



Análisis Genómico Comparativo In Silico de Mycobacterium tuberculosis

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C OCTUBRE DE 2025



Análisis Genómico Comparativo In Silico de Mycobacterium tuberculosis

Yarith Alejandra Torres Cabra

Laura Natalia Hernández

Mateus

ASESORES

Diana Marcela Parra Muñoz Muñoz, PhD(c)

Asesora externa

Andrés Camilo González Gómez, Msc.

Asesor interno

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD DE

CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C OCTUBRE DE 2025



Análisis Genómico Comparativo In Silico de Mycobacterium tuberculosis

APROBADA _____

JURADOS _____

ASESORES:

Diana Marcela Parra Muñoz, PhD(c)

Andrés Camilo González Gómez, Msc.

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD DE

CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C OCTUBRE DE 2025

DEDICATORIA

Alejandra Torres

Primeramente, agradezco a Dios, por darme la fuerza y la sabiduría necesarias para culminar esta etapa, a mis Padres, Oscar y Olga, por ser mi pilar fundamental, por su amor incondicional, por ser mi apoyo incondicional en todo momento, por apoyarme incluso cuando dudaba de mis capacidades y por motivarme a creer que con esfuerzo y dedicación podría alcanzar esta meta, la cual también es de ustedes. A mi pareja, Yamid, por acompañarme a lo largo de toda mi carrera, por su apoyo constante, por sus palabras de aliento cuando creía que no lo iba a lograr, por ayudarme a estudiar, por ser quien siempre me recuerda que con paciencia puedo llegar a alcanzar cualquier meta que me proponga.

Gracias a ustedes por impulsarme a confiar en mis capacidades y por motivarme a ser cada día más segura de mí misma.

Laura Hernández.

Agradezco a Dios por permitirme culminar este periodo de mi vida. A mi madre y a mi padre, por estar siempre a mi lado, dándome la fuerza cuando para mí ya no eran sostenibles muchas situaciones. Gracias a ustedes aprendí a enfrentar el miedo y luchar por mis metas. Ivan, mi hermano, mi media vida, gracias por tratar de entender todo lo que para mí era difícil y encontrar la forma de explicármelo, por guiarme siempre a ser fuerte y tener carácter. A mis abuelitos, por ser la voz dulce, la voz que me acompañó, que me brindó cobijo y consejos. A Santiago, mi pareja por ser mi apoyo, por acompañarme durante toda mi carrera y darme los ánimos que muchas veces me faltaban para seguir adelante, por recordarme que debo confiar en mí, que soy maravillosa y que tengo las capacidades para hacer lo que me proponga, gracias por ser mi luz, guía y esperanza. Por último, gracias a mí, este trabajo le pone firma a los últimos 5 años de mi vida y al resto de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por brindarnos las herramientas, la formación académica y los valores que hoy nos identifican como Bacteriólogas. A los Profesores Andres y Marcela por la paciencia, la dedicación, y el acompañamiento durante estos últimos 2 años. Gracias por brindarnos su conocimiento y por motivarnos a mejorar cada día para tener un excelente trabajo de grado. Por último, gracias a todas las personas que nos acompañaron durante nuestra carrera, en especial a nuestras amigas Laura y Alison por ser nuestro apoyo en todo momento. Finalmente, a nosotras, por ser el apoyo el uno de la otra durante la carrera y más aún durante este camino. Por todas las risas y buenos momentos que recorrimos juntas.

Tabla de contenido

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVOS.....	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
1. ANTECEDENTES	12
2. MARCO REFERENCIAL	13
2.1. Filogenia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
2.1.1. Características microbiológicas	14
2.1.2. Características genómicas	14
2.1.2.1 Epidemiología molecular	15
2.1.2.1.1 Genotipos circulantes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
2.2 Tuberculosis en Colombia.	22
2.2.1 Situación epidemiológica	22
2.2.2 Métodos de diagnóstico molecular.....	24
2.2.3 Diagnóstico en poblaciones de alto riesgo	25
2.2.4 Tratamiento actual empleado	25
2.3 Mecanismos de resistencia.....	26
2.4 Mecanismos de virulencia	28
2.5 Genómica comparativa de Micobacterias.....	30
3. DISEÑO METODOLÓGICO.....	30
3.1 Búsqueda de genomas completos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de aislamientos de pacientes colombianos.	31
3.2 Anotación estructural de regiones génicas de los genomas de MTB de aislamientos de pacientes colombianos.	32
3.3 Análisis de identidad de los genomas seleccionados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32
3.4 Análisis de genómica comparativa de aislamientos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> respecto a la cepa de referencia mundial H37Rv.	33
3.5 Análisis filogenético.....	33
4. RESULTADOS.....	34

