0131). Carriles 2, 4 y 6 se muestran vacíos.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Rv0191KO          TGACGGCAAGCTGGCAGAGGCCCTCGGCAGCAATCGCGGCCCTGGTTCGTTCTCGATCGCC 60
Rv0191_attp_oligoKO  TGACGGCAAGCTGGCAGAGGCCCTCGGCAGCAATCGCGGCCCTGGTTCGTTCTCGATCGCC 60
*****

Rv0191KO          GCGGTGTTGAAGCGCAAACCTGCCACCACCCGTTGGTGCCTGCGTACGGTAGGGGCAGC 120
Rv0191_attp_oligoKO  GCGGTGTTGAAGCGCAAACCTGCCACCACCCGTTGGTGCCTGCGTACGGTAGGGGCAGC 120
*****

Rv0191KO          GTAATCGTGCCCTGAACGACCCCGAACCATCGAACTTCGCGGCCGATTCCGCGCAGGACG 180
Rv0191_attp_oligoKO  GTAATCGTGCCCTGAACGACCCCGAACCATCGAACTTCGCGGCCGATTCCGCGCAGGACG 180
*****

Rv0191KO          CGATGACTGCCCAACCGGAACCTCCGCCACCGGTTGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTC 240
Rv0191_attp_oligoKO  CGATGACTGCCCAACCGGAACCTCCGCCACCGGTTGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTC 240
*****

Rv0191KO          AGTGGTGTACGGTACAACCCTGGGATGACGGTTAGCCAGCACTTGTTTCGAGAATCCGACT 300
Rv0191_attp_oligoKO  AGTGGTGTACGGTACAACCCTGGGATGACGGTTAGCCAGCACTTGTTTCGAGAATCCGACT 300
*****

Rv0191KO          CTGAGTCCCGGCAGCGCTAACACAGCAGGTCAGCGGGACCAGTTGGTGCCGCTATGCCA 360
Rv0191_attp_oligoKO  CTGAGTCCCGGCAGCGCTAACACAGCAGGTCAGCGGGACCAGTTGGTGCCGCTATGCCA 360
*****

Rv0191KO          CACTGGGCTGAAGAAGCTCACCGGAGGAAAGCAATTATGTCGCGCTGGAAGCAGGGGCTG 420
Rv0191_attp_oligoKO  CACTGGGCTGAAGAAGCTCACCGGAGGAAAGCAATTATGTCGCGCTGGAAGCAGGGGCTG 420
*****

Rv0191KO          GACGAGGGGGAGTCTATTGCGCCGCTGAACATAGCCGAGTGGTTGCGGTGCTGATG 478
Rv0191_attp_oligoKO  GACGAGGGGGAGTCTATTGCGCCGCTGAACATAGCCGAGTGGTTGCGGTGCTGATG 478
*****

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Rv1258cKO_Seq     GCTCTACCGGGACCTGAACGCCCGCCGGTCTTCGGATGCATGAGCACACGAACATCCT 60
Rv1258c_attp_oligoKO  GCTCTACCGGGACCTGAACGCCCGCCGGTCTTCGGATGCATGAGCACACGAACATCCT 60
*****

Rv1258cKO_Seq     GCATCCGGGCTGCGGCAGCGCAGAAATTCGGTGCACCCCATACCGGTTTGGCGCTAGATT 120
Rv1258c_attp_oligoKO  GCATCCGGGCTGCGGCAGCGCAGAAATTCGGTGCACCCCATACCGGTTTGGCGCTAGATT 120
*****

Rv1258cKO_Seq     CAGCCCGATATTCATGAGAAACAGCAACCGCGCCCGCATTCCGGTTGTCTGGTCAAC 180
Rv1258c_attp_oligoKO  CAGCCCGATATTCATGAGAAACAGCAACCGCGCCCGCATTCCGGTTGTCTGGTCAAC 180
*****

Rv1258cKO_Seq     CACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAACCACCGGGTGGTGCATCCGGCTGCC 240
Rv1258c_attp_oligoKO  CACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAACCACCGGGTGGTGCATCCGGCTGCC 240
*****

Rv1258cKO_Seq     GCGCTGCGGAACTGGATCTGGCGCCCAAGCGGACATCGATCGGCCGTAGGATCGGCT 300
Rv1258c_attp_oligoKO  GCGCTGCGGAACTGGATCTGGCGCCCAAGCGGACATCGATCGGCCGTAGGATCGGCT 300
*****

Rv1258cKO_Seq     CAGTGAATACCGATGTGCTGGCTGGCTGATGGCCGAGCTGCCGAGGGGATGGTGGTCA 360
Rv1258c_attp_oligoKO  CAGTGAATACCGATGTGCTGGCTGGCTGATGGCCGAGCTGCCGAGGGGATGGTGGTCA 360
*****

Rv1258cKO_Seq     CCGACCCCGCGCTACCGACGGCTACCGGAAGACCGGGCCTTTGACCCCTTCGGCCGGCA 420
Rv1258c_attp_oligoKO  CCGACCCCGCGCTACCGACGGCTACCGGAAGACCGGGCCTTTGACCCCTTCGGCCGGCA 420
*****

Rv1258cKO_Seq     AACCGCTGGCAATCA          435
Rv1258c_attp_oligoKO  AACCGCTGGCAATCA          435
*****

```

Figura 17. Alineamiento entre el resultado de secuenciación Oxford Nanopore y el Oligonucleótido guía esperado para los genes *Rv0191* y *Rv1258c* delecionados. Se indica “Rv0191KO” y “Rv1258cKO_Seq” como las secuencias resultantes de secuenciación. El contorno rojo en ambos resultados indica el oligonucleótido guía y el contorno naranja la secuencia attP en reemplazo de la secuencia silvestre de cada gen de interés.

6.4. Evaluación del crecimiento bacteriano bajo los sistemas de represión y delección génica.

Un análisis individual mostró que, en ausencia de represión génica, el sgRNA *Rv0191* tuvo un crecimiento máximo (Y_{max}) de 2.44 y una tasa de crecimiento (k) de 0.036, mientras que *Rv1258c* presentó un Y_{max} de 1.95 y k de 0.045. La cepa MTB H37Rv tuvo un Y_{max} de 2.12 y k de 0.039. Bajo represión génica inducida, el sgRNA *Rv0191* tuvo un Y_{max} de 2.17 y k de 0.038, y para *Rv1258c*, un Y_{max} de 2.17 y k de 0.038, mientras que el control H37Rv:pLJR965 mostró un Y_{max} de 2.22 y k de 0.038 (Figura 18A y B). El análisis bajo delección génica indicó que *Rv0191* delecionado tuvo un Y_{max} de 1.21 y k de 0.075, *Rv1258c* delecionado presentó un Y_{max} de 1.09 y k de 0.082, y la cepa control MTB H37Rv silvestre mostró un Y_{max} de 1.50 y k de 0.079 (Figura 28C).

La agrupación de los datos de las mediciones de crecimiento bajo represión génica (sistema inducido (ATc+) y no inducido (ATc-)) mostró un Y_{max} de 2.20 OD₆₀₀ para el sistema inducido y de 2.18 OD₆₀₀ para el no inducido. La tasa de crecimiento (k) fue 0.038 y 0.040 OD₆₀₀ x h⁻¹, respectivamente, sin diferencias significativas. El análisis bajo delección génica fue comparado frente al crecimiento de la cepa control MTB H37Rv silvestre. Las cepas MTB H37Rv *Rv0191* y *Rv1258c* delecionadas mostraron en conjunto un Y_{max} de 1.25 OD₆₀₀, mientras que la cepa control mostró un valor de 1.60. La tasa de crecimiento fue 0.058 y 0.060 OD₆₀₀ x h⁻¹, respectivamente, sin diferencias significativas (Tabla 14).

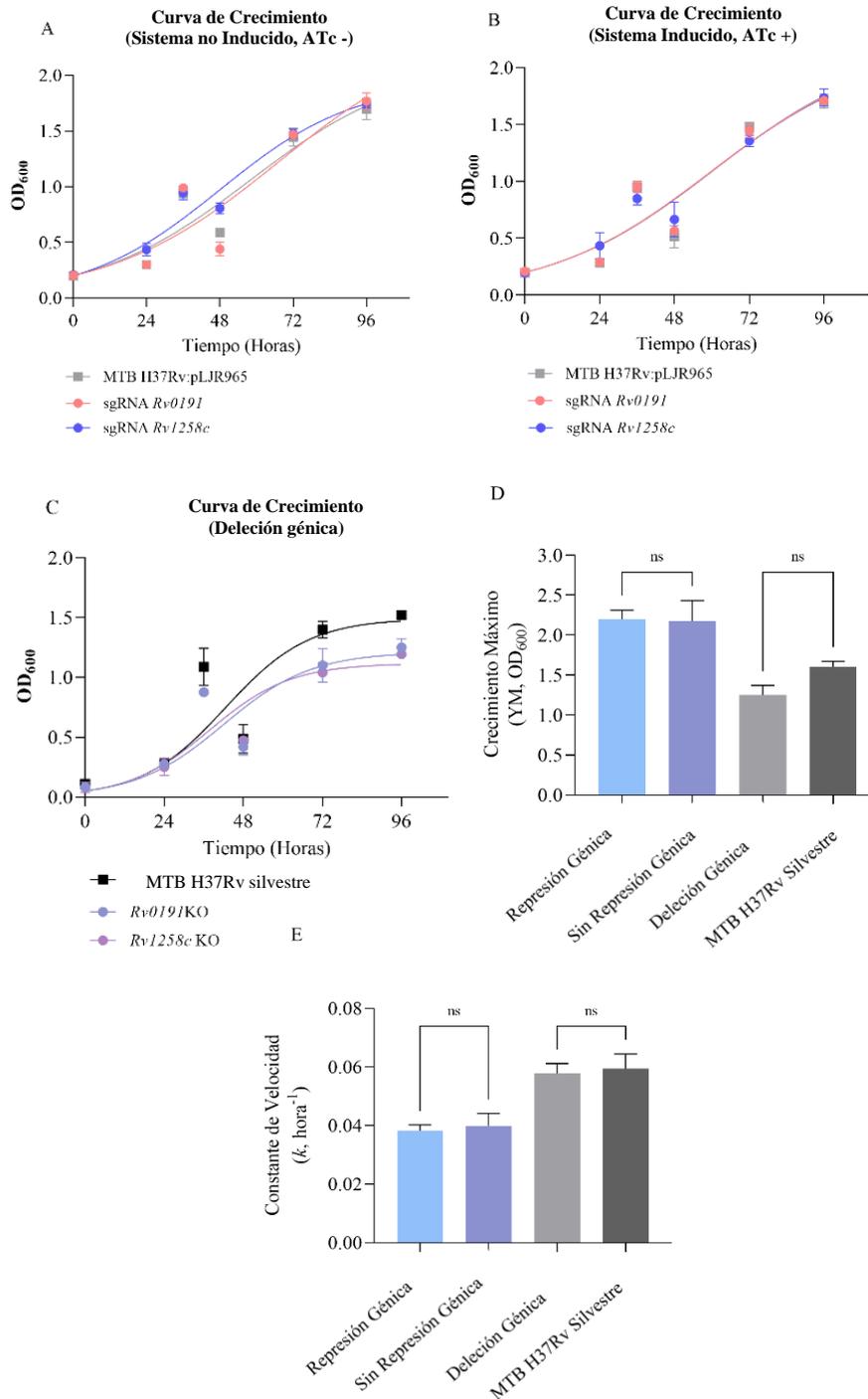


Figura 18. Curvas de crecimiento de las cepas evaluadas. A. Curvas de crecimiento en ausencia de inducción a represión (ATc -). **B-C.** Crecimiento bajo represión génica (ATc+) y Delección génica. **D-F.** Comparación de los valores Ymax y *k* entre las cepas reprimidas frente a las cepas no reprimidas y cepas delecionadas frente al control MTB H37Rv silvestre. **Nota.** ns: no significativo con *p* valor mayor a 0.05.

Tabla 14. Valores de crecimiento máximo y velocidad de crecimiento.

Modificación génica	Crecimiento			Velocidad de crecimiento			p-valor
	Máximo (Ymax)	IC 95%	DS	(k)	IC 95%	DS	
Represión génica (Atc +)	2.20	2,11 - 2,29	0.11	0.038	0,038 - 0,040	0.002	>0,05
Sin Represión génica (ATc -)	2.18	1,98 - 2,37	0.26	0.040	0,037 - 0,043	0.004	-
Deleción génica	1.25	1,06 - 1,44	0.12	0.058	0,052 - 0,063	0.003	>0,05
MTB H37Rv silvestre	1.60	0,98 - 2,23	0.07	0.060	0,015 - 0,104	0.005	-

6.5. Evaluación de la concentración acumulada y velocidad de eflujo inicial de POA extracelular.

Los valores normalizados fueron dispuestos en una regresión lineal simple con la finalidad de generar una comparación de pendientes (Anexo 6). En este punto observamos que todos los ajustes para evaluar la concentración acumulada y la velocidad de eflujo inicial de POA en cada punto de tiempo evaluado mostraron una correlación (R^2) positiva mayor a 0.50, indicando una capacidad moderada a fuerte para predecir la variable dependiente (concentración acumulada y velocidad de eflujo inicial) basándose en el tiempo (0-140 horas).

Establecidos los valores de correlación positiva para cada caso, respecto a los valores de acumulación de POA en el medio extracelular se realizó una comparación de pendientes entre la cepa MTB H37Rv:pLJR965 y H37Rv silvestre observando que ambas pendientes no son significativamente diferentes (p valor = 0.2543). De la misma manera, la velocidad inicial de eflujo entre ambas cepas control no fue significativamente diferente (p valor = 0.3390) (Figura 19A y D).

Las comparaciones realizadas entre los sistemas inducidos a represión y no inducidos indican que la acumulación extracelular de POA y la velocidad a la que el compuesto efluye hasta 140 horas presenta diferencias significativas entre la cepa

MTB HR37v:sgRNA *Rv1258c* reprimida frente a la cepa no reprimida (p valor = 0.0002 y p valor = 0.0134, respectivamente) (Figura 19C y F), esta diferencia responde a una reducción en ambos aspectos, acumulación y velocidad inicial de eflujo de POA en la cepa bajo represión génica. Mientras que, para la cepa MTB HR37v:sgRNA *Rv0191* no se evidenció una diferencia significativa entre ambas condiciones (p valor = 0.1505 y p valor = 0.3400, respectivamente) indicando que el efecto de la inducción a represión génica no impactó en la dinámica de eflujo de POA (Figura 19B y E).

Adicionalmente, exploramos las diferencias de la acumulación y velocidad de eflujo de POA de los sistemas de modificación genética frente a la cepa control MTB H37Rv silvestre. De esta manera, la cepa sgRNA *Rv1258c* reprimida y MTB *Rv1258c* delecionada demostraron una reducción significativa en la concentración acumulada de POA extracelular (p valor < 0.0001) (Figura 20A y C), manteniendo la misma observación en la velocidad inicial de eflujo (p valor = 0.0037 y 0.0021, respectivamente).

Los resultados muestran que, mientras la represión en *Rv0191* no generó un impacto en la dinámica de eflujo frente al sistema no inducido y la cepa control silvestre (Figura 20A-B, respectivamente), la deleción del gen *Rv0191* presentó una reducción significativa en ambas evaluaciones frente a la cepa control silvestre (p valor < 0.0001 y 0.0006, respectivamente) (Figura 20C-D).

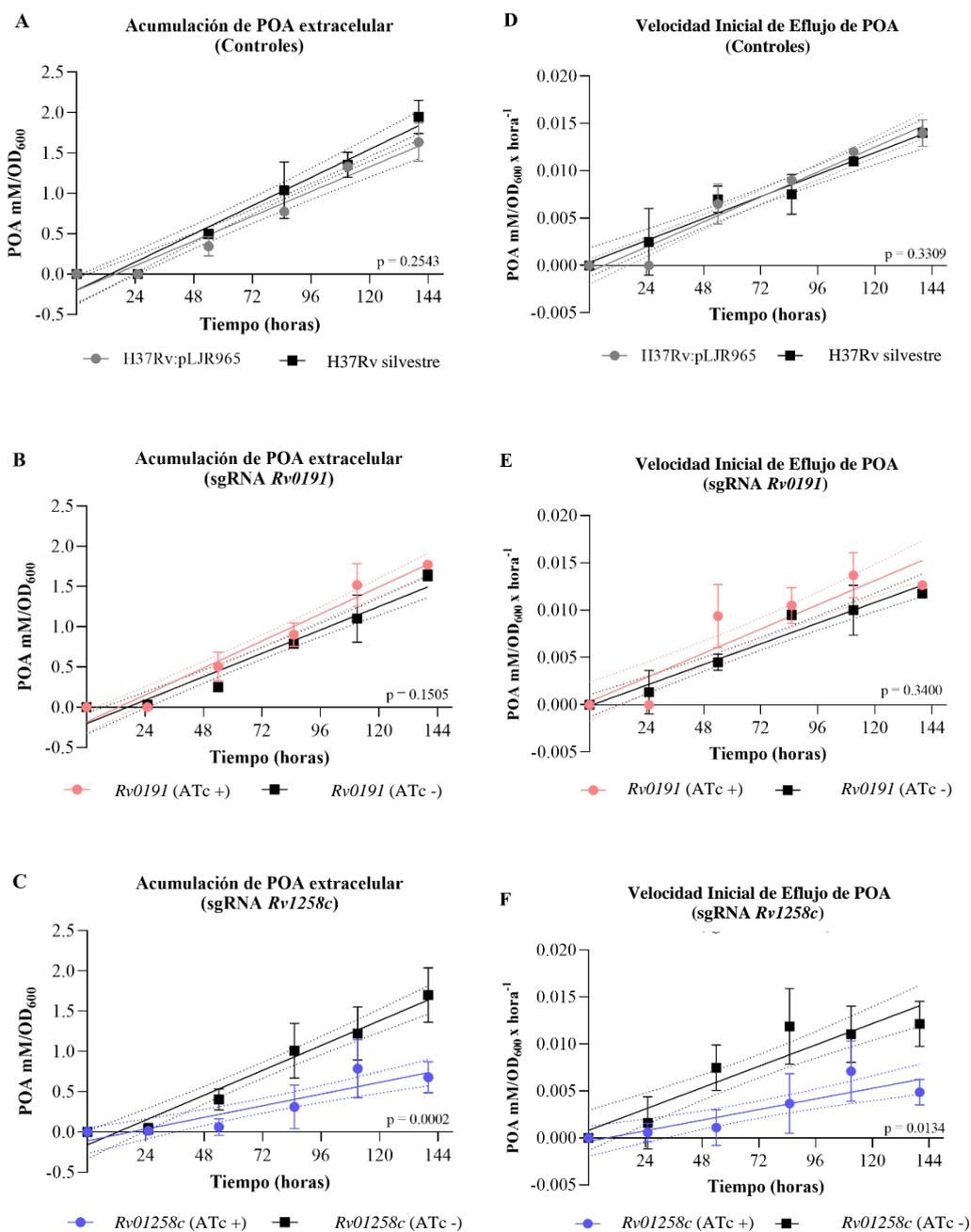


Figura 19. Dinámica de eflujo de POA en cepas bajo represión génica. A – C. Regresión lineal simple de la acumulación de POA en las cepas MTB *Rv0191* *Rv1258c* (ATc+/ATc-) y controles (MTB H37Rv:pLJR965), MTB H37Rv silvestre. **D – F.** Regresión lineal simple de la velocidad de eflujo inicial de POA en las cepas MTB *Rv0191*, *Rv1258c* (ATc+/ATc-) y controles (MTB H37Rv:pLJR965), MTB H37Rv silvestre. **Nota.** p valor > 0.05 se considera significativamente diferente.

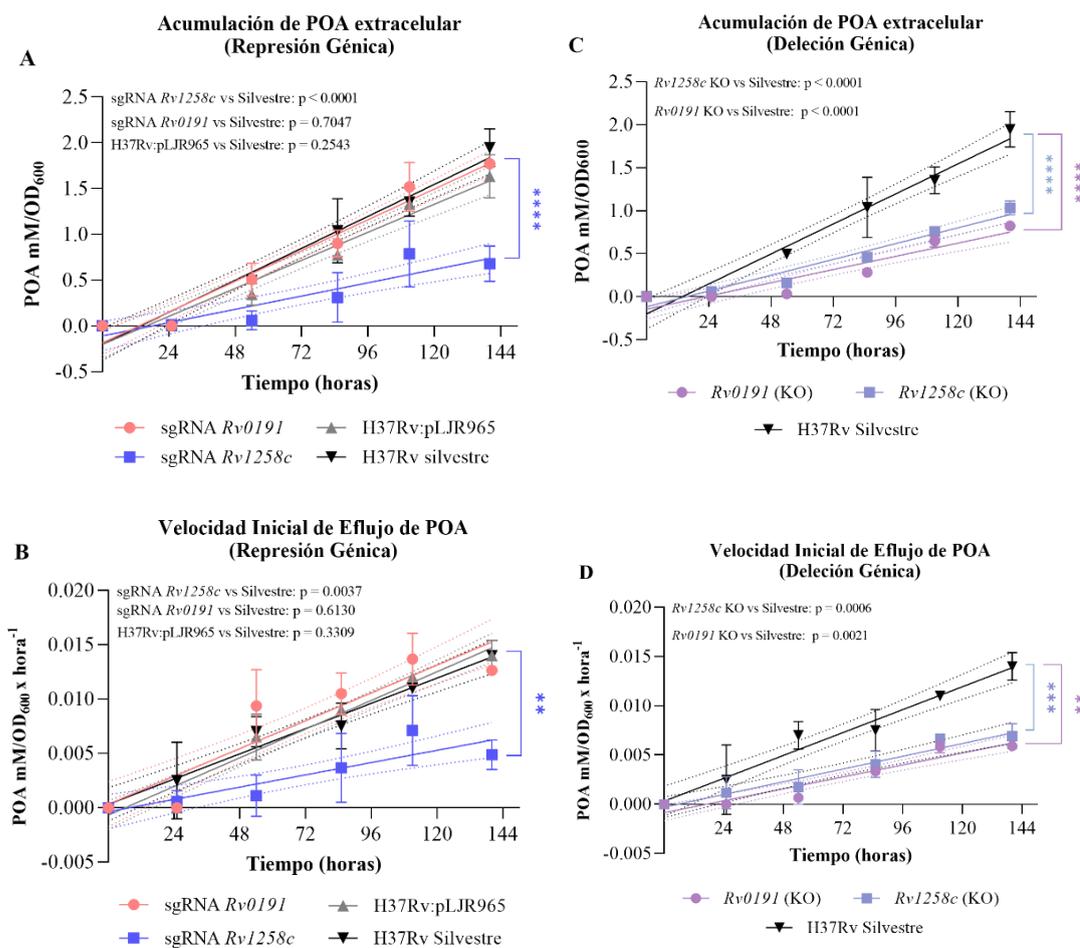


Figura 20. Eflujo de POA en cepas reprimidas y deleccionadas frente a la cepa control MTB H37Rv. A-B. Se muestra la concentración acumulada de POA bajo los sistemas de represión y delección génica en cada punto de tiempo evaluado (0, 25, 54, 88, 111 y 140 horas). **C-D.** Se muestra la velocidad inicial de eflujo de POA en cada punto de tiempo evaluado (0, 25, 54, 88, 111 y 140 horas).

La comparación de pendientes muestra que los valores de acumulación extracelular de POA y la velocidad inicial de eflujo en el intervalo de tiempo establecido son significativamente diferentes entre las cepas MTB H37Rv modificadas genéticamente frente a la cepa control MTB H37Rv silvestre (Figura 20).

Específicamente, la cepa sgRNA *Rv1258c* bajo represión génica muestra una menor acumulación de POA en comparación con la cepa silvestre. Por ejemplo, a las 54 horas, la cepa silvestre acumula 0.496 mM, mientras que *Rv1258c* acumula solo 0.060 mM. A las 140 horas, la diferencia es aún más pronunciada, la cepa silvestre acumula 1.950 mM y la cepa *Rv1258c* reprimida acumula solo 0.679 mM.

Este mismo efecto se observa en el sistema bajo delección génica. La cepa *Rv0191* delecionada también muestra una menor acumulación de POA en comparación con la cepa control. A las 54 horas, la cepa *Rv0191* delecionada acumula 0.064 mM, mientras que la cepa silvestre acumula 0.496 mM. A las 140 horas, acumula 0.823 mM, mientras que la cepa silvestre acumula 1.950 mM (Tabla 15).

Respecto a la velocidad inicial de eflujo de POA, la cepa *Rv1258c* reprimida muestra una reducción en comparación con la cepa control MTB H37Rv silvestre. A las 140 horas, la cepa silvestre muestra una velocidad de 0.0140, mientras que *Rv1258c* reprimida muestra una velocidad de 0.0059 mM/OD₆₀₀ x h⁻¹.

Para la cepa *Rv0191* bajo el sistema de delección génica, también se observa una disminución en la velocidad de eflujo en comparación con la cepa silvestre. A las 140 horas, la cepa *Rv0191* delecionada muestra una velocidad de 0.0059, en contraste con 0.0140 mM/OD₆₀₀ x h⁻¹ de la cepa silvestre. Adicionalmente, la cepa *Rv1258c* delecionada muestra una velocidad inicial de eflujo significativamente menor, siendo 0.0069 mM/OD₆₀₀ x h⁻¹ (Tabla 16).

Tabla 15. Valores de acumulación extracelular de POA obtenidos en todos los puntos de tiempo evaluados (0 – 140 h).

Modificación Genética	Cepa / gen blanco	Horas (h)			
		0 (IC 95%), DS	25 (IC 95%), DS	54 (IC 95%), DS	85 (IC 95%), DS
-	H37Rv Silvestre	0.000 (0 - 0), 0	0.000 (0 - 0), 0	0.496 (0.411 - 0.581), 0.053	1.040 (0.569)
Represión Génica	H37Rv:pLJR965	0.000 (0 - 0), 0	0.000 (0 - 0), 0	0.343 (0.173 - 0.513), 0.107	
Sin Represión Génica	<i>Rv0191</i>	0.000 (0 - 0), 0	0.046 (-0.101 - 0.193), 0.093	0.228 (0.16)	
Sin Represión Génica	<i>Rv1258c</i>	0.000 (0 - 0), 0	0.040 (-0.037 - 0.116), 0.073		
Represión Génica	<i>Rv0191</i>	0.000 (0 - 0), 0	0.215 (
Represión Génica	<i>Rv1258c</i>	0.000 (0			
Delección Génica	<i>Rv0</i>				
Delección					

Tabla 16. Valores de velocidad inicial de eflujo de POA obtenidos en todos los puntos de tiempo evaluados (0 – 140 h).

Sistema de MG	Cepa / gen blanco	Horas (h)				
		0 (IC 95%), DS	25 (IC 95%), DS	54 (IC 95%), DS	85 (IC 95%), DS	140 (IC 95%), DS
-	H37Rv Silvestre	0.000 (0 - 0), 0	0.000 (0 - 0), 0	0.0093 (0.0073 - 0.0113), 0.0013	0.0120 (0.0063 - 0.0177), 0.0036	0.0140 (0.0117 - 0.0163), 0.0014
Represión Génica	H37Rv:pLJR965	0.000 (0 - 0), 0	0.000 (0 - 0), 0	0.0065 (0.0035 - 0.0096), 0.0019	0.0093 (0.0085 - 0.0100), 0.0005	0.0143 (0.0103 - 0.0182), 0.0025
Sin Represión Génica	<i>Rv0191</i>	0.000 (0 - 0), 0	0.0043 (-0.0036 - 0.0121), 0.0049	0.0053 (-0.0027 - 0.0132), 0.0050	0.0095 (0.0075 - 0.0116), 0.0013	0.0120 (0.0086 - 0.0154), 0.0022
Sin Represión Génica	<i>Rv1258c</i>	0.000 (0 - 0), 0	0.0044 (0.0000 - 0.0088), 0.00413	0.0051 (0.0005 - 0.0097), 0.0044	0.0089 (0.0063 - 0.0115), 0.0025	0.0111 (0.0086 - 0.0137), 0.0024
Represión Génica	<i>Rv0191</i>	0.000 (0 - 0), 0	0.0086 (-0.0061 - 0.0233), 0.0140	0.0094 (0.0057 - 0.0131), 0.0035	0.0105 (0.0086 - 0.0125), 0.0019	0.0126 (0.0110 - 0.0141), 0.0015
Represión Génica	<i>Rv1258c</i>	0.000 (0 - 0), 0	0.0006 (-0.0009 - 0.0020), 0.0014	0.0011 (-0.0013 - 0.0036), 0.0023	0.0037 (0.0006 - 0.0066), 0.0029	0.0049 (0.0030 - 0.0068), 0.0018
Delección Génica	<i>Rv0191</i>	0.000 (0 - 0), 0	0.000 (0 - 0), 0	0.0006 (-0.0003 - 0.0015), 0.0006	0.0033 (0.0029 - 0.0038), 0.0003	0.0059 (0.0056 - 0.0062), 0.0002
Delección Génica	<i>Rv1258c</i>	0.000 (0 - 0), 0	0.0012 (-0.0012 - 0.0035), 0.0015	0.0016 (-0.0006 - 0.0041), 0.0015	0.0041 (0.0023 - 0.0058), 0.0011	0.0069 (0.0053 - 0.0085), 0.0010

6.6. Evaluación de la susceptibilidad a PZA

Reportamos que el MIC frente a PZA para las cepas control MTB H37Rv silvestre y MTB H37Rv:pLJR965 bajo condiciones ácidas (pH: 6.0) fue de 1020 y 1346 μM de PZA, equivalentes a 125.57 y 165.71 $\mu\text{g/ml}$ de PZA, respectivamente. Para el caso de POA, los valores de MIC fueron 98.58 y 106.9 μM de POA, equivalentes a 12.23 y 13.27 $\mu\text{g/ml}$ de POA, respectivamente.

Para la concentración inhibitoria no letal (NIC) frente a PZA, las cepas control MTB H37Rv y MTB H37Rv:pLJR965 presentaron valores de 165.3 y 75.69 μM de PZA, equivalentes a 20.35 y 9.32 $\mu\text{g/ml}$ de PZA, respectivamente. En el caso de POA, los valores de NIC fueron 25.58 y 14.57 μM de POA, equivalentes a 3.17 y 1.81 $\mu\text{g/ml}$ de POA, respectivamente (Figura 21). Estos valores representan mediciones de 2 réplicas biológicas (Anexo 7).

Finalmente, reportamos que las cepas MTB *Rv0191* y *Rv1258c* delecionadas presentaron resistencia a PZA bajo crecimiento en placas de 7H10 a pH 6.2. Para MTB *Rv0191* delecionada el crecimiento se observa hasta 1600 $\mu\text{g/ml}$ de PZA (dilución 1:10), y para MTB *Rv1258c* delecionada, el crecimiento se ve hasta 1600 $\mu\text{g/ml}$ de PZA (siembra directa), a comparación de la cepa control silvestre que evidencia un crecimiento hasta 400 $\mu\text{g/ml}$ de PZA (siembra directa).

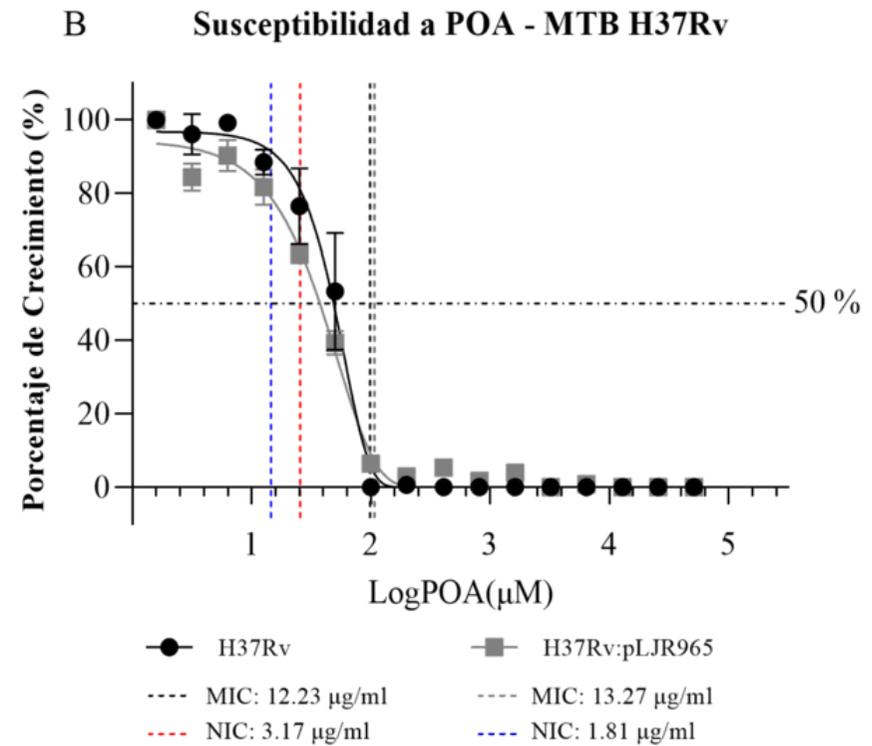
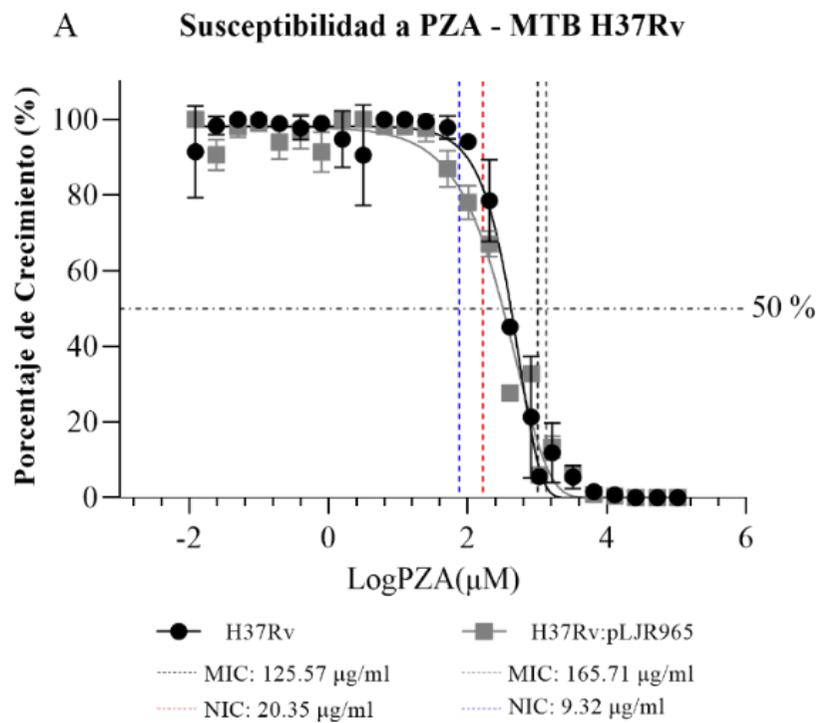


Figura 21. Susceptibilidad a PZA y POA en las cepas control del estudio. En ambos casos se presenta en el eje X los valores del logaritmo de las concentraciones de PZA y POA (μM), el eje Y está compuesto por los porcentajes de crecimiento calculados frente a cada droga.

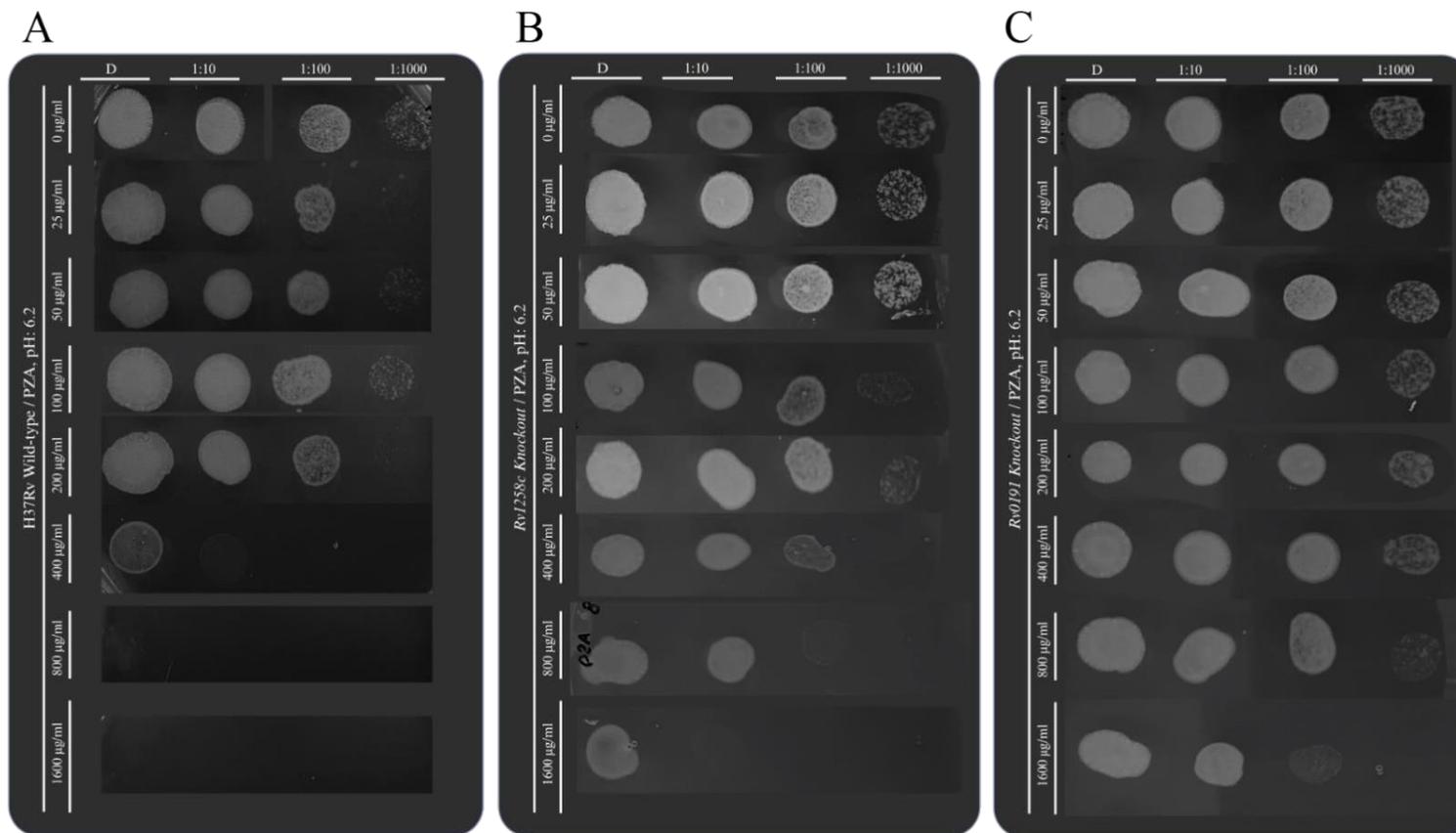


Figura 22. Ensayo de MIC fenotípico 7H10 en cepas bajo delección génica. A. Cepa control MTB H37Rv silvestre con crecimiento hasta 400 µg/ml de PZA en la siembra directa. **B.** Cepa MTB *Rv1258c* delecionada con crecimiento hasta 1600 µg/ml de PZA en la siembra directa. **C.** Cepa MTB *Rv0191* delecionada con crecimiento hasta 1600 µg/ml de PZA en la siembra diluida 1:100.

VII. DISCUSIONES

En la actualidad, la resistencia a diversos antibióticos en MTB es un fenómeno común en varias partes del mundo, complicando significativamente el tratamiento de la tuberculosis. En el desarrollo de nuevas drogas antituberculosas, se han explorado dos aproximaciones complementarias: un modelo de genes a antibióticos (basado en genes blanco) y un modelo de antibióticos a genes (basado en antibióticos). Aunque el modelo basado en la identificación de genes blanco ha sido exitoso para el tratamiento de otras enfermedades, como el cáncer o infecciones virales, en tuberculosis, este enfoque aún no ha producido ningún fármaco nuevo hasta la fecha (84). Es importante mencionar que la causa de este fracaso es multifactorial, destacándose la incapacidad de las moléculas pequeñas para penetrar en las paredes celulares bacterianas, eludir el complejo sistema de eflujo y evitar el metabolismo xenobiótico (85).

Los ensayos fenotípicos para el descubrimiento de nuevos antibióticos han abordado este desafío en el tratamiento de la tuberculosis. Este enfoque ha llevado al desarrollo de importantes antibióticos, como la estreptomicina o bedaquilina. Sin embargo, el reto en este enfoque es el frecuente descubrimiento de blancos promiscuos. En este contexto, 'promiscuidad' se refiere a cuando un gen blanco es afectado por una amplia diversidad de compuestos antibacterianos. Aunque esto puede revelar la importancia de estos genes para la supervivencia de la micobacteria, complica el escenario al generar redundancias en la identificación de compuestos, lo que limita la diversidad de opciones terapéuticas y la posibilidad de superar la resistencia a los mismos o los efectos secundarios.