4.1 Anotación estructural de regiones génicas de los genomas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de aislamientos de pacientes colombianos.....	35
4.2 Análisis de identidad de los genomas seleccionados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	38
4.3 Análisis de genómica comparativa de aislamientos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> respecto a la cepa de referencia mundial H37Rv.....	39
4.4 Análisis filogenético.....	42
5. DISCUSIÓN.....	43
6. CONCLUSIONES.....	54
7. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES DEL ESTUDIO	54
8. BIBLIOGRAFÍA.....	55
9. ANEXOS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución filogeografía global de los linajes de MTBC

Figura 2: Diseño metodológico

Figura 3A: Genomas sin proceso de anotación

Figura 3B: Representación gráfica de los genomas una vez fueron anotados

Figura 3C: Representación lineal del genoma secuenciado.

Figura 4: Alineamiento de los aislamientos evaluados de *Mycobacterium tuberculosis*

Figura 5: Representación filogenética de aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis*

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Distribución geográfica y características clínicas de los linajes del complejo MTB

Tabla 2: Métodos diagnósticos moleculares de MTB.

Tabla 3: Aislamientos utilizados en el análisis de genómica comparativa de *Mycobacterium tuberculosis*

Tabla 4: Variantes genéticas en genes involucrados en los 24 aislamientos analizados, respecto al genoma de referencia mundial H37RV



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD**

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

Análisis Genómico Comparativo In Silico de Mycobacterium tuberculosis

RESUMEN

La tuberculosis TB, es una enfermedad muy importante en el ambiente de la salud pública a nivel mundial, dado el impacto en las personas inmunosuprimidas, su fácil diseminación y el incremento de cepas resistentes, lo que permite evidenciar la gran capacidad adaptativa de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (1). Este trabajo de grado presenta un análisis genómico comparativo *in silico* de 24 aislamientos clínicos colombianos frente a la cepa de referencia H37Rv, con el objetivo de identificar variantes genómicas asociadas con mecanismos de resistencia, virulencia y evasión inmune. Los resultados muestran la presencia de sustituciones y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), que pueden causar eventos de extensión, truncación y pérdida del codón de inicio, mostrando una marcada diversidad genética entre los aislamientos, así como la presencia de dos linajes con características evolutivas diferentes. Estos hallazgos resaltan la importancia de investigar más a fondo el comportamiento molecular de MTB en Colombia, mediante herramientas de genómica comparativa que permite comprender los mecanismos que determinan la patogenicidad del patógeno.

Palabras clave: resistencia, virulencia, mutaciones, SNPs, filogenia, variantes.

INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por MTB, es una bacteria que ataca principalmente los pulmones, pero puede diseminarse a otras áreas del cuerpo. Es una de las enfermedades más antiguas en el mundo pero que, hoy en día sigue teniendo gran incidencia en la humanidad, a pesar de diversas investigaciones y manejo a nivel de salud pública (1). Desde 2023, la TB volvió a ser una de las principales causas de muerte en el mundo por un solo agente infeccioso. Para el año 2023, se reportaron 10,8 millones de casos, presentando así un pequeño incremento con respecto a 2022, donde se reportaron 10,7 millones. El aumento de casos durante 2022 y 2023, está dado principalmente por el crecimiento demográfico (OMS) (2). En Colombia los datos más recientes también son preocupantes, el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) registró 20.027 casos en 2023, cifra que aumentó a 24.816 en 2024, lo que evidencia una tendencia al alza (3).

A lo anterior se suma la aparición y el crecimiento de cepas multidrogorresistentes (MDR-TB) y extremadamente resistente (XDR-TB) de MTB se han posicionado como una amenaza crítica para el global de esta enfermedad a nivel mundial; según la OMS en el informe mundial sobre la tuberculosis 2024 advierte que estas cepas resistentes suponen una crisis sanitaria por su poca detectabilidad, peores resultados en los tratamientos y mayor carga programática en los sistemas de salud (2). Estudios mencionan que la multidrogorresistencia se produce principalmente a causa de mutaciones puntuales en los genes diana y de procesos evolutivos que promueven la selección y propagación de variantes resistentes, basados en revisiones y análisis genómico (4). Esto complica los regímenes empíricos e incrementa la necesidad de un diagnóstico molecular preciso. Asimismo, evaluaciones recientes sobre la carga global revelan que, la disparidad sanitaria se incrementa debido

a que los casos MDR/RR-TB y a los obstáculos para eliminar brechas en el diagnóstico y en el tratamiento, afectan desmedidamente a naciones de ingresos bajos o medios (5).