Es imperativo identificar el blanco molecular (gen) y su modo de acción, es decir, el rol que desempeña dentro del mecanismo vital de la micobacteria. Un problema común en este enfoque está relacionado con las diferencias en las condiciones de crecimiento; aunque se pueda identificar un efecto inhibitorio *in vitro*, este puede ser irrelevante en un entorno real *in vivo* debido a la presión biológica o a un modo de acción más complejo (86).

En este contexto, es esencial destacar que la identificación del mecanismo de acción de blancos moleculares (genes) es una tarea imprescindible y compleja que requiere la colaboración de investigadores de todo el mundo, cuyas contribuciones han sido fundamentales a lo largo del tiempo (87 - 90). En ese sentido, el presente estudio tuvo como finalidad develar el rol de los genes *Rv0191* y *Rv1258c* involucrados en el sistema de eflujo de MTB y en la susceptibilidad a PZA.

7.1. Implementación de los sistemas de modificación genética en MTB H37Rv.

En el sistema CRISPRi se evaluaron algunos componentes para llevar a cabo con éxito la clonación. La linealización de 1000 ng de plásmido pLJR965 resultó exitosa empleando bajas cantidades y volúmenes de enzima BsmBI (2.5U, 5U o 10U) evitando la actividad STAR de la enzima (cortes inespecíficos en sitios no objetivo). Adicionalmente, identificamos que la digestión enzimática es adecuada a 4 y 12 horas en baño maría; sin embargo, el número de colonias con autoligados es mayor a las 4 horas. Finalmente, emplear una dilución 1:100 del producto hibridado (sgRNA) para la reacción de ligación resulta en un mejor rendimiento respecto a una dilución 1:20 (Anexo 8).

El diseño de cada sgRNA se basó en la selección de secuencias PAM específicas para MTB reportadas por Rock y cols. (Anexo 1). De esta manera, para el gen *Rv0191* la secuencia seleccionada fue GCAGGAT y para *Rv1258c* fue ACGGAAA. Para ambas secuencias PAM, Rock reporta niveles de represión de 64.7 (DS: 8.7) y 110.5 (DS: 26.4), respectivamente. Sin embargo, nuestros resultados revelaron niveles de represión diferentes, siendo 13.33 ± 1.202 (IC 95 %: 10.35 – 16.32) para el sgRNA *Rv0191* y 5.89 ± 0.694 (IC 95 %: 4.17 – 7.61) para el sgRNA *Rv1258c*.

En principio, el nivel de represión se refiere el grado real de disminución de la expresión génica observada experimentalmente cuando se aplica el sistema CRISPRi con un sgRNA específico. De esta manera, la diferencia de los niveles de represión entre lo reportado por Rock y el presente estudio, se debe a diferencia entre las condiciones experimentales y los sgRNA evaluados en ambos estudios. El estudio de Rock, empleó la represión de los genes *dnaEI* y *ppT* para evaluar la eficacia del sistema CRISPRi basado en la proteína dCas9 *Streptococcus thermophilus* (dCas9_{sth1}) (47). Debido a ello, a pesar de emplear las mismas secuencias PAM, los niveles de represión reportados por Rock no son completamente representativos ni trazables a diferentes genes de MTB, como es el caso de *Rv0191* y *Rv1258c*.

Este hallazgo representa un problema en el diseño de sgRNAs debido a la falta de trazabilidad hacia la selección de secuencias PAM y la capacidad limitada para predecir el éxito de represión en MTB. Para superar esta barrera, Bosch y cols. en el 2021, establecieron valores predictivos de la capacidad de represión génica para

diferentes secuencias PAM en MTB. Ellos contemplan factores adicionales para el diseño de sgRNAs como: el grado de esencialidad de un gen, la cadena a la cual se dirige el sgRNA (sentido o anti-sentido), la fuerza de represión y el índice de vulnerabilidad del gen a reprimir.

La fuerza de represión a diferencia del nivel de represión, es un concepto teórico que se utiliza para predecir cuán efectivo será un sgRNA específico en la reducción de la expresión génica. Este valor se determina a través de un modelo de regresión que incorpora diversos factores, tales como la secuencia del sgRNA, la complementariedad con el ADN objetivo y el contenido de GC en la secuencia del sgRNA (48). En ese sentido, los sgRNA diseñados para *Rv0191* y *Rv1258c* mostraron una fuerza de represión predicha de 0.79 y 0.96.

Un valor de fuerza de represión cercano a 1 indica que los sgRNAs empleados son capaces de generar eficientemente la represión génica. Esta predicción se alinea con los resultados experimentales. El análisis de los valores relativos del cambio logarítmico en base 2 (LOG2FC) obtenidos mediante la comparación de expresión génica entre el sistema inducido a represión (ATc +) y el no inducido (ATc -), reflejó una reducción en la expresión de *Rv0191* (-3.59 ± 0.66) y *Rv1258c* (-2.91 ± 0.59) (Figura 20B).

Adicionalmente, los niveles de ARNm encontrados bajo represión génica para ambos genes, 0.090 ± 0.036 para *Rv0191* y 0.195 ± 0.077 para *Rv1258c*. lo cual confirma la significativa reducción en la expresión de estos genes bajo condiciones

de represión génica (Figura 20A). Estos niveles de ARNm representan la cantidad absoluta de transcritos presentes y están en concordancia con los valores de LOG2FC observados, corroborando la eficiencia del sistema de represión génica en disminuir la expresión de ambos genes.

La aplicación del sistema ORBIT fue integrada correctamente en MTB y demostró ser eficaz al deletar los genes *Rv0191* y *Rv1258c*. Red/ET, es un sistema complejo que emplea *recombineering* para modificar cósmidos y construir vectores integrativos (93 - 96). Aunque el sistema Red/ET es útil en bacterias como *E. coli* (94), la sucesividad de pasos de recombinación para deletar genes representa un reto en bacterias cuyo tiempo de multiplicación es elevado, como MTB H37Rv, generando limitaciones en la selección y mantenimiento de vectores en este organismo. El ORBIT ha sido empleado en micobacterias para identificar factores de virulencia, debido a la facilidad para integrar el sistema (102 - 104).

En el sistema ORBIT se genera una deleción simple, directa y específica en MTB mediante una recombinación del oligonucleótido guía específico al cromosoma mediada por la recombinasa *CheC9 recT*. Adicionalmente la expresión de la proteína *Bxb1* (presentes en el plásmido pKM461) media la recombinación de sitios *attP* y *attB*. Ambos procesos ocurren de manera simultánea en MTB, lo que acelera significativamente la obtención de resultados y la capacidad para generar inferencias sobre el rol de los genes de interés.

7.2. Los sistemas de modificación genética en los genes *Rv0191* y *Rv1258c* no alteran el crecimiento en MTB H37Rv.

Evidenciamos que la capacidad máxima de crecimiento no se ve comprometida por el efecto de represión génica (Y_{max} promedio: 2.20, DS: 0.11, IC 95%: 2.11 – 2.29) frente a la cepa control no inducida a represión (MTB H37Rv:pLJR965) (Y_{max} promedio: 2.18, DS: 0.26, IC 95%: 1.98 – 2.37) dado que no presenta una diferencia estadísticamente significativa con un valor p de 0.815 (Tabla 14).

Adicionalmente, la velocidad de crecimiento hasta llegar a la capacidad máxima de densidad celular (Y_{max}) no se ve alterada en el sistema reprimido, dado que presenta valores cercanos entre sí. Las cepas bajo represión muestran un valor k promedio de 0.0382, DS: 0.0021, IC 95%: 0.0366 – 0.0398, mientras que la cepa control, MTB H37Rv:pLJR965, muestra un k promedio de 0.0400, DS: 0.0043, IC 95%: 0.0367 – 0.0433.

Por otro lado, evaluando el mismo factor hemos observado que las cepas *Rv0191* y *Rv1258c* delecionadas mantienen un valor de crecimiento máximo (Y_{max} promedio: 1.25, DS:0.12, IC 95%: 1.06 – 1.44) menor al de la cepa MTB H37Rv silvestre (Y_{max} promedio: 1.60, DS:0.07, IC 95%: 0.98 – 2.23). Sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa. Aunque la capacidad de las cepas delecionadas para generar densidades poblacionales máximas se ve ligeramente reducida, demostramos que la velocidad de crecimiento con la que se multiplican hasta ese límite no se ve alterada (Figura 18E).

Aunque se ha reportado que la delección del gen *Rv0191* por medio de transposones genera una ventaja en el crecimiento en comparación de una cepa MTB silvestre (102), en el presente estudio no evidenciamos este efecto realizando una delección específica en el gen. Probablemente, las cepas que mantienen la delección de *Rv0191* por medio de transposones involucren mutaciones en otras regiones que evidencien este efecto y sesguen los resultados.

Respecto a la vulnerabilidad, Bosch y cols. reportan que el gen *Rv0191* tiene un índice de 1.1920 (IC 95%: -0.5100 – 3.8940) y *Rv1258c* de 1.3110 (IC 95%: -0.6440 – 4.3830). Detallar sobre la interpretación de este índice es relevante ya que permite establecer una inferencia teórica previa a los ensayos experimentales en relación al modo en el que los genes están involucrados en el comportamiento fisiológico de MTB. Establecer este valor comprende un desarrollo y análisis de modelamiento estadístico bayesiano que emplea dos funciones principales.

La primera es una función logística que modela la relación entre la fuerza de represión predicha de sgRNAs y el cambio en la aptitud bacteriana (48). Esta función describe cómo la eficacia de la represión afecta la viabilidad de la micobacteria (MTB y/o MSMEG). La segunda función es una de dos líneas que se aplica una vez que la fuerza de represión excede un umbral crítico.

Esta segunda función modela la tasa de cambio en la aptitud en relación con incrementos en la fuerza de represión más allá de este punto. Proporciona una forma de capturar cambios más lineales o abruptos en la aptitud en altos niveles de

represión. Finalmente, para obtener un único valor de vulnerabilidad (índice de vulnerabilidad, IV) que represente el efecto acumulado de todas los sgRNAs predichos, se toma la integral del modelo compuesto de dos líneas sobre la función logística en el rango completo de la fuerza de represión de los sgRNAs (intervalo 0 a 1).

Esta integral proporciona un valor único que resume el impacto total de la depleción genética sobre la aptitud bacteriana a lo largo de todo el espectro de intensidades de represión posibles. El valor resultante del IV representa la susceptibilidad global del gen a la represión, cuantificando cuán crítico es el gen para la supervivencia y el crecimiento bacteriano bajo las condiciones experimentales. Los valores de IV que tengan un rango por debajo de 0 (por ejemplo, IV: -11.217, IC 95%: -12.411 --10.056 para el gen esencial *sigA* de MTB H37Rv) indican que la interferencia en su expresión puede llevar a una reducción drástica o letal en la aptitud bacteriana.

En cambio, valores por encima de 0, como en el caso de los genes *Rv0191* y *Rv1258c*, implican que la interferencia en su expresión no representa un efecto crítico para la supervivencia de MTB. Cabe mencionar que el valor inferior del intervalo de confianza al 95 % para ambos genes es negativo (-0.510 y -0.644, respectivamente). Esto sugiere que potencialmente el uso de sgRNAs con fuerzas de represión muy cercanas a 1 pueden generar un efecto negativo en la aptitud.

Finalmente, aunque se menciona que los genes vulnerables son más atractivos como genes blanco terapéuticos, el enfoque de estudiar genes invulnerables aquí

contribuye al entendimiento del rol que cumplen genes involucrados en el mecanismo de acción y resistencia a PZA. Los reportes coinciden con lo obtenido en este estudio. Hemos demostrado que a pesar de la represión y delección génica las cepas de MTB H37Rv modificadas genéticamente no presentan una alteración en el crecimiento bacteriano, lo que permite inferir que estos genes efectivamente no presentan un carácter esencial ni vulnerable para el mantenimiento vital de la bacteria.

7.3. La concentración y velocidad de eflujo de POA disminuye en cepas bajo represión y delección génica.

La propuesta por Zhang y cols., refiere un modelo dependiente de la expulsión de POA en un estado disociado (POA^-) hacia un entorno ácido ($\text{pH} < 6.6$), su reingreso como HPOA y su acumulación intracelular para generar el efecto bactericida a través de la reducción del potencial de membrana (12-15, 31), la propuesta por Baughn y cols., explica un modelo donde la presencia de estrés celular conlleva a la activación del factor extra-citoplasmático E (SigE). Este factor regula la expresión de genes que mantienen o reparan la envoltura celular y conduce a una modulación de los niveles de coenzima A (CoA). La presencia de PZA/POA agota aún más el CoA, conduciendo a la célula a una inhibición del crecimiento a causa de una disfunción metabólica (16, 20).

Aunque los eventos que conducen a la presencia de estrés celular pueden estar asociados con un entorno celular ácido ($\text{pH} < 6.6$), experimentalmente Baughn ha demostrado que el aumento de susceptibilidad a PZA (acción bactericida de la PZA/POA) puede orquestarse independientemente del pH, siempre y cuando SigE

se encuentre activo. Las cepas con el gen *sigE* delecionado causan resistencia a PZA y POA en concentraciones de 400 µg/ml (pH: 5.8) y 800 µg/ml (pH: 6.6), respectivamente. Además, el aumento de la susceptibilidad se potencia con la presencia de otros factores que generan estrés celular, como los inhibidores de la síntesis de peptidoglicano (16).

Además de los dos modelos propuestos, reportes previos sugieren que la presencia de genes blanco de POA dentro de la célula se encuentren involucrados como mecanismo de acción del antibiótico, como *panD*, que codifica para la L-aspartato decarboxilasa en la ruta biosintética de la Coenzima A (18, 19), adicionalmente se ha reportado que las mutaciones en la región promotora del gen *clpC1* en su extremo N-terminal (específicamente la mutación V63A) pueden disminuir la eficacia con la que el complejo proteasa Clp procesa a *PanD* en presencia de POA afectando la ruta del CoA (19). Es probable que estos eventos no sean independientes y puedan estar presentes en conjunto a uno o ambos modelos propuestos.

Dada la evidencia brindada por Zhang y cols. sobre la necesidad del sistema de eflujo de POA para una acción bactericida, y los reportes que relacionan la sobreexpresión de genes que codifican bombas de eflujo, la presencia de mutaciones en estos o una acumulación intracelular en cepas de estudio o clínicas con la adquisición de resistencia a PZA (36, 37), decidimos explorar el rol y la importancia de los genes *Rv0191* y *Rv1258c* en el sistema de eflujo de POA de MTB H37Rv.

Utilizando un cultivo in vitro a pH neutro (7.0), suplementado con PZA a una concentración final de 800 µg/ml (equivalente a 6.50 mM en 1 ml de cultivo líquido), evaluamos dos eventos principales para establecer una asociación directa entre el rol de estos genes y el sistema de eflujo en un intervalo de tiempo hasta 140 horas. Primero, analizamos la capacidad de la micobacteria para liberar POA al medio extracelular. Nuestros hallazgos corresponden a la concentración de POA acumulada en el medio extracelular en diferentes puntos de tiempo, desde las 0 hasta las 140 horas de exposición a PZA, con intervalos de aproximadamente 28 horas. Observamos la diferencia en la presencia de POA extracelular entre las cepas control silvestre y las cepas *Rv0191* y *Rv1258c* delecionadas y solo en *Rv1258c* reprimida.

Adicionalmente, tomamos los valores de concentración acumulada de POA y los dividimos entre el tiempo de exposición, obteniendo de esta manera la velocidad inicial a la que el compuesto fue expulsado en cada punto de tiempo evaluado. La bondad de ajuste para nuestros datos en un modelo de regresión lineal fue fuerte ($R^2 > 0.5$) (Anexo 6), indicando que los valores de velocidad obtenidos mantienen una linealidad. Esto sugiere que el sistema aún no ha alcanzado la velocidad máxima (V_{max}) en la que este compuesto es expulsado, por lo que nuestros hallazgos corresponden a una velocidad de eflujo inicial de POA.

Esto significa que en el intervalo de tiempo estudiado cada punto de velocidad obtenido será igual a la velocidad máxima, al menos hasta que se evidencie un estado estacionario que refleje la saturación del sistema de eflujo y por lo tanto un

equilibrio entre los estados disociados (POA^-) expulsados y los no disociados (HPOA) que reingresan a través de la membrana.

Debido a la ausencia de mutaciones en el gen *pncA* en la cepa control MTB H37Rv silvestre, esperamos una conversión completa de PZA a POA (6.50 mM). Sin embargo, tras 140 horas de exposición al antibiótico solo se cuantificó 1.950 mM POA/OD₆₀₀ (IC 95 %: 1.620 - 2.270, DS 0.207) en la cepa silvestre y 1.630 mM POA/OD₆₀₀ (IC 95%: 1.310 - 1.950, DS 0.203) en la cepa MTB H37Rv:pLJR965.

Estos resultados nos permiten inferir dos escenarios: primero, una velocidad lenta en la hidrólisis de PZA a POA a cargo de la PZAsa explicaría porque tras 140 horas no se evidencia la totalidad de POA en el medio extracelular. Este escenario implica que para estas cepas (silvestre y H37Rv:pLJR965) en el medio intracelular existen 4.55 y 4.87 mM de PZA. Segundo, la cantidad total de PZA se ha hidrolizado en POA manteniéndose en un estado disociado (POA^-) en el medio intracelular, sin embargo, es expulsado de manera deficiente por un sistema de eflujo activo.

El segundo escenario presenta evidencia previa demostrada por Zhang y cols., quienes explican que el sistema de eflujo en MTB es deficiente, especialmente en condiciones de pH ácido, lo que facilita la acumulación intracelular de POA. En sus experimentos, demostraron que MSMEG posee un sistema de eflujo mucho más eficiente, permitiéndole liberar POA rápidamente al medio extracelular y evitar su acumulación intracelular. En contraste, MTB acumula POA debido a su

incapacidad para expulsarlo eficazmente, resultando en una mayor susceptibilidad a la PZA.

Adicionalmente, demostraron que MSMEG no acumula POA intracelularmente y muestra resistencia a PZA (MIC>2000 µg/ml). Sin embargo, cuando se inhibe el sistema de eflujo con reserpina, la acumulación de POA intracelular aumenta y la bacteria exhibe un estado de susceptibilidad a PZA. Reforzando estos hallazgos, Zimic y cols. han evidenciado que MSMEG es capaz de liberar POA al medio extracelular 900 veces más rápido que MTB (5222 versus 10.73 nmol/POA/(mg proteína)/min, respectivamente), destacando un sistema de eflujo mucho más activo en comparación con MTB (44).

Nuestros resultados evidencian que la represión del gen *Rv1258c* con un nivel de ARNm relativo de 0.195 (IC 95% 0.136 – 0.254, DS: 0,077), un valor 80.50 % más bajo que los niveles encontrados en el sistema no inducido a represión, demostró una reducción significativa de la concentración de POA acumulado en el medio extracelular, en comparación a la cepa MTB H37Rv silvestre (p valor<0.0001). Así, a 140 horas, la cepa reprimida presentó 0.679 mM POA/OD₆₀₀ (IC 95%: 0.411 - 0.948, DS: 0.256).

Esta relación también se observó en MTB H37Rv *Rv1258c* delecionado, presentando en este mismo punto de tiempo 1.030 mM POA/OD₆₀₀ (IC 95%: 0.926 -1.140, DS: 0.067). Aunque se observa en la cepa reprimida un menor eflujo a 140 horas en comparación a la cepa delecionada, la comparación de pendientes mostró

que no existe una diferencia significativa (p valor = 0.2647) entre ambas. La obtención de los datos de concentración de eflujo mostró un rango más amplio en los puntos evaluados cuando el gen *Rv1258c* se mantuvo reprimido, incluso este rango abarca los puntos obtenidos cuando el gen se encuentra deletado, esta observación se dio a los 54, 85 y 111 horas (Anexo 9).

Aunque los niveles de ARNm del gen *Rv0191* (0,09 IC 95%: 0,060 - 0,118, DS: 0.036) fueron menores y un porcentaje de disminución de la expresión mucho más elevada (91.09 %) no observamos un cambio en el fenotipo. En este punto podríamos inferir que el gen *Rv0191* no se encuentra asociado al eflujo de POA. Sin embargo, se ha reportado que algunos genes bajo el sistema CRISPRi necesitan niveles más bajos de ARNm para evidenciar un cambio en el fenotipo (105 - 107).

Por ejemplo, la represión parcial de los genes *PptT* (VI: -4.5220) y *TrxB2* (VI: -7.0590) en MTB necesitan una reducción de al menos el 95% para inhibir el crecimiento *in vitro* (104, 105). Por otro lado, evaluaciones durante la fase crónica de la infección demostraron que el nivel de expresión del gen *BioA* (VI: -0.2390) debe ser disminuido más del 90 % antes de que el crecimiento de MTB se vea severamente afectado *in vitro* (105). Este patrón no solo se presenta en genes esenciales y altamente vulnerables como *PptT* o *TrxB2*, sino también en genes no esenciales o con un grado de vulnerabilidad relativamente bajo como es el caso de *BioA*. Demostramos que este patrón es trazable hacia genes no vulnerables como *Rv0191* (VI: 1.1920), donde no se evidencia un cambio en la concentración de POA acumulado.

Dado este panorama no optamos por evaluar sgrNAs guía con una mayor fuerza de represión por factibilidad en el tiempo de desarrollo del estudio y por el grado de incertidumbre que existía al evaluar este gen. En su lugar, decidimos aprovechar la ausencia de esencialidad del gen para generar una cepa MTB H37Rv *Rv0191* delecionada (Figura 10). De esta manera, logramos observar a través de una comparación de pendientes que los niveles de concentración de POA acumulado se veían afectados significativamente, mostrando una reducción acentuada en comparación a la cepa control MTB H37Rv silvestre ($p < 0.0001$). A 140 horas, obtuvimos una concentración de 0.823 mM POA/OD₆₀₀ (IC 95%: 0.779 - 0.868, DS: 0.0279), un valor incluso por debajo de la cepa MTB *Rv1258c* delecionada (1.030 mM POA/OD₆₀₀).

Para complementar estos hallazgos, analizamos la velocidad inicial de flujo en la que cada concentración calculada previamente fue expulsada al medio extracelular. Observamos para las cepas control, MTB H37Rv silvestre y MTB H37Rv:pLJR965, una velocidad a 140 horas de 0.0140 mM POA/OD₆₀₀hora⁻¹ (IC 95%: 0.0117 - 0.0163, DS: 0.0014) y 0.0143 (IC 95%: 0.0103 - 0.0182, DS: 0.0025), respectivamente. En *Rv1258c* reprimido encontramos una velocidad 65.4 % menor a las cepas control siendo 0.0049 mM POA/OD₆₀₀hora⁻¹ (IC 95%: 0.0030 - 0.0068, DS: 0.0018), respecto a las cepas *Rv0191* delecionada (0.0068 mM POA/OD₆₀₀hora⁻¹) y *Rv1258c* delecionada (0.0059 mM POA/OD₆₀₀hora⁻¹) las velocidades se redujeron más allá de la mitad en comparación a la cepa control, siendo 51.9 y 58.4 %, respectivamente.

Es notable que la dinámica de eflujo de POA se ve reducida cuando existe una alteración en la expresión génica de *Rv0191* y *Rv1258c*. Sin embargo, ambos parámetros evaluados nunca llegan a ser completamente nulos. Bajo un sistema de represión génica, esto podría explicarse por la presencia, aunque reducida, de niveles de ARNm que pueden ser traducidos y cumplir la función de eflujo. Incluso cuando los genes se encuentran deletados, este efecto persiste.

Por otro lado, considerando que la delección génica se realizó de manera individual, sugerimos que los niveles reducidos de POA en el medio extracelular pueden deberse a un sistema redundante, donde más de una bomba de eflujo está involucrada en el proceso. Probablemente, cuando *Rv0191* se encuentra deletado, *Rv1258c* podría compensar parcialmente el eflujo de POA, y viceversa. No obstante, en ambos casos, el eflujo resulta ineficiente, ya que los niveles reducidos de POA se mantienen y no alcanzan los observados en las cepas control.

7.4. La reducción de la concentración y velocidad de eflujo de POA altera la susceptibilidad a PZA en MTB H37Rv.

De acuerdo a las investigaciones reportadas por Meizen y Zimic, la técnica de Wayne cuantitativa, empleada en este estudio, es capaz de determinar la presencia de resistencia en cepas de MTB a través de mediciones de OD₄₅₀. Obtuvieron una sensibilidad del 91.3% y una especificidad del 97.5% al quinto día frente a la exposición de 800 µg/ml de PZA en cepas clínicas (n: 184). Bajo estas condiciones, reportan que los valores de OD₄₅₀ en cepas resistentes son considerablemente menores, mostrando un promedio de 0.032 en comparación con las cepas sensibles, que tienen un valor promedio de 0.132 (43, 108).

Evaluamos estos valores entre las cepas modificadas genéticamente y las cepas control, empleando las mismas condiciones por Meinen. Evidenciamos una sensibilidad del 100% y una especificidad del 80% con un cut-off de 0.323 y un índice de Youden de 0.80, valores cercanos a los reportados por su grupo de investigación (Anexo 10F). Cabe mencionar que, en un tiempo de evaluación menor a 54 horas, la diferencia estadística se pierde, probablemente debido a la insuficiente concentración de POA para evidenciar una diferencia entre cepas modificadas genéticamente y las cepas control.

Agrupamos los valores obtenidos a 111 y 140 horas en las cepas modificadas genéticamente (promedio: 0.231, IC 95%: 0.210 – 0.252, DS: 0.05) en comparación a las cepas no modificadas (promedio: 0.408, IC 95%: 0.380 – 0.436, DS: 0.09). Esto nos permitió generar una primera aproximación clara hacia la evaluación de la adquisición de resistencia a la PZA en las cepas modificadas, ya que, bajo la premisa de que la técnica permite identificar patrones de resistencia, estos resultados indicaron que las cepas MTB H37Rv *Rv1258c* reprimida y *Rv0191/Rv1258c* delecionadas, al tener valores de OD₄₅₀ relativamente bajos, se considerarían resistentes a PZA.

Para confirmar esta aproximación, evaluamos el comportamiento de las cepas control MTB H37Rv silvestre y MTB H37Rv:pLJR965 frente a concentraciones de PZA desde 0 a 12800 µg/ml a pH:6.0 en microplaca. Obtuvimos valores de MIC para las cepas MTB H37Rv silvestre y MTB H37Rv:pLJR965 de 125.57 y 165.71

$\mu\text{g/ml}$ de PZA, respectivamente. En estas cepas, adicionalmente, se evaluó el crecimiento frente a POA, obteniendo valores MIC de 12.23 y 13.27 $\mu\text{g/ml}$. Estos valores son relativamente menores a los reportados previamente en otro estudio (25 $\mu\text{g/ml}$ de POA) obtenidos mediante ensayo en placa 7H10 a pH 6.8, condiciones ligeramente ácidas, donde tanto POA como PZA no presentarían una acción bactericida elevada (37).

Observamos que los valores de MIC obtenidos bajo este ensayo se encuentran dentro de lo reportado por otros investigadores (25 – 250 $\mu\text{g/ml}$ de PZA). Este es un rango amplio y variable, lo que demuestra una ausencia de evaluación estándar para obtener concentraciones inhibitorias de PZA bajo condiciones experimentales *in vitro*. Es posible que la actividad pH-dependiente del antibiótico explique esta variabilidad debido a los diferentes valores de pH empleados en otros ensayos (110 - 112).

Además del MIC, aquí reportamos valores de NIC para las cepas control frente a PZA y POA. El NIC es importante para determinar a qué concentraciones estos compuestos empiezan a demostrar efectos subletales en MTB, probablemente reduciendo su tasa de crecimiento, alterando el metabolismo y/o induciendo un estrés oxidativo. Estos efectos pueden contribuir a la formación de células persistentes. Se ha demostrado que MTB con una tasa de crecimiento rápida (23.1 horas) y lenta (69.3 horas) es capaz de adaptarse a concentraciones bajas de PZA (25 – 50 $\mu\text{g/ml}$), manteniendo una división celular en un estado estacionario

caracterizado por una reducción en la expresión de ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosomal (ARNr) 50S y 30S (112).

Encontramos que la cepa MTB *Rv1258c* reprimida, luego de inducir el sistema, el ARNm relativo se mantuvo representado en un 19.5 %. Por otro lado, aunque para el gen *Rv0191* reprimido la presencia de remanentes de ARNm fue menor (8.91 %), no evidenciaron un cambio significativo en la concentración acumulada y velocidad inicial de eflujo de POA. Cabe destacar que, inicialmente, ambas cepas fueron visualizadas bajo microscopio invertido en cultivos líquidos 7H9 a pH ácido (6.2) luego de 10 días de incubación bajo diferentes concentraciones de PZA (0, 100, 400 y 800 µg/ml).

Evidenciamos la formación de cordones característicos del crecimiento de MTB hasta 400 µg/ml de PZA para la cepa *Rv1258c* reprimida y hasta 100 µg/ml para la cepa *Rv0191* reprimida, adicionalmente se visualizó crecimiento de la cepa MTB H37Rv silvestre hasta 100 µg/ml de PZA (Anexo 11). Sin embargo, decidimos evaluar la susceptibilidad a PZA en cepas delecionadas en las que no existe ningún grado de incertidumbre sobre la presencia de expresión basal del ARNm.

Observamos un crecimiento de la cepa silvestre hasta 400 µg/ml y para las cepas delecionadas hasta 1600 µg/ml en ambos casos. Es notable que la capacidad de crecimiento de la cepa silvestre es 3.2 veces mayor en condiciones a pH de 6.2 respecto al crecimiento en microplaca a un pH de 6.0 (400 versus 125.57 µg/ml,

respectivamente) (Figura 21 y 22). Este hallazgo refuerza el hecho de que la PZA actúa con mayor eficiencia en entornos más ácidos.

Es probable que el crecimiento observado para las cepas delecionadas en un entorno más cercano a 6.0 refiera una capacidad de sobrevivencia 3.2 veces menor. Teóricamente, en estas condiciones, el crecimiento sería trazable a 500 $\mu\text{g/ml}$ de PZA. Sin embargo, es imperativo profundizar experimentalmente el comportamiento de estas cepas modificadas bajo condiciones más ácidas, ya que aquí no exploramos condiciones más ácidas a 6.2 para las cepas delecionadas.

Según Zhang, la actividad de la PZA depende en gran medida del pH del medio debido a cómo afecta la acumulación intracelular de POA. A pH 6.2, aunque el medio es ligeramente ácido, la acumulación de POA dentro de las células no es tan eficiente, requiriéndose una mayor concentración de PZA (400 $\mu\text{g/ml}$) para inhibir el crecimiento de la cepa. Por otro lado, a pH 6.0, el medio más ácido favorece una mayor acumulación de POA dentro de las células.

La ecuación de Henderson-Hasselbach, considerando el pKa del POA de aproximadamente 2.9, explica que a pH más bajos la forma no disociada del POA es mayor, facilitando su difusión pasiva a través de la membrana celular y resultando en una mayor acumulación intracelular. Como resultado, se requiere una menor concentración de PZA (135.27 $\mu\text{g/ml}$) para lograr una inhibición efectiva del crecimiento bacteriano porque la concentración de POA intracelular es mayor en comparación con pH 6.2.

Este fenómeno se alinea con la teoría de distribución pasiva, donde un pH más ácido facilita la acumulación intracelular de POA, aumentando la eficacia de la PZA a concentraciones más bajas. Explorar los niveles de concentración acumulada y la velocidad de eflujo inicial de POA al medio extracelular y la concentración intracelular bajo condiciones ácidas es esencial para comprender mejor este proceso.

Los estudios sobre el rol de los genes de interés evaluados en el mecanismo de resistencia a PZA son escasos. Solo existe evidencia de que alteraciones en la expresión del gen, específicamente en la sobreexpresión de *Rv0191*, o mutaciones en *Rv1258c* (S292L), están relacionadas con una disminución de la acumulación de POA en el medio intracelular, generan una adquisición de resistencia a PZA. En estudios previos, se encontraron valores de resistencia de 200 µg/ml para *Rv0191* sobreexpresado y 800 µg/ml para *Rv1258c* mutado (36, 37), valores menores a los encontrados en este estudio.

Cabe mencionar que las condiciones de evaluación de la susceptibilidad a PZA difieren en ambos casos. Cuando se evalúa el efecto de la sobreexpresión sobre la adquisición de resistencia, se realiza bajo un ensayo fenotípico en cultivo en placa, similar a nuestro estudio, pero el pH ensayado es cercano a un estado neutro (pH: 6.8), lo que puede sesgar los resultados debido a la baja actividad de la PZA. Por el contrario, la susceptibilidad en el gen *Rv1258c* mutado se evaluó a un pH ácido de

6.0, empleando la misma metodología, demostrando ser un estudio con mejor trazabilidad.

Es importante mencionar que ambos estudios reportan que el uso de agentes inhibidores de bombas de eflujo, como reserpina, piperina y verapamilo, genera un efecto de sensibilidad a la PZA, evidenciado por una ausencia de crecimiento en las concentraciones reportadas (200 y 800 $\mu\text{g/ml}$). Desde nuestro punto de vista, y en base a la experiencia obtenida y demostrada en este estudio, consideramos que realizar aseveraciones bajo un diseño experimental que involucra el uso de inhibidores de bombas de eflujo de amplio espectro puede generar conclusiones sesgadas.

Estos inhibidores pueden actuar sobre genes de bombas de eflujo esenciales que alteren el crecimiento de MTB. Es imperativo establecer este tipo de asociaciones bajo sistemas específicos que no alteren el crecimiento bacteriano (Figura 18B-G), como es el caso del sistema ORBIT empleado en este estudio para generar cepas MTB *Rv0191* y *Rv1258c* delecionadas. De esta manera, explicamos la diferencia entre los resultados obtenidos en este estudio y los mencionados anteriormente.

Nuestros hallazgos, aunque en principio pueden contradecir otros modelos que sugieren que este proceso no es necesario, implican, por ejemplo, estados de estrés celular independiente del pH del entorno extracelular (Modelo SigE) o la inhibición de genes importantes en procesos celulares a causa de la presencia de POA intracelular (Modelo *panD/clpC1*). No excluimos que estos procesos puedan ocurrir

de manera simultánea o en diferentes momentos de la respuesta celular contra la infección por MTB. Es imperativo estudiar este mecanismo bajo un enfoque holístico que profundice el grado de participación de los factores en estos modelos.

Hemos corroborado exitosamente las dos hipótesis planteadas en el presente estudio. Nuestro enfoque ha sido crucial para entender el rol de las bombas de eflujo *Rv0191* y *Rv1258c* en el mecanismo de acción y resistencia de la PZA en MTB H37Rv. En síntesis, la persistencia del crecimiento a una concentración elevada de 1600 µg/ml de PZA, incluso sin mutaciones en el gen *pncA*, en cepas con *Rv0191* y *Rv1258c* delecionadas, subraya la necesidad del sistema de eflujo para ejercer una acción bactericida. La reducción de la acumulación extracelular y la velocidad inicial a la que el POA efluye se confirma el rol crítico de estos genes en el efecto bactericida del antibiótico. Además, la alteración en la expresión génica en ambas bombas de eflujo sería un potencial mecanismo de adquisición de la resistencia a PZA en MTB H37Rv.

VIII. CONCLUSIONES

- Se identificaron 79 genes que codifican bombas de eflujo involucrados en la resistencia a antibióticos en MTB H37Rv. Entre ellos, 5 genes están involucrados en la resistencia a la PZA. De este grupo, se seleccionaron los genes *Rv0191* y *Rv1258c*, cuya sobreexpresión y/o presencia de mutaciones contribuyen a un fenotipo resistente a PZA en MTB.
- La transcripción de los genes *Rv0191* y *Rv1258c* que codifican bombas de eflujo en MTB H37Rv fue reprimida mediante la técnica de CRISPRi. Los niveles de expresión se redujeron 13.33 veces para *Rv0191* y 5.94 veces para *Rv1258c* en comparación a las cepas no reprimidas. La reducción de la expresión no afectó el crecimiento bacteriano.
- La delección de los genes *Rv0191* y *Rv1258c* en MTB H37Rv mediante la técnica de ORBIT fue exitosa y no afecta el crecimiento bacteriano de las cepas modificadas.
- Las cepas MTB H37Rv bajo represión del gen *Rv1258c* y delección de los genes *Rv0191* y *Rv1258c* exhiben niveles reducidos de concentración extracelular acumulada y velocidad inicial de eflujo de POA. La reducción en ambos parámetros es significativamente diferente a lo observado en la cepa MTB H37Rv silvestre.
- La reducción del eflujo de POA en las cepas *Rv0191* y *Rv1258c* delecionadas, junto a su capacidad de crecimiento a 1600 µg/ml de PZA, refuerzan la importancia del sistema de eflujo en el mecanismo bactericida.

IX. LIMITACIONES

Existen limitaciones que se deben abordar en relación al desarrollo del presente estudio. Aunque el enfoque y el diseño del estudio establecido nos ha permitido obtener resultados prometedores, existen consideraciones en cuanto a las técnicas empleadas. Por ejemplo, la tecnología de CRISPR de interferencia (CRISPRi) puede generar un efecto polar. Este efecto se refiere a la capacidad de CRISPRi para reprimir genes operónicos adicionales ubicados aguas abajo del sitio de unión de dCas9. En operones bacterianos, los genes están organizados en secuencia y transcritos juntos desde un solo promotor.

Cuando CRISPRi se dirige a un gen dentro de un operón, no solo puede reprimir ese gen específico, sino también potencialmente todos los genes *down-stream* debido a la interrupción de la transcripción. Aunque los genes *Rv0191* y *Rv1258c* no comparten promotor con otros genes, no evaluamos exhaustivamente el posible efecto polar hacia otros genes cercanos.

Los cambios fenotípicos observados podrían no ser atribuibles exclusivamente al gen blanco, sino también a la represión de otros genes. Es así que ante un efecto polar en genes esenciales existiría la posibilidad de un cambio en el crecimiento de la micobacteria lo que sesgaría los resultados. Por otro lado, en genes no esenciales con una función similar a los genes de interés no podría afectarse el crecimiento bacteriano, pero establecer asociaciones relacionadas a la expulsión de compuestos o hacia la adquisición de resistencia no sería del todo concluyente.

Adicionalmente, la eficacia de la represión de genes puede variar significativamente dependiendo de la proximidad del sitio de unión del sgRNA al sitio de inicio de la transcripción, esto puede hacer que algunos genes sean más difíciles de reprimir que otros, especialmente aquellos que están lejos del promotor.

Coincidimos con otros estudios en que, a pesar de generar un grado de represión notable, este efecto no siempre es trazable hacia un cambio fenotípico. Algunos genes necesitan folds de represión mucho más elevados para evidenciar un efecto. Hemos confirmado esto mediante una comparación entre el efecto fenotípico de un cambio en la dinámica de eflujo cuando el gen *Rv0191* se encuentra reprimido versus cuando se encuentra deletado, obteniendo evidencia de un cambio significativo solo cuando los niveles de transcripción del gen están completamente ausentes. Sin embargo, el gen *Rv1258c* mantiene una trazabilidad para el mismo efecto cuando se encuentra reprimido y deletado.

Respecto al sistema ORBIT, la eficiencia de la recombinación homóloga puede ser baja para inserciones grandes, como los sitios de integración de 60 pares de bases, lo que limita su efectividad en ciertas modificaciones genómicas. Además, un diseño inapropiado de los oligonucleótidos puede resultar en recombinaciones no específicas o fallidas. La eficacia del sistema también depende de la expresión y actividad funcional de las proteínas de recombinación de fagos, como RecT y la integrasa Bxb1, cuya variabilidad puede afectar significativamente la eficiencia del sistema.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2023 [Internet]. 2023. Available from: <https://iris.who.int/>.
2. Huang F, Zhao Y. Global Control of Tuberculosis: Current Status and Future Prospects. *Zoonoses (Ireland)*. 2022 Jan 6;2(1).
3. Kobashi Y. Current status and future landscape of diagnosing tuberculosis infection. Vol. 61, *Respiratory Investigation*. Elsevier B.V.; 2023. p. 563–78.
4. Poeta P, Silva V, Guedes A, Eduardo Pereira J, Cláudia Coelho A, Igrejas G. Tuberculosis in the 21th century: Current status of diagnostic methods. Vol. 44, *Experimental Lung Research*. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 352–60.
5. Alsayed SSR, Gunosewoyo H. Tuberculosis: Pathogenesis, Current Treatment Regimens and New Drug targets. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
6. Quispe N, Asencios L, Obregon C, Velasquez GE, Mitnick CD, Lindeborg M, et al. The fourth national anti-tuberculosis drug resistance survey in Peru. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2020 Feb 1;24(2):207–13.
7. Ministerio de Salud. Centro Nacional de Epidemiología P y C de E (MINSA) / C. Análisis de situación de salud del Perú, 2021 [Internet]. 2023. 144 p. Available from: www.dge.gob.pe

8. Asensios L, Quispe N, Mendoza-Ticona A, Leo E, Vásquez L, Jave O, et al. Vigilancia nacional de la resistencia a medicamentos antituberculosos, Perú 2005-2006*. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2009;26:278–87.
9. Espinosa-Pereiro J, Sánchez-Montalvá A, Aznar ML, Espiau M. MDR Tuberculosis Treatment. Vol. 58, Medicina (Lithuania). MDPI; 2022.
10. World Health Organization (OMS). Global tuberculosis report 2023 [Internet]. 2023. Available from: <https://iris.who.int/>.
11. Njire M, Tan Y, Mugweru J, Wang C, Guo J, Yew WW, et al. Pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: Review and update. Adv Med Sci [Internet]. 2016;61(1):63–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.advms.2015.09.007>
12. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: A review. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2003;7(1):6–21.
13. Konno K, Feldmann FM, Mcdermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. 1966.
14. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. Microbiol Spectr. 2014 Aug 15;2(4).
15. Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: Disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003;52(5):790–5.
16. Thiede JM, Dillon NA, Howe MD, Aflakpui R, Modlin SJ, Hoffner SE, et al. Pyrazinamide Susceptibility Is Driven by Activation of the SigE-

Dependent Cell Envelope Stress Response in *Mycobacterium tuberculosis*.
mBio. 2022;13(1).

17. Shi W, Chen J, Feng J, Cui P, Zhang S, Weng X, et al. Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2014;3(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2014.61>
18. Gopal P, Sarathy JP, Yee M, Rangunathan P, Shin J, Bhushan S, et al. Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase. *Nat Commun*. 2020;11(1):1661. doi: 10.1038/s41467-020-15516-1.
19. Gopal P, Yee M, Sarathy J, Liang Low J, Sarathy JP, Kaya F, et al. Pyrazinamide resistance is caused by two distinct mechanisms: Prevention of coenzyme a depletion and loss of virulence factor synthesis. *ACS Infect Dis*. 2016 Jul 11;2(9):616–26.
20. Ali A, Khan MT, Khan A, Ali S, Chinnasamy S, Akhtar K, et al. Pyrazinamide resistance of novel mutations in *pncA* and their dynamic behavior. *RSC Adv*. 2020 Sep 28;10(58):35565–73.
21. Aggarwal M, Singh A, Grover S, Pandey B, Kumari A, Grover A. Role of *pncA* gene mutations W68R and W68G in pyrazinamide resistance. *J Cell Biochem*. 2018 Mar 1;119(3):2567–78.
22. Karmakar M, Rodrigues CHM, Horan K, Denholm JT, Ascher DB. Structure guided prediction of Pyrazinamide resistance mutations in *pncA*. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).

23. 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.* 2021 Jan 11;11.
24. Zimic M, Sheen P, Quiliano M, Gutierrez A, Gilman RH. Peruvian and globally reported amino acid substitutions on the *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase suggest a conserved pattern of mutations associated to pyrazinamide resistance. *Infection, Genetics and Evolution.* 2010 Mar;10(2):346–9
25. 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;56(10):5186-93. doi: 10.1128/AAC.05385-11.
26. Wang Z, Tang Z, Heidari H, Molaeipour L, Ghanavati R, Kazemian H, et al. Global status of phenotypic pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates: an updated systematic review and meta-analysis. *J Chemother.* 2023;35(7):583–95. doi: 10.1080/1120009X.2023.2214473.
27. Velásquez GE, Calderon RI, Mitnick CD, Becerra MC, Huang CC, Zhang Z, et al. Pyrazinamide resistance assays and two-month sputum culture status in patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Nov 1;60(11):6766–73.
28. Calderón RI, Velásquez GE, Becerra MC, Zhang Z, Contreras CC, Yataco RM, et al. Prevalence of pyrazinamide resistance and Wayne assay

- performance analysis in a tuberculosis cohort in Lima, Peru. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2017 Aug 1;21(8):894–901.
29. Quiñones S, Gilman HR, Sheen P, Zimic M. Silencing of an efflux pump coding gene decreases the efflux rate of pyrazinoic acid in *Mycobacterium smegmatis*. 2021.
30. Lanoix JP, Ioerger T, Ormond A, Kaya F, Sacchettini J, Dartois V, et al. Selective inactivity of pyrazinamide against tuberculosis in C3HeB/FeJ mice is best explained by neutral pH of caseum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Feb 1;60(2):735–43.
31. Zhang Y, Scorpio A, Hiroshi Nikaido †, Sun Z. Role of Acid pH and Deficient Efflux of Pyrazinoic Acid in Unique Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide [Internet]. Vol. 181, *Journal of bacteriology*. 1999. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jb>.
32. Darby, C. M., Ingólfsson, H. I., Jiang, X., Shen, C., Sun, M., Zhao, N., Burns, K., Liu, G., Ehrt, S., Warren, J. D., Anderson, O. S., Brickner, S. J., & Nathan, C. (2013). Whole Cell Screen for Inhibitors of pH Homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068942>
33. Via, L. E., Savic, R., Weiner, D. M., Zimmerman, M. D., Prideaux, B., Irwin, S. M., Lyon, E., O'Brien, P., Gopal, P., Eum, S., Lee, M., Lanoix, J. P., Dutta, N. K., Shim, T. S., Cho, J. S., Kim, W., Karakousis, P. C., Lenaerts, A., Nuermberger, E., ... Dartois, V. (2015). Host-Mediated Bioactivation of Pyrazinamide: Implications for Efficacy, Resistance, and Therapeutic

- Alternatives. ACS Infectious Diseases, 1(5), 203–214.
<https://doi.org/10.1021/id500028m>
34. Lamont EA, Dillon NA, Baughn AD. The Bewildering Antitubercular Action of Pyrazinamide. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1128/MMBR>
35. Garima K, Pathak R, Tandon R, Rathor N, Sinha R, Bose M, et al. Differential expression of efflux pump genes of *Mycobacterium tuberculosis* in response to varied subinhibitory concentrations of antituberculosis agents. Tuberculosis. 2015 Mar 1;95(2):155–61
36. 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 MTB. Front Microbiol. 2019;10(FEB):1–7.
37. 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* [Internet]. 2017. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>.
38. Kumar S, Lekshmi M, Parvathi A, Ojha M, Wenzel N, Varela MF. Functional and structural roles of the major facilitator superfamily bacterial multidrug efflux pumps. Vol. 8, Microorganisms. MDPI AG; 2020.
39. Kim SH, Chang AB, Saier MH. Sequence similarity between multidrug resistance efflux pumps of the ABC and RND superfamilies. Vol. 150, Microbiology. Society for General Microbiology; 2004. p. 2493–5.
40. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: An update. Vol. 69, Drugs. 2009. p. 1555–623.

41. Schindler BD, Kaatz GW. Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. Vol. 27, Drug Resistance Updates. Churchill Livingstone; 2016. p. 1–13.
42. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev. 2015;28(2):337–418.
43. Laws M, Jin P, Rahman KM. Efflux pumps in *Mycobacterium tuberculosis* and their inhibition to tackle antimicrobial resistance. Vol. 30, Trends in Microbiology. Elsevier Ltd; 2022. p. 57–68.
44. 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(November 2012):41–6.
45. 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 [Internet]. 2009;89(2):109–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2009.01.004>
46. 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 [Internet]. 2012;92(1):84–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2011.09.002>
47. Rock JM, Hopkins FF, Chavez A, Diallo M, Chase MR, Gerrick ER, et al. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. Nat Microbiol. 2017;2(February):1–9.

48. Bosch B, DeJesus MA, Poulton NC, Zhang W, Engelhart CA, Zaveri A, et al. Genome-wide gene expression tuning reveals diverse vulnerabilities of MTB. *Cell* [Internet]. 2021;184(17):4579-4592.e24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.033>
49. Li S, Poulton NC, Chang JS, Azadian ZA, DeJesus MA, Ruecker N, et al. CRISPRi chemical genetics and comparative genomics identify genes mediating drug potency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Microbiol*. 2022 Jun 1;7(6):766–79.
50. Wang H, La Russa M, Qi LS. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and beyond. *Annu Rev Biochem*. 2016 Jun 2;85:227–64.
51. Light RW. Tuberculous pleural effusion. Vol. 16, *Turk Toraks Dergisi*. AVES İbrahim KARA; 2015. p. 1–9.
52. Murphy KC, Nelson SJ, Nambi S, Papavinasasundaram K, Baer CE, Sassetti CM. Orbit: A new paradigm for genetic engineering of mycobacterial chromosomes. *mBio*. 2018;9(6):1–20.
53. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch’s bacillus. Vol. 58, *J prev med hyg*. 2017.
54. Pezzella AT. History of Pulmonary Tuberculosis. Vol. 29, *Thoracic surgery clinics*. NLM (Medline); 2019. p. 1–17.
55. Natarajan A, Beena PM, Devnikar A V., Mali S. A systemic review on tuberculosis. Vol. 67, *Indian Journal of Tuberculosis*. Tuberculosis Association of India; 2020. p. 295–311.

56. Jones RM, Adams KN, Eldesouky HE, Sherman DR. The evolving biology of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance. Vol. 12, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
57. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Vol. 16, *Clinical Microbiology Reviews*. 2003. p. 463–96.
58. Jankute M, Cox JAG, Harrison J, Besra GS. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. Vol. 69, *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews Inc.; 2015. p. 405–23.
59. Angala SK, Belardinelli JM, Huc-Claustre E, Wheat WH, Jackson M. The cell envelope glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. Vol. 49, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. Informa Healthcare; 2014. p. 361–99.
60. Mishra AK, Driessen NN, Appelmek BJ, Besra GS. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: Structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host-pathogen interaction. Vol. 35, *FEMS Microbiology Reviews*. 2011. p. 1126–57.
61. Pirofski LA, Casadevall A. The state of latency in microbial pathogenesis. Vol. 130, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2020. p. 4525–31.
62. Sikri K, Tyagi JS. The evolution of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy models. 2013.

63. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. 2015;1952(2):479–91.
64. Ramirez-Busby SM, Rodwell TC, Fink L, Catanzaro D, Jackson RL, Pettigrove M, et al. A Multinational Analysis of Mutations and Heterogeneity in PZase, RpsA, and PanD Associated with Pyrazinamide Resistance in M/XDR *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–9.
65. Miotto P, Cirillo DM, Migliori GB. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular mechanisms challenging fluoroquinolones and pyrazinamide effectiveness. *Chest*. 2015 Apr 1;147(4):1135–43.
66. Modlin SJ, Marbach T, Werngren J, Mansjö M, Hoffner SE, Valafar F. Atypical genetic basis of pyrazinamide resistance in monoresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021 Jun 1;65(6).
67. Jureen P, Werngren J, Toro JC, Hoffner S. Pyrazinamide Resistance and *pncA* Gene Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(5):1852-1854.
68. 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).
69. Dillon NA, Peterson ND, Feaga HA, Keiler KC, Baughn AD. Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of trans-Translation and RpsA. *Sci*

Rep [Internet]. 2017;7(1):1–8. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-06415-5>

70. Kardan-Yamchi J, Kazemian H, Haeili M, Harati AA, Amini S, Feizabadi MM. Expression analysis of 10 efflux pump genes in multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019 Jun 1;17:201–8.
71. Gaurav A, Bakht P, Saini M, Pandey S, Pathania R. Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. *Microbiology (United Kingdom)*. 2023;169(5):1–13.
72. Yamasaki S, Zwama M, Yoneda T, Hayashi-Nishino M, Nishino K. Drug resistance and physiological roles of RND multidrug efflux pumps in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Vol. 169, *Microbiology (United Kingdom)*. Microbiology Society; 2023.
73. Quistgaard EM, Löw C, Guettou F, Nordlund P. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): Structures pave the way. Vol. 17, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 123–32.
74. Bosshart PD, Fotiadis D. Secondary Active Transporters. In: *Subcellular Biochemistry*. Springer New York; 2019. p. 275–99.
75. Kim J, Cater RJ, Choy BC, Mancina F. Structural Insights into Transporter-Mediated Drug Resistance in Infectious Diseases. Vol. 433, *Journal of Molecular Biology*. Academic Press; 2021.

76. Long F, Rouquette-Loughlin C, Shafer WM, Yu EW. Functional cloning and characterization of the multidrug efflux pumps NorM from *Neisseria gonorrhoeae* and YdhE from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Sep;52(9):3052–60.
77. Mohanty P, Patel A, Bhardwaj AK. Role of H- and D- mate-type transporters from multidrug resistant clinical isolates of *Vibrio fluvialis* in conferring fluoroquinolone resistance. *PLoS One*. 2012 Apr 23;7(4).
78. Begum A, Rahman MM, Ogawa W, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. Gene cloning and characterization of four MATE family multidrug efflux pumps from *Vibrio cholerae* non-O1. *Microbiol Immunol*. 2005;49(11):949–57.
79. Zhang D, Gao X, Song X, Zhou W, Hong W, Tian C, et al. Luteolin showed a resistance elimination effect on gentamicin by decreasing mate mRNA expression in *Trueperella pyogenes*. *Microbial Drug Resistance*. 2019 May 1;25(4):619–26.
80. Torres-Ruiz R, Rodriguez-Perales S. CRISPR-Cas9 technology: Applications and human disease modelling. *Brief Funct Genomics*. 2017 Jan 1;16(1):4–12.
81. Domínguez AA, Lim WA, Qi LS. Beyond editing: Repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. Vol. 17, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 5–15.
82. Ghavami S, Pandi A. CRISPR interference and its applications. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V.; 2021. p. 123–40.

83. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [Internet]. Available from: <http://science.sciencemag.org/>.
84. Larson MH, Gilbert LA, Wang X, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2180–96.
85. Parish T, Kumar A, editors. *Mycobacteria Protocols*. 4th ed. New York: Springer Science+Business Media; 2021. 743 p. (Methods in Molecular Biology; vol. 2314). DOI: 10.1007/978-1-0716-1460-0.
86. Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: Confronting the challenges of antibacterial discovery. Vol. 6, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007. p. 29–40.
87. Schnappinger D. Genetic approaches to facilitate antibacterial drug development. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Jul 1;5(7).
88. Rock J. Tuberculosis drug discovery in the CRISPR era. *PLoS Pathog.* 2019;15(9).
89. AlMatar M, Var I, Kayar B, Köksal F. Differential Expression of Resistant and Efflux Pump Genes in MDR-TB Isolates. *Endocr Metab ImmuneDisord Drug Targets.* 2019 Oct 9;20(2):271–87.
90. Wilson M, Derisi J, Kristensen HH, Imboden P, Rane S, Brown PO, et al. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization [Internet]. Available from: www.pnas.org.
91. Kremer L, Besra SG. Current status and future development of antitubercular chemotherapy. 2002.

92. Veziris N, Cambau E, Sougakoff W, Jarlier V, correspondant A. Rdsistance aux antituberculeux Resistance to antituberculous drugs [Internet]. Vol. 12, Archives de p6diatrie. 2005.
93. Binz TM, Wenzel SC, Schnell HJ, Bechthold A, Müller R. Heterologous expression and genetic engineering of the phenalinolactone biosynthetic gene cluster by using red/ET recombineering. ChemBioChem. 2008 Feb 15;9(3):447–54.
94. Braatsch S, Helmark S, Kranz H, Koebmann B, Jensen PR. *Escherichia coli* strains with promoter libraries constructed by Red/ET recombination pave the way for transcriptional fine-tuning. Biotechniques. 2008 Sep;45(3):335–7.
95. Vetcher L, Tian ZQ, McDaniel R, Rascher A, Reville WP, Hutchinson CR, et al. Rapid engineering of the geldanamycin biosynthesis pathway by Red/ET recombination and gene complementation. Appl Environ Microbiol. 2005 Apr;71(4):1829–35.
96. Rivero-Müller A, Lajić S, Huhtaniemi I. Assisted large fragment insertion by Red/ET-recombination (ALFIRE) - An alternative and enhanced method for large fragment recombineering. Nucleic Acids Res. 2007 May;35(10).
97. Westphal CH, Leder P, Westphal CH. Transposon-generated “knock-out” and “knock-in” gene-targeting constructs for use in mice. Current Biology [Internet]. 1997;7:530–3. Available from: <http://biomednet.com/elecref/0960982200700530>.

98. Zhang C, Kitsberg D, Chy H, Zhou Q, Morrison JR. Transposon-mediated generation of targeting vectors for the production of gene knockouts. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(3):1–7.
99. Li X, Weinstock GM, Murray BE. Generation of Auxotrophic Mutants of *Enterococcus faecalis*. Vol. 177, *Journal of Bacteriology*. 1995.
100. Akusobi C, BENGHOMARI SB, Zhu J, Wolf DL, Singhvi S, Dulberger LC, et al. High-density transposon mutagenesis in *Mycobacterium abscessus* identifies an essential penicillin-binding lipo-protein (PBP-lipo) involved in septal peptidoglycan synthesis and antibiotic sensitivity. *bioRxiv* [Internet]. 2019;1–47. Available from: <https://doi.org/10.1101/2021.07.01.450732>
101. Mendum TA, Chandran A, Williams K, Vordermeier HM, Villarreal-Ramos B, Wu H, et al. Transposon libraries identify novel *Mycobacterium bovis* BCG genes involved in the dynamic interactions required for BCG to persist during in vivo passage in cattle. *BMC Genomics*. 2019 May 28;20(1).
102. Borgers K, Vandewalle K, Van Hecke A, Michielsen G, Plets E, van Schie L, et al. Development of a Counterselectable Transposon to Create Markerless Knockouts from an 18,432-Clone Ordered *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Mutant Resource. *mSystems*. 2020 Aug 25;5(4).
103. Mcadam RA, Quan S, Smith DA, Bardarov S, Betts JC, Cook FC, et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv transposon library reveals insertions in 351 ORFs and mutants with altered virulence [Internet]. Vol. 148, *Microbiology*. 2002. Available from: www.sanger.ac.uk.

104. Dejesus MA, Gerrick ER, Xu W, Park SW, Long JE, Boutte CC, et al. Comprehensive essentiality analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* genome via saturating transposon mutagenesis. *mBio*. 2017 Jan 1;8(1).
105. Leblanc C, Prudhomme T, Tabouret G, Ray A, Burbaud S, Cabantous S, et al. 4'-Phosphopantetheinyl Transferase PptT, a New Drug Target Required for *Mycobacterium tuberculosis* Growth and Persistence In Vivo. *PLoS Pathog*. 2012 Dec;8(12).
106. Wei JR, Krishnamoorthy V, Murphy K, Kim JH, Schnappinger D, Alber T, et al. Depletion of antibiotic targets has widely varying effects on growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 8;108(10):4176–81.
107. Reddy BKK, Landge S, Ravishankar S, Patil V, Shinde V, Tantry S, et al. Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* pantothenate kinase vulnerability through target knockdown and mechanistically diverse inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(6):3312–26.
108. Zimic M, Loli S, Gilman RH, Gutierrez A, Fuentes P, Cotrina M, et al. A new approach for pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbial Drug Resistance*. 2012;18(4):372–5.
109. Shi W. Activity of pyrazinamide against *Mycobacterium tuberculosis* at neutral pH in pza-s1 minimal medium. *Antibiotics*. 2021 Aug 1;10(8).
110. Gumbo T, Chigutsa E, Pasipanodya J, Visser M, Van Helden PD, Sirgel FA, et al. The pyrazinamide susceptibility breakpoint above which combination therapy fails. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(9):2420–5.

111. Campanerut PAZ, Ghiraldi LD, Sposito FLE, Sato DN, Leite CQF, Hirata MH, et al. Rapid detection of resistance to pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* using the resazurin microtitre assay. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011 May;66(5):1044–6.
112. Pullan ST, Allnutt JC, Devine R, Hatch KA, Jeeves RE, Hendon-Dunn CL, et al. The effect of growth rate on pyrazinamide activity in *Mycobacterium tuberculosis* - insights for early bactericidal activity? *BMC Infect Dis*. 2016 May 17;16(1).

XI. ANEXOS

Anexo 1. Niveles de represión reportados por Rock. Et al. 2017.

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

Anexo 2. Protocolo de elaboración de células quimio-competentes.

Inoculación inicial:

1. A partir de una colonia aislada, inocular en 10 ml de caldo LB suplementado con tetraciclina en una proporción 1:1 (v/v).
2. Incubar a 37 °C durante 24 horas.

Cultivo secundario:

3. Tomar 5 ml del cultivo inicial y verter en 45 ml de caldo LB suplementado con tetraciclina en las mismas condiciones.
4. Incubar a 37 °C durante 2.5 horas o hasta alcanzar una densidad óptica (OD600) entre 0.35 y 0.40.

Precipitación de células:

5. Transferir las células en fase logarítmica temprana a un tubo de 50 ml.
6. Precipitar las células por centrifugación (a una velocidad adecuada, por ejemplo, 4,000 x g durante 10 minutos a 4 °C).

Lavado con CaCl₂:

7. Resuspender el pellet celular en 20 ml de CaCl₂ a una concentración de 20 mM.
8. Repetir el paso de centrifugación y resuspensión con CaCl₂ dos veces.

Resuspensión final y Alicuotado:

9. Resuspender las células en 1 ml de CaCl₂ 20 mM suplementado con glicerol al 15 %.
10. Alicuotar 100 µl de la suspensión celular en tubos de 0.6 ml.
11. Utilizar las células competentes el mismo día de su preparación o almacenar a -70°C.

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN.

Preparación de Muestras:

1. Utiliza crioviales estériles, agregando en cada uno 3 perlas de vidrio y 500 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8).
2. Toma una asada de un cultivo sólido puro y resuspende las micobacterias en el criovial usando el asa. Evita usar el vórtex.
3. Incuba los crioviales en un termo-block a 80°C durante 20 minutos.

Lisis de la Pared Celular y digestión de Proteínas y Lípidos:

4. Añade 50 µl de lisozima (10 mg/ml) al vial, homogeneiza con *vortex* e incuba a 37 °C durante toda la noche.
5. Incorpora 75 µl de SDS al 10% y 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Homogeneiza nuevamente con el *vortex* e incuba a 65°C por 3 horas. Alternativamente, puedes incubar a 56°C por 2 horas.
6. Agrega 100 µl de NaCl 5M al vial para facilitar la precipitación de proteínas.
7. Añade 100 µl de CTAB/NaCl (precalentado a 65°C), homogeneiza con el *vortex* e incuba por 10 minutos a 65°C.

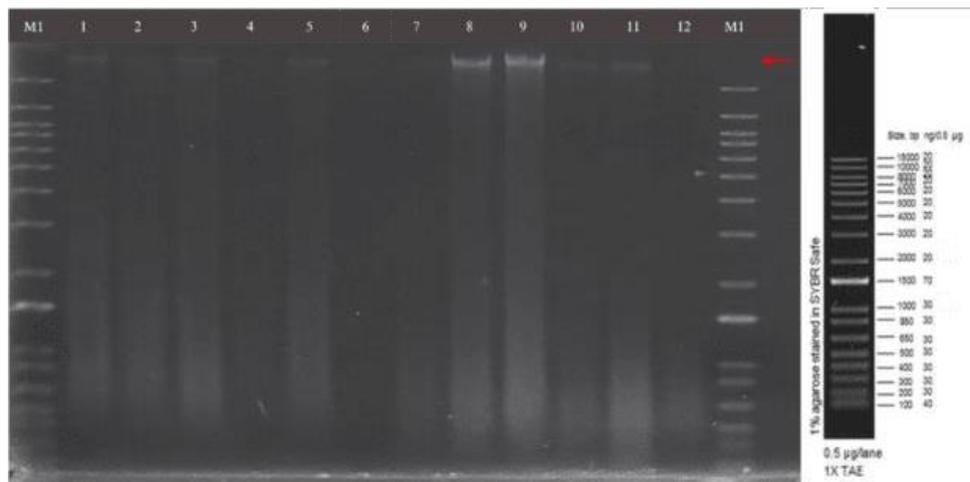
Extracción de Fase Orgánica:

8. Añade 750 µl de una mezcla de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), homogeneiza con el *vortex* y centrifuga a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Después, transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo.
9. Agrega 750 µl de cloroformo-isoamílico (24:1) al sobrenadante, homogeneiza y centrifuga bajo las mismas condiciones anteriores. Transfiere el sobrenadante limpio a otro tubo nuevo.

Precipitación del ADN:

10. Incorpora 1 ml de etanol frío, mezcla por inversión y congela a -70°C durante 15 minutos. Posteriormente, centrifuga a 10,000 rpm por 8 minutos.
11. Descarta el sobrenadante, añade 1 ml de alcohol frío al 70% y centrifuga a 10,000 rpm por 3 minutos. Descarta el sobrenadante.
12. Seca el pellet de ADN al aire y finalmente resuspende el ADN en 100 μl de buffer TE.

Anexo 4. Electroforesis de ADN a partir de cultivo de MTB H37Rv *knockdown*, *knockout*.



Nota. M1: Marcador 1 kb plus, Thermo Scientific. Carril 1-3: ADN genómico de MTB H37Rv:sgRNA *Rv0191* reprimida, Carril 4-6: ADN genómico de MTB H37Rv:sgRNA *Rv1258c* reprimida. Carril 7-9: ADN genómico de MTB H37Rv *Rv0191* delecionada, Carril 10-12: ADN genómico de MTB H37Rv *Rv1258c* delecionada.

Anexo 5. Operacionalización de variables de estudio

Variable	Definición Conceptual	Tipo de Variable (según su naturaleza)	Tipo de variable (según su relación)	Escala de medición	Indicador	Definición operacional
Niveles de ARN mensajero (ARNm)	Cantidad de ARN mensajero específico de los genes <i>Rv0191</i> y <i>Rv1258c</i> bajo el sistema de represión genica.	Cuantitativa (Continua)	Independiente	Escala de razón	Nivel de ARNm relativo	Medición de ARNm mediante PCR en tiempo real, normalizado respecto a un control constitutivo (<i>SigA</i>)
Delección génica	Eliminación de genes específicos (<i>Rv0191</i> y <i>Rv1258c</i>) en cepas de MTB	Cualitativa (Dicotómica)	Independiente	Nominal	Presencia/Ausencia de genes	Confirmación por PCR y secuenciación de delección de genes <i>Rv0191</i> y <i>Rv1258c</i>
Crecimiento Bacteriano (<i>Fitness</i>)	Evaluación de la densidad poblacional de MTB H37Rv bajo condiciones de <i>Knockdown</i> y <i>Knockout</i>	Cuantitativa (Continua)	Dependiente	Escala de razón	Valor de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm (OD600)	Medición de la densidad óptica a 600 nm ajustada a un modelo logístico.
Concentración de Ácido pirazinoico	Medición de la concentración de ácido pirazinoico extruido al medio extracelular en cepas modificadas genéticamente	Cuantitativa (Continua)	Dependiente	Escala de razón	Concentración de POA (mM/OD600)	Acumulación extracelular de POA a diferentes intervalos de tiempo (0, 25, 54, 85, 111 y 140 horas)
Velocidad inicial de Eflujo de Ácido pirazinoico	Tasa a la cual el POA es extruido al medio extracelular	Cuantitativa (Continua)	Dependiente	Escala de razón	Velocidad de eflujo de POA (mM/OD600xhora ⁻¹)	Velocidad inicial de eflujo de POA en diferentes intervalos de tiempo (0, 25, 54, 85, 111 y 140 horas)
Densidad Óptica a 450 nm	Densidad óptica obtenida a través de la técnica de Wayne en los ensayos de Eflujo y velocidad de eflujo de POA	Cuantitativa (Continua)	Dependiente	Escala de razón	Valor de absorbancia a una longitud de onda de 450 nm (OD450)	Medición de la densidad óptica obtenida a través de la técnica de Wayne cuantificada como el valor de absorbancia a 450 nm y normalizada con el crecimiento bacteriano (OD600)
Susceptibilidad a Pirazinamida	Capacidad de las cepas modificadas y cepas control para crecer en presencia de diferentes concentraciones de pirazinamida (0 - 1600 µg/ml)	Cualitativa (Dicotómica)	Dependiente	Nominal	Presencia/Ausencia de resistencia a pirazinamida	Crecimiento fenotípico de colonias de las cepas MTB H37Rv <i>knockdown</i> o <i>knockout</i> y cepas control MTB H37Rv <i>wild-type</i> a diferentes concentraciones de pirazinamida (0 - 1600 µg/ml).

Anexo 6. Comparación de pendientes a partir de los valores de concentración acumulada de POA y velocidad inicial de eflujo.

- Concentración acumulada de POA extracelular.

Sistema de MG	Gen Target	Ecuación de la recta	Pendiente (m)	Pendiente (IC 95 %)	Pendiente (DS)	R ²	p valor (vs MTB H37Rv)
<i>Knockdown</i>	<i>Rv0191</i>	$Y = 0.01399 \cdot X - 0.1846$	0,01399	0.01207 – 0.01590	0,00090	0,94	0,7047
<i>Knockdown</i>	<i>Rv1258c</i>	$Y = 0.006039 \cdot X - 0.1090$	0,00604	0.00372 – 0.00836	0,00109	0,66	< 0,0001
<i>Knockdown</i>	H37Rv:pLJR965	$Y = 0.01275 \cdot X - 0.2023$	0,01275	0.01053 – 0.01498	0,00100	0,94	0,2543
<i>Knockdown</i>	H37Rv <i>Wild-type</i>	$Y = 0.01455 \cdot X - 0.2003$	0,01455	0.01197 – 0.01712	0,00116	0,94	-

Sistema de MG	Gen Target	Ecuación de la recta	Pendiente (m)	Pendiente (IC 95 %)	Pendiente (DS)	R ²	p valor (vs MTB H37Rv)
<i>Knockout</i>	<i>Rv0191</i>	$Y = 0.006399 \cdot X - 0.1443$	0,00640	0.00473 – 0.00807	0,00075	0,88	< 0,0001
<i>Knockout</i>	<i>Rv1258c</i>	$Y = 0.007659 \cdot X - 0.1172$	0,00766	0.00634 – 0.00898	0,00059	0,94	< 0,0001
<i>Knockout</i>	H37Rv:pLJR965	$Y = 0.01275 \cdot X - 0.2023$	0,01275	0.01053 – 0.01498	0,00100	0,94	0,2543
<i>Knockout</i>	H37Rv <i>Wild-type</i>	$Y = 0.01455 \cdot X - 0.2003$	0,01455	0.01197 – 0.01712	0,00116	0,94	-

- Velocidad inicial de eflujo de POA.

Sistema de MG	Gen Target	Ecuación de la recta	Pendiente (m)	Pendiente (IC 95 %)	Pendiente (DS)	R ²	p valor (vs MTB H37Rv)
<i>Knockdown</i>	<i>Rv0191</i>	$Y = 0.0001066 \cdot X + 0.0003203$	0,000107	0.00473 – 0.00807	0,0000140	0,78	0,613
<i>Knockdown</i>	<i>Rv1258c</i>	$Y = 4.706 \cdot 10^{-5} \cdot X - 0.0003719$	0,000047	0.00634 – 0.00898	0,0000108	0,54	0,0037
<i>Knockdown</i>	H37Rv:pLJR965	$Y = 0.0001100 \cdot X - 0.0006891$	0,000110	0.01053 – 0.01498	0,0000086	0,94	0,3309
<i>Knockdown</i>	H37Rv <i>Wild-type</i>	$Y = 9.683 \cdot 10^{-5} \cdot X + 0.0003024$	0,000097	0.01197 – 0.01712	0,0000100	0,90	-

Sistema de MG	Gen Target	Ecuación de la recta	Pendiente (m)	Pendiente (IC 95 %)	Pendiente (DS)	R ²	p valor (vs MTB H37Rv)
<i>Knockout</i>	<i>Rv0191</i>	$Y = 5.048 \cdot 10^{-5} \cdot X - 0.0008664$	0,00005	0.00473 – 0.00807	0,0000054	0,90	0,0006
<i>Knockout</i>	<i>Rv1258c</i>	$Y = 5.390 \cdot 10^{-5} \cdot X - 0.0003117$	0,00005	0.00634 – 0.00898	0,0000069	0,86	0,0021
<i>Knockout</i>	H37Rv:pLJR965	$Y = 0.0001100 \cdot X - 0.0006891$	0,00011	0.01053 – 0.01498	0,0000086	0,94	0,3309
<i>Knockout</i>	H37Rv <i>Wild-type</i>	$Y = 9.683 \cdot 10^{-5} \cdot X + 0.0003024$	0,00010	0.01197 – 0.01712	0,0000100	0,90	-

Nota. En las tablas: MG: Modificación Genética. Knockout: Delección Génica, Knockdown: Represión Génica. Target: Gen Blanco. IC 95%: Intervalo de confianza al 95%. DS: Desviación Estándar.

Anexo 7 Diseño de placa y datos de susceptibilidad en microplaca para las cepas control MTB H37Rv silvestre y MTB H37Rv:pLJR965

DISEÑO DE PLACA: Susceptibilidad en microplaca - Cepas Control MTB H37Rv Wild-type, MTB H37Rv:pLJR965

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	12800	50,00	0,1953	400,00	12800	50,00	0,1953	400,00	6400	25,00	Control S/antibiotico	Blanco	
B	6400	25,00	0,0977	133,33	6400	25,00	0,0977	133,33	3200	12,50	Control S/antibiotico	Blanco	
C	3200	12,50	0,0488	44,44	3200	12,50	0,0488	44,44	1600	6,25	Control S/antibiotico	Blanco	
D	1600	6,25	0,0244	14,81	1600	6,25	0,0244	14,81	800	3,1250	Control S/antibiotico	Blanco	
E	800	3,1250	0,0122	4,94	800	3,1250	0,0122	4,94	400	1,5625	Control S/antibiotico	Blanco	
F	400	1,5625	0,0061	1,65	400	1,5625	0,0061	1,65	200	0,7813	Control S/antibiotico	Blanco	
G	200	0,7813	0,0031	0,5487	200	0,7813	0,0031	0,5487	100	0,3906	Control S/antibiotico	Blanco	
H	100	0,3906	0,0015	0,1829	100	0,3906	0,0015	0,1829	50	0,1953	Control S/antibiotico	Blanco	
		PZA (ug/ml)				PZA (ug/ml)				POA (ug/ml)			

- Datos: Wild-type: MTB H37Rv silvestre – M1: Medición 1, M2: Medición 2, RB: Replica

RBI_M1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,038	0,443	0,550	0,060	0,038	0,411	0,477	0,073	0,041	0,048	0,509	0,039
B	0,039	0,439	0,509	0,092	0,038	0,441	0,483	0,043	0,041	0,321	0,461	0,040
C	0,040	0,483	0,474	0,349	0,038	0,474	0,492	0,164	0,060	0,341	0,473	0,041
D	0,042	0,491	0,491	0,381	0,044	0,476	0,495	0,321	0,042	0,429	0,478	0,043
E	0,048	0,486	0,496	0,446	0,050	0,512	0,508	0,408	0,039	0,464	0,502	0,043
F	0,077	0,497	0,511	0,419	0,082	0,537	0,512	0,421	0,040	0,549	0,502	0,040
G	0,059	0,493	0,505	0,418	0,185	0,530	0,543	0,434	0,039	0,559	0,536	0,043
H	0,064	0,502	0,513	0,460	0,312	0,528	0,517	0,395	0,040	0,554	0,573	0,041

RBI_M2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,038	0,452	0,548	0,061	0,038	0,427	0,477	0,074	0,040	0,046	0,516	0,039
B	0,039	0,440	0,506	0,096	0,039	0,443	0,484	0,043	0,041	0,324	0,465	0,040
C	0,040	0,491	0,481	0,347	0,038	0,470	0,493	0,170	0,060	0,342	0,477	0,041
D	0,042	0,495	0,495	0,380	0,045	0,480	0,497	0,320	0,042	0,432	0,482	0,043
E	0,048	0,492	0,500	0,447	0,049	0,514	0,513	0,411	0,039	0,462	0,500	0,042
F	0,060	0,503	0,512	0,417	0,087	0,543	0,514	0,421	0,040	0,558	0,504	0,041
G	0,059	0,491	0,506	0,420	0,186	0,539	0,545	0,437	0,039	0,563	0,536	0,043
H	0,061	0,510	0,527	0,459	0,335	0,539	0,523	0,394	0,040	0,555	0,571	0,041

RBZ_M1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,038	0,079	0,392	0,076	0,038	0,163	0,403	0,040	0,040	0,042	0,064	0,040
B	0,040	0,282	0,476	0,083	0,038	0,375	0,433	0,044	0,041	0,042	0,189	0,042
C	0,038	0,415	0,486	0,356	0,039	0,427	0,427	0,080	0,072	0,212	0,418	0,040
D	0,043	0,496	0,465	0,299	0,050	0,453	0,446	0,140	0,042	0,322	0,457	0,041
E	0,048	0,485	0,501	0,358	0,049	0,476	0,463	0,276	0,039	0,390	0,461	0,047
F	0,052	0,475	0,487	0,361	0,058	0,479	0,468	0,307	0,040	0,440	0,209	0,042
G	0,055	0,460	0,417	0,302	0,078	0,450	0,448	0,311	0,040	0,414	0,111	0,040
H	0,041	0,353	0,347	0,230	0,119	0,380	0,405	0,235	0,041	0,324	0,096	0,044

RBZ_M2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,038	0,090	0,397	0,085	0,038	0,188	0,421	0,040	0,040	0,042	0,062	0,040
B	0,040	0,280	0,476	0,082	0,038	0,375	0,433	0,044	0,041	0,042	0,193	0,042
C	0,038	0,414	0,488	0,356	0,039	0,427	0,427	0,081	0,072	0,212	0,420	0,040
D	0,043	0,496	0,465	0,299	0,050	0,452	0,446	0,140	0,042	0,321	0,458	0,041
E	0,047	0,485	0,501	0,358	0,049	0,476	0,462	0,276	0,039	0,389	0,460	0,048
F	0,053	0,473	0,487	0,362	0,058	0,479	0,468	0,307	0,040	0,438	0,209	0,042
G	0,059	0,457	0,416	0,302	0,077	0,450	0,448	0,311	0,040	0,415	0,107	0,040
H	0,042	0,361	0,347	0,234	0,127	0,383	0,406	0,243	0,041	0,338	0,096	0,044

	E1				E2				E1		C+	B
	PZA	PZA	PZA	PZA	PZA	PZA	PZA	PZA	POA	POA		
A	-0,003	0,406	0,508	0,019	-0,003	0,378	0,436	0,032	-0,001	0,006	0,471	-0,002
B	-0,002	0,399	0,467	0,053	-0,003	0,401	0,442	0,002	0,000	0,281	0,422	-0,001
C	-0,002	0,446	0,436	0,307	-0,003	0,431	0,451	0,126	0,019	0,300	0,434	-0,001
D	0,001	0,451	0,452	0,339	0,003	0,437	0,455	0,280	0,001	0,389	0,439	0,002
E	0,007	0,448	0,457	0,405	0,008	0,472	0,469	0,368	-0,002	0,422	0,460	0,001
F	0,027	0,458	0,470	0,377	0,043	0,499	0,472	0,380	-0,001	0,512	0,462	-0,001
G	0,018	0,451	0,464	0,378	0,144	0,493	0,503	0,394	-0,002	0,519	0,495	0,002
H	0,021	0,465	0,478	0,418	0,282	0,492	0,479	0,353	-0,001	0,514	0,531	0,000

	E1				E2				E1		C+	B
	PZA	PZA	PZA	PZA	PZA	PZA	PZA	PZA	POA	POA		
A	-0,004	0,043	0,352	0,038	-0,004	0,134	0,370	-0,002	-0,002	0,000	0,021	-0,002
B	-0,002	0,239	0,434	0,041	-0,004	0,333	0,391	0,002	-0,001	0,000	0,149	0,000
C	-0,004	0,372	0,445	0,314	-0,003	0,385	0,385	0,039	0,030	0,170	0,377	-0,002
D	0,001	0,454	0,423	0,257	0,008	0,410	0,404	0,098	0,000	0,280	0,416	-0,001
E	0,005	0,443	0,459	0,316	0,007	0,434	0,421	0,234	-0,003	0,348	0,419	0,005
F	0,010	0,432	0,445	0,320	0,016	0,437	0,426	0,265	-0,002	0,397	0,167	0,000
G	0,015	0,416	0,375	0,260	0,035	0,408	0,406	0,269	-0,002	0,372	0,067	-0,002
H	-0,001	0,315	0,305	0,190	0,081	0,340	0,363	0,197	-0,001	0,289	0,054	0,002

biológica

Datos: MTB H37Rv:pLJR965– M1: Medición 1, M2: Medición 2, RB: Replica biológica

RB1_M1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,039	0,176	0,513	0,044	0,038	0,276	0,543	0,042	0,039	0,057	0,611	0,040
B	0,039	0,283	0,438	0,094	0,037	0,371	0,426	0,041	0,041	0,068	0,357	0,039
C	0,038	0,334	0,446	0,266	0,038	0,416	0,468	0,047	0,200	0,212	0,387	0,040
D	0,042	0,354	0,427	0,361	0,044	0,472	0,455	0,255	0,045	0,310	0,403	0,044
E	0,044	0,410	0,427	0,380	0,046	0,508	0,500	0,347	0,039	0,392	0,398	0,039
F	0,047	0,448	0,459	0,365	0,090	0,474	0,465	0,363	0,058	0,425	0,394	0,040
G	0,049	0,452	0,384	0,398	0,126	0,479	0,467	0,309	0,046	0,399	0,408	0,041
H	0,088	0,581	0,540	0,407	0,256	0,475	0,524	0,434	0,062	0,610	0,662	0,045

RB1_M2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,039	0,176	0,513	0,044	0,038	0,276	0,543	0,042	0,039	0,057	0,611	0,040
B	0,039	0,283	0,438	0,094	0,037	0,371	0,426	0,041	0,041	0,068	0,357	0,039
C	0,038	0,334	0,446	0,266	0,038	0,416	0,468	0,047	0,200	0,212	0,387	0,040
D	0,042	0,354	0,427	0,361	0,044	0,472	0,455	0,255	0,045	0,310	0,403	0,044
E	0,044	0,410	0,427	0,380	0,046	0,508	0,500	0,347	0,039	0,392	0,398	0,039
F	0,047	0,448	0,459	0,365	0,090	0,474	0,465	0,363	0,058	0,425	0,394	0,040
G	0,049	0,452	0,384	0,398	0,126	0,479	0,467	0,309	0,046	0,399	0,408	0,041
H	0,088	0,581	0,540	0,407	0,256	0,475	0,524	0,434	0,062	0,610	0,662	0,045

RB2_M1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,039	0,219	0,584	0,050	0,039	0,324	0,635	0,043	0,039	0,050	0,687	0,040
B	0,039	0,281	0,431	0,090	0,037	0,370	0,421	0,041	0,041	0,069	0,360	0,040
C	0,038	0,327	0,441	0,274	0,039	0,414	0,464	0,047	0,200	0,204	0,403	0,040
D	0,042	0,348	0,422	0,366	0,044	0,469	0,458	0,259	0,045	0,312	0,408	0,043
E	0,044	0,409	0,435	0,376	0,046	0,509	0,506	0,344	0,040	0,385	0,410	0,040
F	0,046	0,459	0,453	0,370	0,092	0,472	0,473	0,355	0,057	0,425	0,393	0,040
G	0,090	0,450	0,379	0,399	0,127	0,483	0,474	0,323	0,051	0,401	0,419	0,041
H	0,121	0,654	0,611	0,444	0,258	0,543	0,575	0,525	0,066	0,716	0,763	0,045

RB2_M2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,039	0,219	0,584	0,050	0,039	0,324	0,635	0,043	0,039	0,050	0,687	0,040
B	0,039	0,281	0,431	0,090	0,037	0,370	0,421	0,041	0,041	0,069	0,360	0,040
C	0,038	0,327	0,441	0,274	0,039	0,414	0,464	0,047	0,200	0,204	0,403	0,040
D	0,042	0,348	0,422	0,366	0,044	0,469	0,458	0,259	0,045	0,312	0,408	0,043
E	0,044	0,409	0,435	0,376	0,046	0,509	0,506	0,344	0,040	0,385	0,410	0,040
F	0,046	0,459	0,453	0,370	0,092	0,472	0,473	0,355	0,057	0,425	0,393	0,040
G	0,090	0,450	0,379	0,399	0,127	0,483	0,474	0,323	0,051	0,401	0,419	0,041
H	0,121	0,654	0,611	0,444	0,258	0,543	0,575	0,525	0,066	0,716	0,763	0,045

RB1	E1			E2			E1		C+	B		
	PZA	PZA	PZA	PZA	PZA	PZA	POA	POA				
A	-0,002	0,135	0,472	0,003	-0,003	0,235	0,502	0,001	-0,002	0,016	0,570	-0,001
B	-0,002	0,242	0,397	0,053	-0,004	0,330	0,385	0,000	0,000	0,027	0,316	-0,002
C	-0,003	0,293	0,405	0,225	-0,003	0,375	0,427	0,006	0,159	0,171	0,346	-0,001
D	0,001	0,313	0,386	0,320	0,003	0,431	0,414	0,214	0,004	0,269	0,362	0,003
E	0,003	0,369	0,386	0,339	0,005	0,467	0,459	0,306	-0,002	0,351	0,357	-0,002
F	0,006	0,407	0,418	0,324	0,049	0,433	0,424	0,322	0,017	0,384	0,353	-0,001
G	0,008	0,411	0,343	0,357	0,085	0,438	0,426	0,268	0,005	0,358	0,367	0,000
H	0,047	0,540	0,499	0,366	0,215	0,434	0,483	0,393	0,021	0,569	0,621	0,004

RB2	E1			E2			E1		C+	B		
	PZA	PZA	PZA	PZA	PZA	PZA	POA	POA				
A	-0,002	0,178	0,543	0,009	-0,003	0,283	0,594	0,001	-0,002	0,009	0,646	-0,001
B	-0,002	0,240	0,390	0,049	-0,004	0,329	0,380	0,000	0,000	0,028	0,319	-0,002
C	-0,003	0,286	0,400	0,233	-0,002	0,373	0,423	0,006	0,158	0,163	0,362	-0,001
D	0,000	0,307	0,381	0,325	0,003	0,428	0,417	0,218	0,004	0,271	0,367	0,002
E	0,003	0,368	0,394	0,335	0,005	0,468	0,464	0,303	-0,002	0,344	0,369	-0,001
F	0,005	0,418	0,412	0,329	0,051	0,431	0,431	0,314	0,016	0,384	0,352	-0,001
G	0,049	0,409	0,338	0,358	0,086	0,442	0,433	0,282	0,010	0,359	0,378	0,000
H	0,080	0,612	0,570	0,403	0,217	0,502	0,534	0,484	0,025	0,675	0,722	0,004

MIC calculado					
Cepa Control	Pendiente (m, Log PZA μ M)	IC 95 % (m)	MIC (μ M)	IC 95 % (MIC)	R ²
MTB H37Rv	3.439	2.808 - 4.305	1020	808.2 - 1289	98.41
MTB H37Rv:pLJR965	2.174	1.816 - 2.647	1346	981.1 - 1857	98.24

MIC calculado					
Cepa Control	Pendiente (m, Log POA μ M)	IC 95 % (m)	MIC (μ M)	IC 95 % (MIC)	R ²
MTB H37Rv	4.639	3.630 - 6.195	98.58	84.35 - 115.8	98.88
MTB H37Rv:pLJR965	3.140	2.580 - 3.831	106.9	91.11 - 127.6	99.18

NIC calculado					
Cepa Control	Pendiente (m, Log PZA μ M)	IC 95 % (m)	NIC (μ M)	IC 95 % (NIC)	R ²
MTB H37Rv	3.439	2.808 - 4.305	165.3	128.6 - 206.6	98.41
MTB H37Rv:pLJR965	2.174	1.816 - 2.647	75.69	53.49 - 103.2	98.24

NIC calculado					
Cepa Control	Pendiente (m, Log POA μ M)	IC 95 % (m)	NIC (μ M)	IC 95 % (NIC)	R ²
MTB H37Rv	4.639	3.630 - 6.195	25.58	19.66 - 32.01	98.88
MTB H37Rv:pLJR965	3.140	2.580 - 3.831	14.57	10.73 - 18.71	99.18

Anexo 8. Estandarización de la clonación del sistema CRISPRi.

Condiciones de Estandarización	
Tiempo de Incubación BsmBI	4 horas 12 horas
Unidades de Enzima BsmBI	2.5 U 5 U 10 U
Hibridación de Oligonucleotidos (ARNg)	2 μ l de oligonucleotidos a 100 μ M (Fw + Rv)
Ligación de Oligonucleotidos Hibridados	Sin Dilución Dilución 1/20 Dilución 1/100

- Concentración de plásmido linealizado.

Plásmido pLJR965 Linealizado	
Unidad Enzimática (U)	Concentración (ng/ μ l)
2.5	10.07
5	12.32
10	9.90

- Reacciones de ligación

Reactivo	Primer Ensayo		Segundo Ensayo	
	5 U BsmBI	10 U BsmBI	2.5 U BsmBI	5 U BsmBI
Agua PCR	1.95 µl	1.85 µl	1.86 µl	2.1 µl
Buffer Ligasa T4	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
pLR965 Linealizado	0.8 µl (9 ng)	0.9 µl (9 ng)	0.89 µl (9 ng)	0.65 µl (9 ng)
Producto de oligonucleótidos hibridados	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Enzima Ligasa T4	1.25 µl	1.25 µl	1.25 µl	1.25 µl
Volumen Total	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

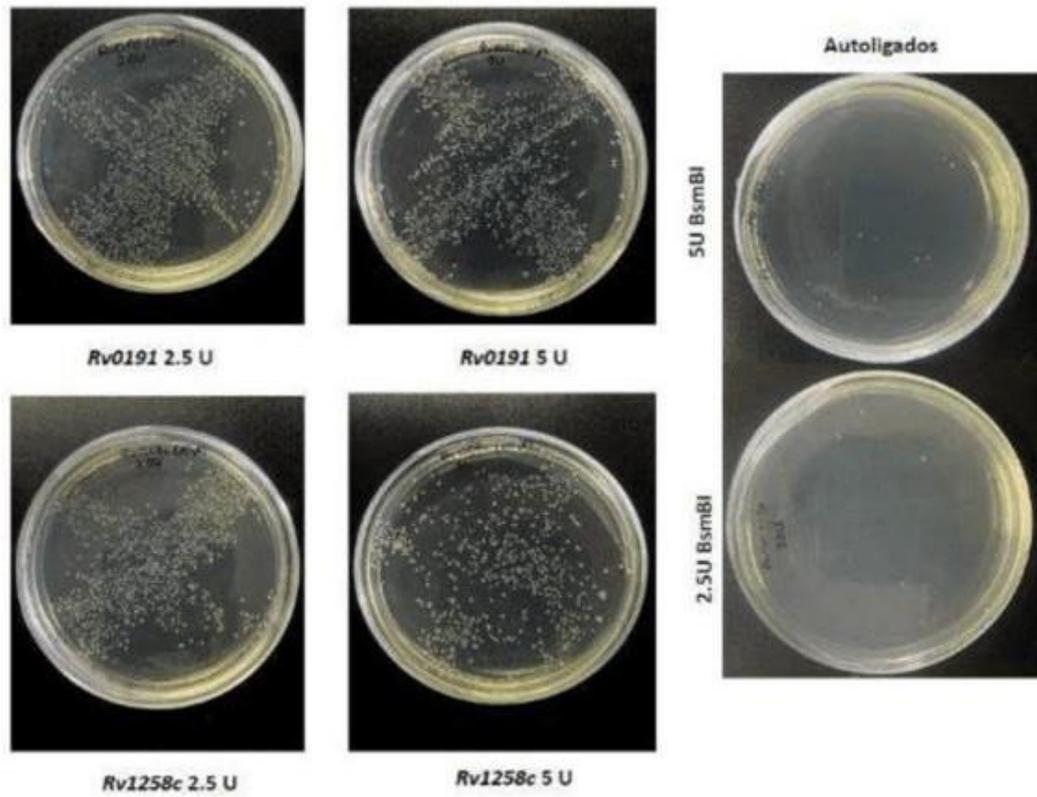
- Número de colonias luego de transformación en *E. coli* NovaBlue respecto a las condiciones de digestión.

Dilución de Hibridado (ARNg)	ARNg Evaluado	Número de Colonias			
		Tiempo de Digestión Enzimática			
		4 horas		12 horas	
		10 U BsmBI	5 U BsmBI	5 U BsmBI	2.5 U BsmBI
Sin Dilución	<i>groEl</i>	1000	904	-	-
	<i>Rv0191</i>	756	904	-	-
	<i>Rv1258c</i>	-	-	-	-
Dilución 1/20	<i>groEl</i>	1500	1356	-	-
	<i>Rv0191</i>	1134	1350	-	-
	<i>Rv1258c</i>	-	-	-	-
Dilución 1/100	<i>groEl</i>	2000	1808	1740	2640
	<i>Rv0191</i>	1512	1808	1892	1752
	<i>Rv1258c</i>	-	-	1264	1676

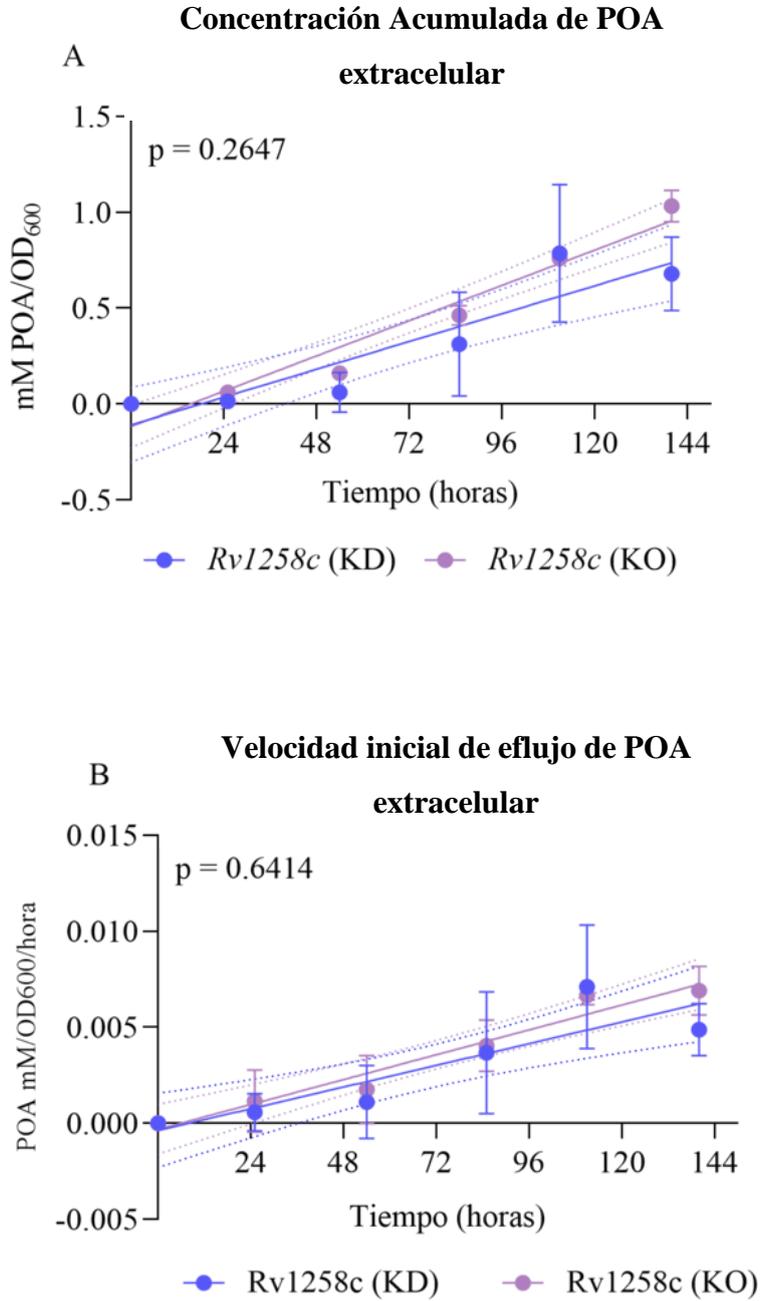
1. Nota: (-) = indica que no se realizó la transformación del ARNg en la condición dada.

2. Nota: Los autoligados presentaron en promedio 28 y 16 colonias para 4 y 12 horas de digestión respectivamente

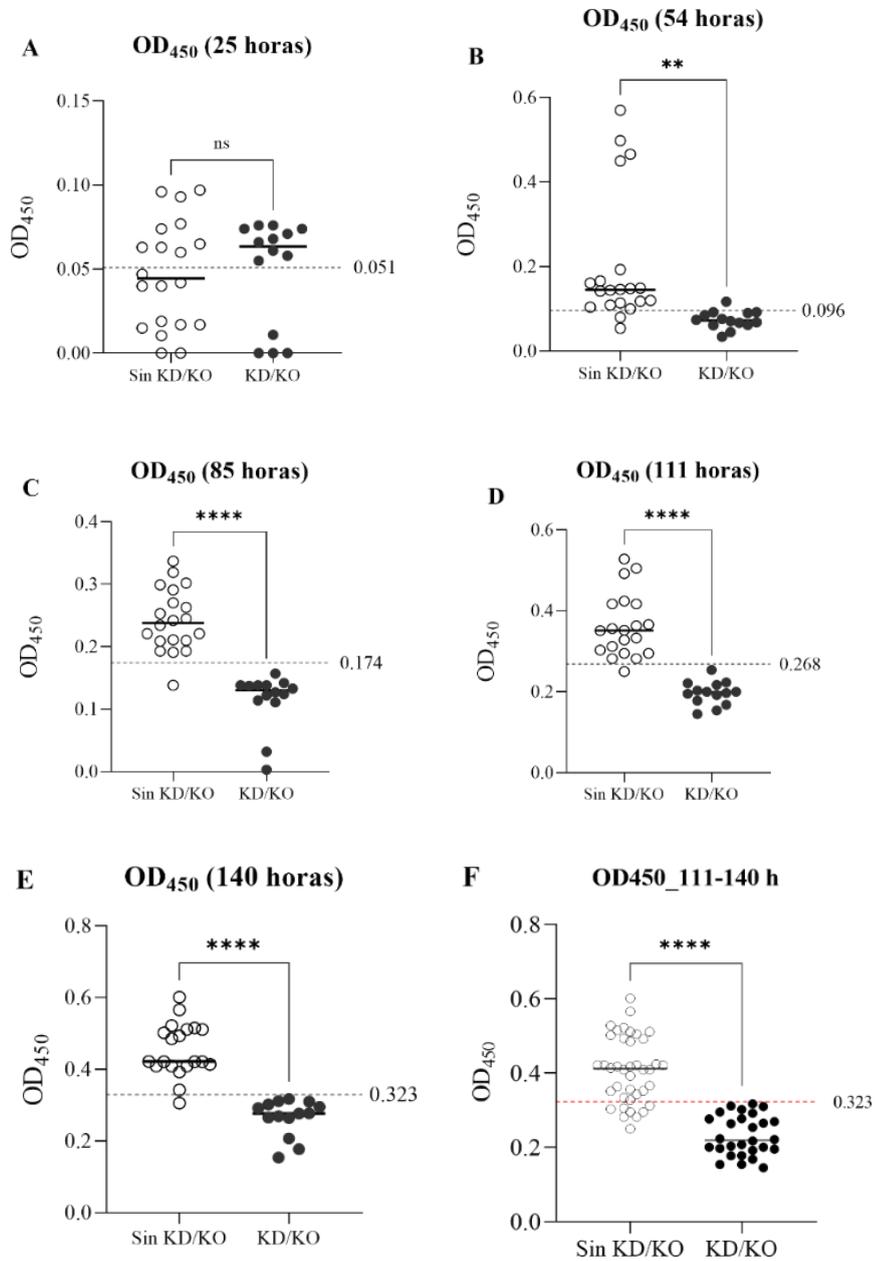
- Crecimiento de colonias recombinantes para el plásmido recombinante pLJR965:*Rv0191* y *Rv1258c*. Las placas corresponden a la dilución de producto de hibridado 1/100. La cantidad de colonias para autoligados son 6 y 10 para 2.5 U y 5 U respectivamente.



Anexo 9. Comparación de dinámica de eflujo entre MTB H37Rv:sgRNA *Rv1258c* reprimida (KD) frente a MTB H37Rv *Rv1258c* delecionada (KO).



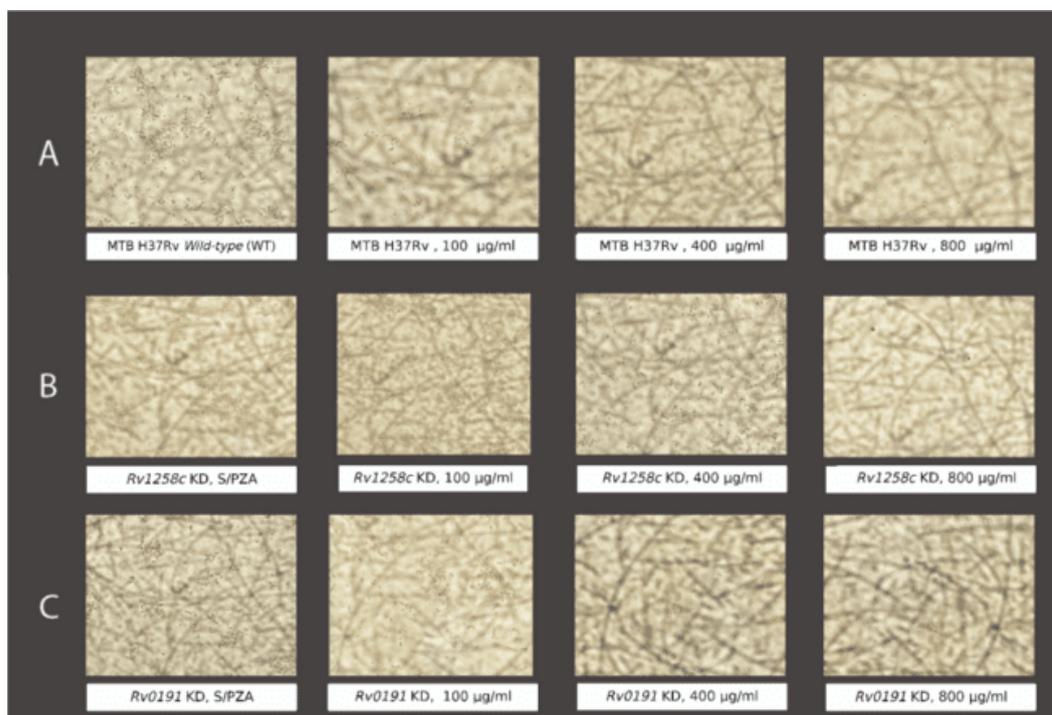
Anexo 10. Evaluación de OD₄₅₀ entre las cepas modificadas genéticamente y control.



En la comparación de los valores de OD₄₅₀ normalizados entre los grupos: controles sin represión o sin delección, incluyendo a la cepa control MTB H37Rv:pLJR965 vs cepas que hayan demostrado una reducción en la acumulación y velocidad de POA extracelular (MTB H37Rv:sgRNA *Rv1258c* y MTB H37Rv *Rv0191* y *Rv1258c*

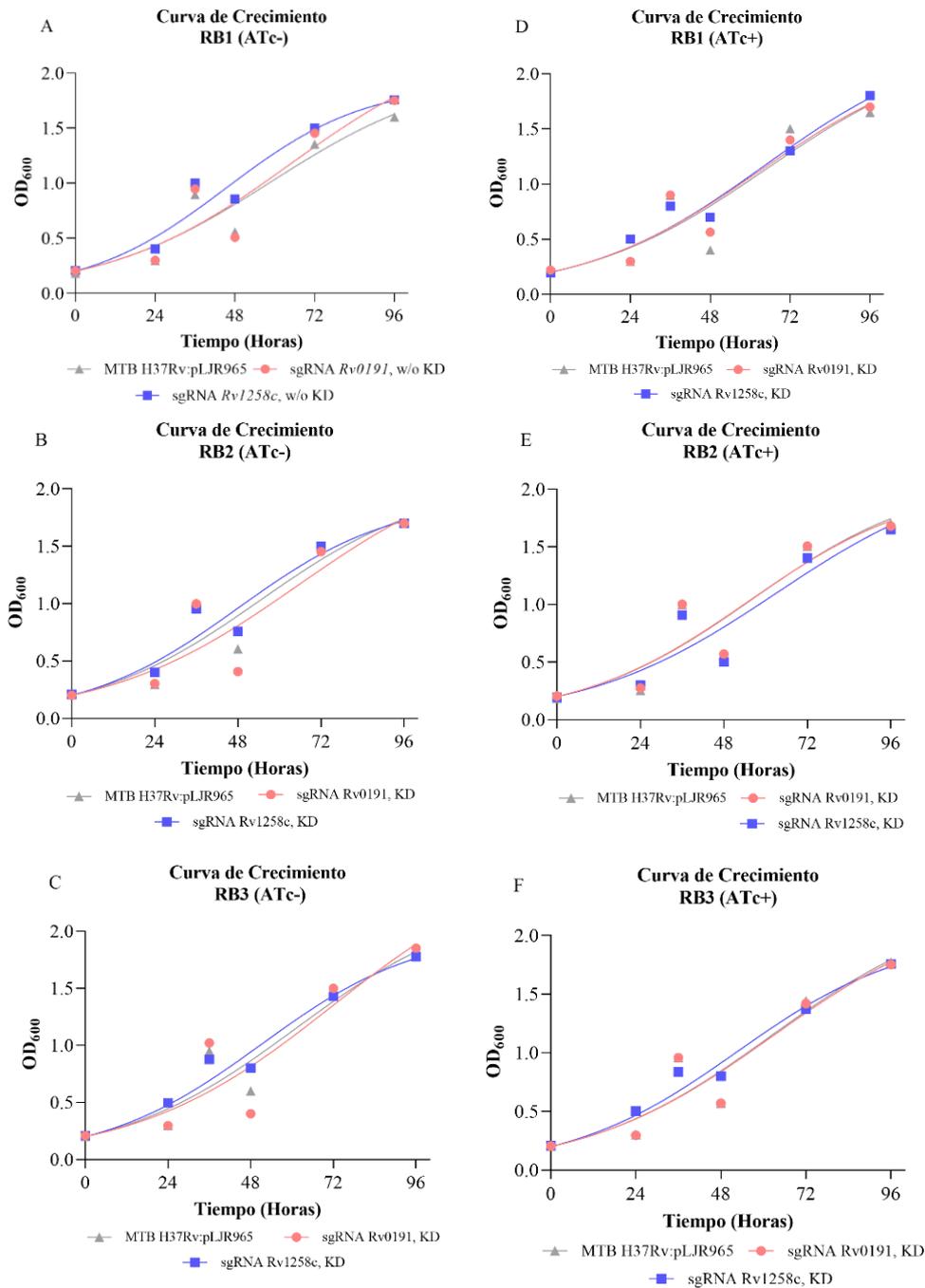
deleccionadas) se observó que en las cepas reprimidas (KD) y deleccionadas (KO) valores de densidad óptica a 450 nm significativamente menores al grupo control a partir de las 54 horas de evaluación (Anexo 20B-E), observamos para el grupo sin KD/KO un promedio de 0.202 OD₄₅₀ (IC 95%: 0.129 – 0.274, DS: 0.156) frente al grupo KD/KO con un valor promedio de 0.074 OD₄₅₀ (IC 95%: 0.062 – 0.086, DS: 0.02). En el punto de 85 horas los valores fueron 0.242 (IC 95%: 0.219 – 0.266, DS: 0.05) y 0.115 (IC 95%: 0.09 – 0.141, DS: 0.04), respectivamente. Esta diferencia se hizo más notoria tomando los datos obtenidos a 111 y 140 horas, observamos un promedio en el grupo sin KD/KO de 0.408 (IC 95%: 0.380 – 0.436, DS: 0.09) y 0.231 (IC 95%: 0.210 – 0.252, DS: 0.05) en el grupo KD/KO (Figura 31F). 95%: 0.380 – 0.436, DS: 0.09) y 0.231 (IC 95%: 0.210 – 0.252, DS: 0.05) en el grupo KD/KO (Anexo 20F).

Anexo 11. Visualización de crecimiento *in vitro* de cepas reprimidas frente a PZA.



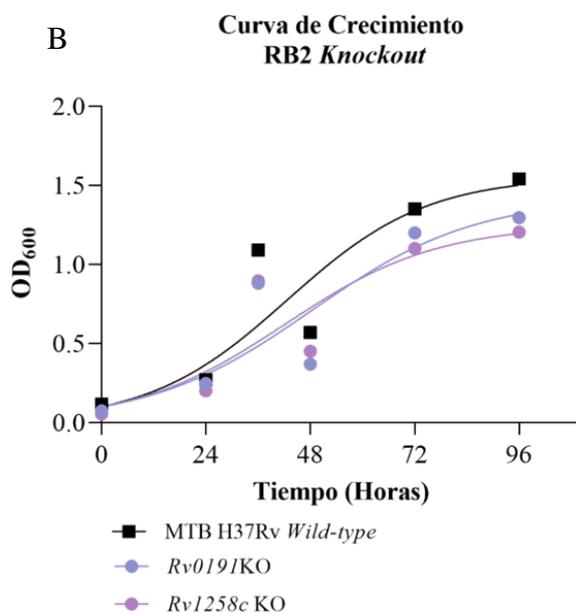
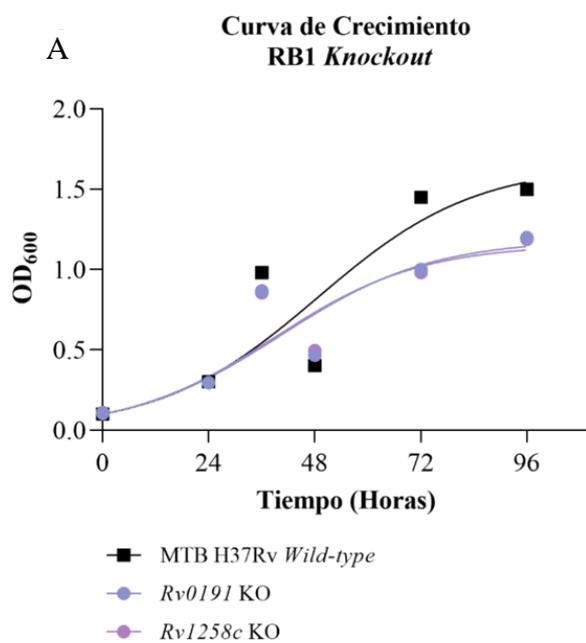
Nota. Las cepa MTB H37Rv silvestre y las cepas MTB H37Rv:sgRNA *Rv0191* y sgRNA *Rv1258c* reprimidas se cultivaron en microplacas con 7H9-OADC-T80, ATc (100 ng/ml) y diferentes concentraciones de PZA (100, 400 y 800 µg/ml). Las observaciones se realizaron a un aumento total de 400X. **A.** Siembra de la cepa control MTB H37Rv silvestre, **B:** Siembra de la cepa MTB H37Rv:sgRNA *Rv1258c*. **C.** Siembra de la cepa MTB H37Rv:sgRNA *Rv0191*. Las imágenes corresponden a 10 días de crecimiento a pH:6.0.

Anexo 12. Curva de crecimiento bajo represión génica en 3 réplicas biológicas.



Nota. En la imagen, ATc+: Sistema Inducido a Represión Génica, ATc-: Sistema No Inducido
 KD: Represión Génica, w/o KD: Sin Represión Génica, Wild-type: Cepa Silvestre. RB: Replica Biológica.

Anexo 13. Curva de crecimiento bajo deleción génica en 2 réplicas biológicas.



Nota. En la imagen, Knockout, KO: Deleción génica, Wild-type: Cepa Silvestre.

RB: Replica Biológica.

Anexo 14. Electroferogramas de la secuenciación por SANGER en *E. coli* recombinante (pLR965:sgRNA *Rv1258c*) para la implementación del sistema CRISPRi.

Nota. Se muestra solo un electroferograma de todas las cepas clonadas en



representación (Clona 1).

Anexo 16. Calidad de secuenciación por Oxford Nanopore para las cepas MTB Deleccionadas.

- Secuenciación para verificar el oligonucleótido guía *Rv1258c*

Preprocessing

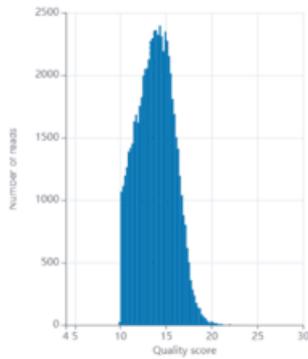
Some basic stats covering the raw reads and the reads remaining after the initial filtering step (based on length and mean quality) as well as after downsampling and trimming are illustrated in the table below.

10 entries per page Search...

Condition	Reads	Bases	Min read length	Max read length	Mean quality
Raw	148.7 k	344.3 M	1	22,138	13.0
Filtered	80.4 k	298.5 M	300	22,138	13.8
Downsampled, trimmed	3.0 k	13.4 M	271	8,564	14.6

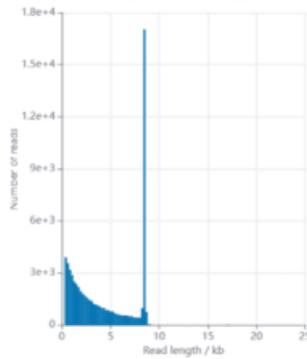
Read quality

Mean: 13.8, Median: 13



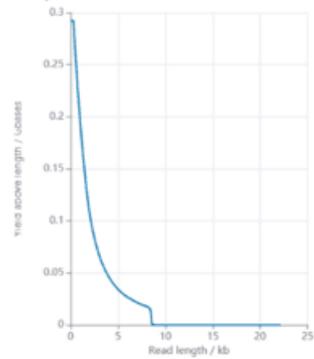
Read length

Mean: 4.431, Median: 3.625, Min: 300, Max: 22,138



Base yield above read length

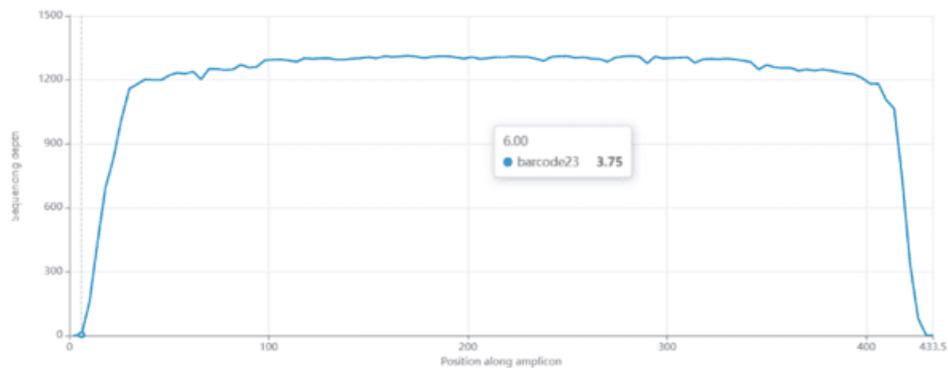
Total yield: 0.293 Gb



10 entries per page Search...

Sample	Amplicon	Reads	Bases	Median read length	Mean cov.	Mean acc.	Variants (indels)
barcode23	Rv1258cKO	1.3 k (88%)	522.2 k (88%)	403	90.1	96.7	0 (0)
barcode23	Unmapped	171 (12%)	70.7 k (12%)	419	0.0	0.0	0 (0)

Coverage along amplicon



- Secuenciación para verificar el oligonucleótido guía *Rv0191*

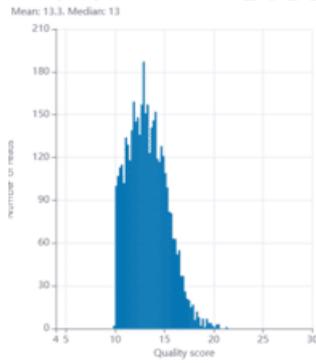
Preprocessing

Some basic stats covering the raw reads and the reads remaining after the initial filtering step (based on length and mean quality) as well as after downsampling and trimming are illustrated in the table below.

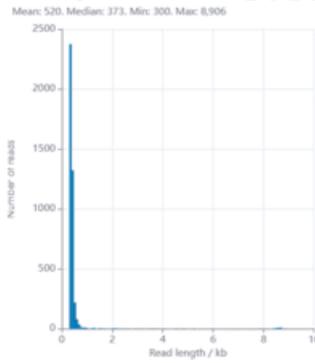
10 entries per page

Condition	Reads	Bases	Min read length	Max read length	Mean quality
Raw	31.3 k	6.5 M	1	8,906	12.1
Filtered	4.2 k	2.2 M	300	8,906	13.3
Downsampled, trimmed	1.4 k	616.5 k	246	619	13.4

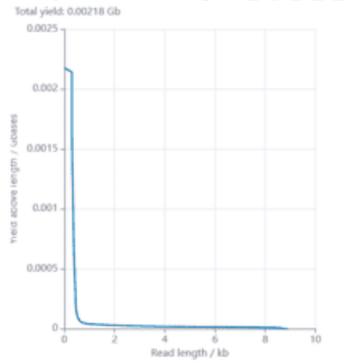
Read quality



Read length



Base yield above read length

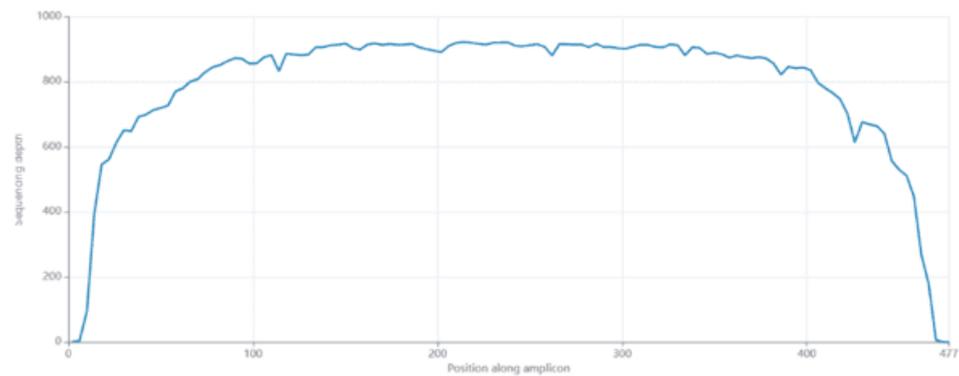


10 entries per page

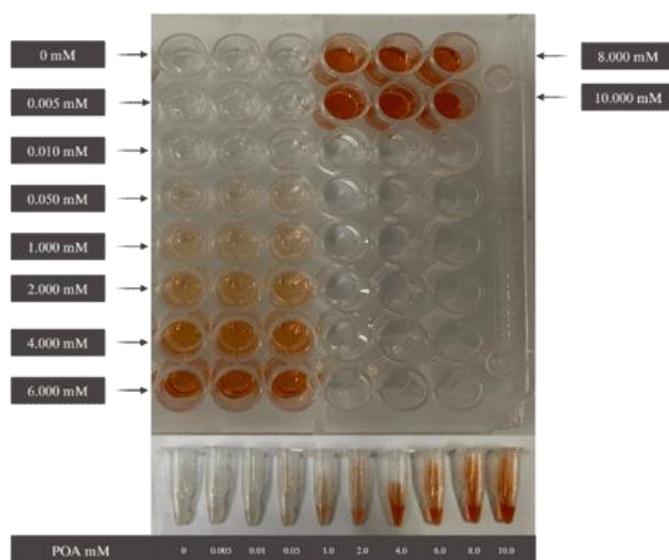
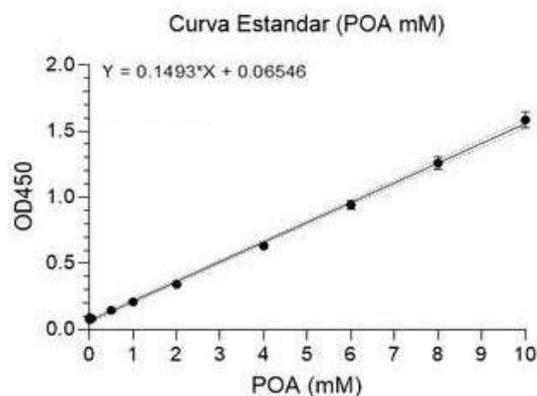
Amplicon	Reads	Bases	Median read length	Samples	Mean cov.	Mean acc.	Variants (indels)
Rv0191KO	926 (64%)	385.8 k (63%)	422	1	86.1	96.2	0 (0)
Unmapped	523 (36%)	230.7 k (37%)	431	1	0.0	0.0	0 (0)

Showing 1 to 2 of 2 entries

Coverage along amplicon



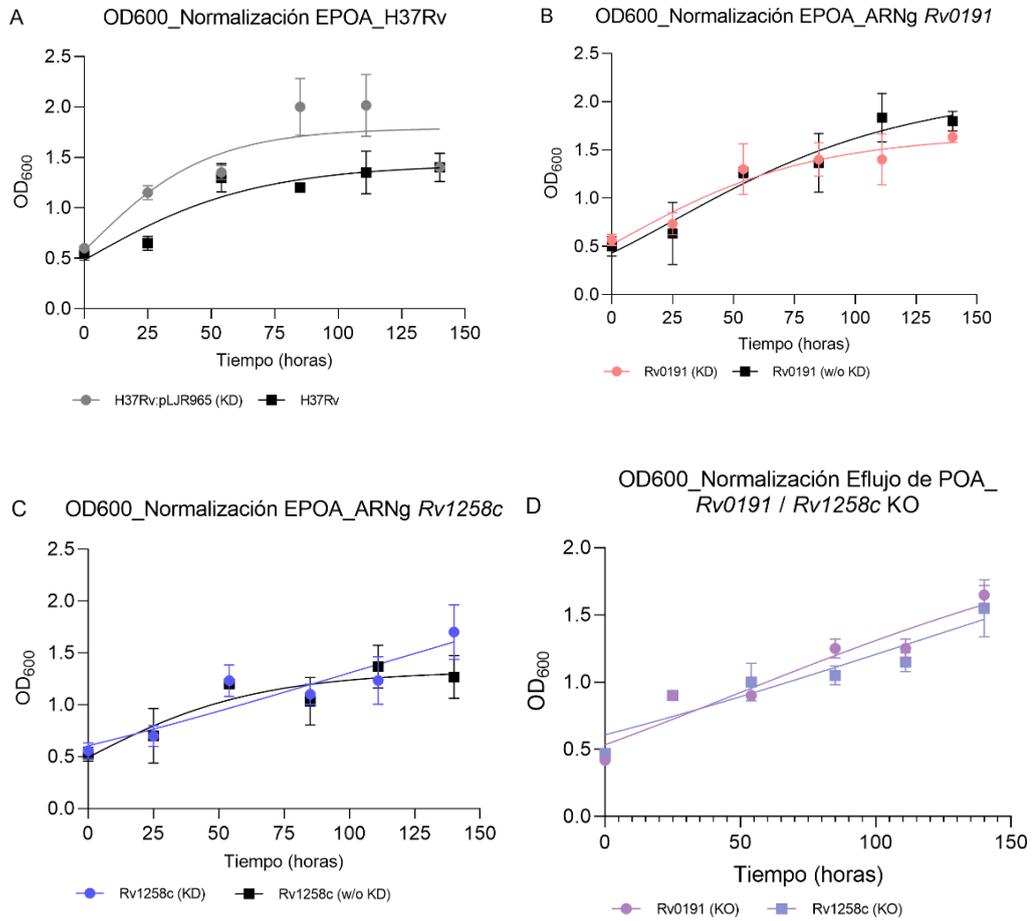
Anexo 17. Datos de curva estándar de POA (mM)



Milimolar (mM)	OD 450nm				Promedio (n, 3)	DS
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
0,000	0,076	0,072	0,082	0,077	0,005	
0,005	0,081	0,083	0,084	0,083	0,002	
0,010	0,087	0,089	0,092	0,089	0,003	
0,500	0,142	0,145	0,148	0,145	0,003	
1,000	0,206	0,212	0,211	0,210	0,003	
2,000	0,331	0,344	0,353	0,343	0,011	
4,000	0,607	0,645	0,644	0,632	0,022	
6,000	0,905	0,954	0,966	0,942	0,032	
8,000	1,205	1,29	1,287	1,261	0,048	
10,000	1,653	1,543	1,564	1,587	0,058	

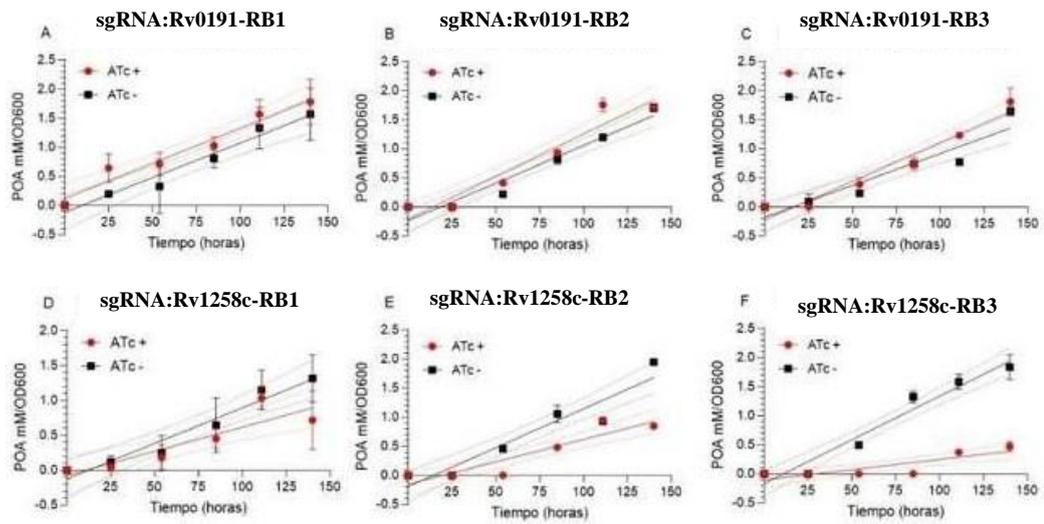
Nota: DS: Desviación estándar., Regresión lineal positiva fuerte entre la concentración de POA (mM) y los valores de densidad óptica a 450 nm. R^2 : 0.9969, Ecuación de la recta: $Y = 0,1493*X + 0,06546$, p valor < 0.0001. Pendiente: 0.1493, IC 95 %: 0.1461 - 0.1525, Intercepción Y: 0.06546, IC 95%: 0.05042 - 0.08050, Intercepción X: -0.4384, IC 95%: -0.5473 - -0.3327.

Anexo 18. Crecimiento de cepas *knockdown* y *knockout* bajo 800 µg/ml de PZA para la normalización de la dinámica de POA (concentración acumulada y velocidad inicial de eflujo). pH:7.0



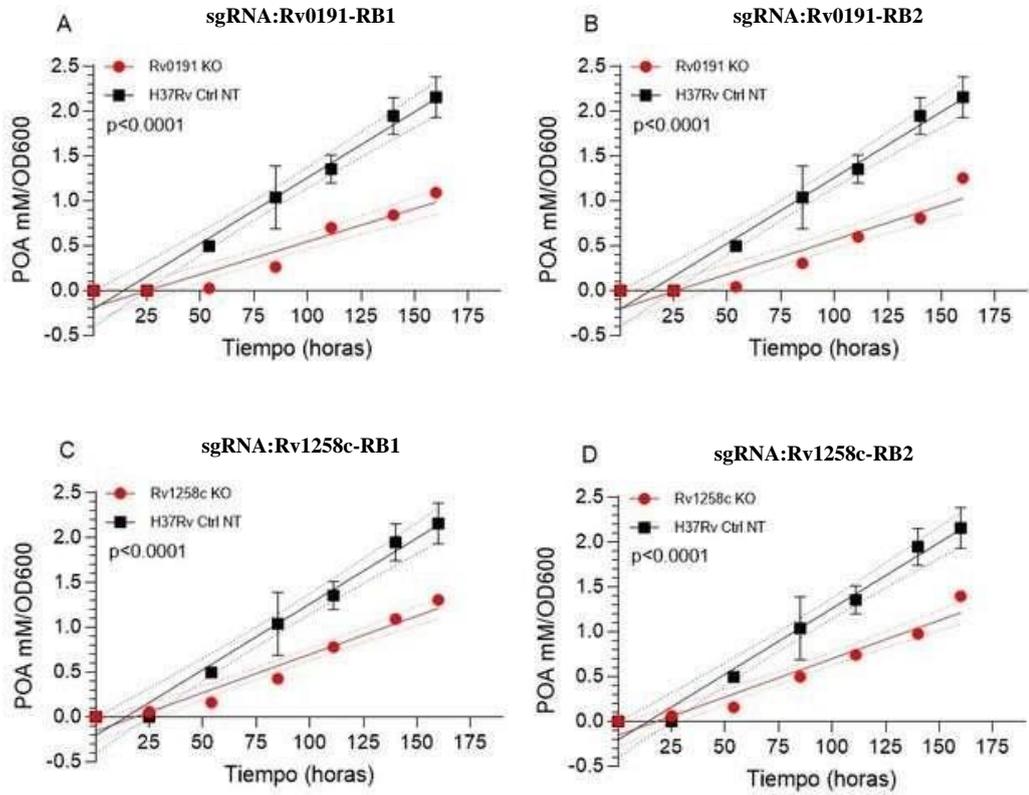
Nota: KD: repression génica, w/o KD: Sin Represión Génica, KO: Delección génica. EPOA: Concentración extracelular acumulada de POA. ARNg: ARN guía.

Anexo 19. Concentración acumulada de POA en las diferentes replicas biológicas bajo el sistema de represión génica.



Nota. RB: Replica Biológica.

Anexo 20. Concentración acumulada de POA extracelular en las diferentes replicas biológicas bajo el sistema de deleción génica.



Anexo 21. Evaluación de la represión génica en 5 y 10 días de inducción con ATc