Al estudio de estas variables puede sumarse el análisis genómico comparativo in silico de MTB que permite identificar variantes genéticas que influyen en la virulencia y la resistencia a los fármacos. Es por ello que surge la importancia de llevar a cabo un estudio sobre la complejidad genética de MTB. Por medio de la genómica y la bioinformática, se han identificado diversidad de genes de virulencia, que le confieren al bacilo la habilidad de resistir el entorno hostil en el macrófago, vencer la actividad de la respuesta inmunológica y permanecer en el huésped (6). A su vez, también se ha demostrado mutaciones dentro de MTB que le permiten tener mayor resistencia a los antibióticos como es el caso de la rifampicina (RIF) debido que, la acción de esta se encuentra en el gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa, lo que genera que más del 95% de las mutaciones resistentes a RIF estén asociadas con mutaciones en el gen *rpoB*, dadas por un cambio en uno de los aminoácidos lo que resulta en la modificación del sitio activo, generando la inactivación de la ARN polimerasa dando como resultado la resistencia a la RIF (7).

La cepa de referencia H37Rv proviene de un aislado clínico H37, obtenida de un paciente con tuberculosis pulmonar en el año 1905. H37Rv pertenece al clado T y al grupo de SNPs SCG-6B, su virulencia se ha demostrado en diversos modelos animales (8). Su secuencia completa y anotación se publicaron en 1998 por Cole et al descifrando la biología de MTB a partir de la secuencia completa del genoma. El uso de esta cepa se sustenta en el propósito de identificar variantes genéticas asociadas con resistencia, virulencia y mecanismos de evasión del sistema inmune.

Es relevante considerar que la genómica de MTB está en constante adaptación, según las intervenciones antimicrobianas y las mutaciones en genes específicos que confieren virulencia a la bacteria; comprender estos aspectos permite prever posibles futuras resistencias.

La tuberculosis se presenta como un gran problema en salud pública en Colombia, presentando un constante aumento de casos reportados anualmente; no obstante, existen datos limitados sobre la variabilidad genómica de los aislamientos circulantes y posible relación con procesos de resistencia, virulencia y evasión del sistema inmune. Razón por la cual surge la necesidad de identificar qué variantes genómicas caracterizan a los aislamientos colombianos en comparación con la cepa de referencia H37Rv.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar un análisis genómico comparativo in silico de aislamientos colombianos de *Mycobacterium tuberculosis* frente a la cepa de referencia H37Rv, con el fin de identificar variantes genéticas asociadas con mecanismos de resistencia, virulencia y evasión del sistema inmune.

Objetivos específicos

- Recolectar secuencias de genoma completo de aislamientos colombianos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de bases de datos públicas con el fin de realizar análisis genómicos comparativos.
- Comparar las secuencias obtenidas con el genoma de referencia H37Rv mediante herramientas bioinformáticas para identificar variantes genómicas.
- Evaluar las variantes genómicas detectadas para comprender su posible participación en procesos asociados a virulencia y resistencia a los medicamentos

1. ANTECEDENTES

En Colombia, la TB ha mostrado un aumento reciente presentándose en 2024 24.816 casos, para el 2023 un total de 20.027 reporte de casos, con un aumento del 13,9% en comparación con 2022, según el INS (3).

Las regiones que presentan más casos son Antioquia , Cali, Bogotá, Santander y Barranquilla, mientras que San Andrés y Providencia, Vaupés y Guainía reportan el menor número de casos en el país. La incidencia alcanzó 36,78 por cada 100.000 habitantes para 2024, siendo superior a los los anteriores, con tasas altas particularmente en entidades territoriales tales como Amazonas, Barranquilla, Cali, Caquetá y Risaralda (3).

La genotipificación ha permitido evidenciar la diversidad genotípica de MTB, como los hallazgos informados por Jia, X.; Yang, L. et al. (2016) (9), quienes realizaron un análisis comparativo entre 12 genomas y obtuvieron grandes variaciones en los fenotipos, asociados con el huésped, virulencia e inmunorreactividad. En otro estudio realizado en Norte de Santander, Colombia, se realizó un análisis genómico comparativo en 18 genomas de pacientes con MTB, frente al genoma H37Rv (genoma de referencia universal) y UT209 (genoma colombiano) que reveló un total de 27.151 modificaciones genéticas, de las cuales 25.200 fueron SNPs, 8.707 fueron sinónimos y 16.493 generaron cambios que podrían tener diversas consecuencias para la función de las proteínas en cuestión; entre las consecuencias se puede encontrar funciones biológicas, impactando positiva o negativamente las vías metabólicas, las interacciones proteína-proteína y la actividad enzimática, entre otras; lo cual, se encuentra directamente relacionado con mecanismos de virulencia, evasión del sistema inmune y susceptibilidad a fármacos (10).

Mediante la aplicación de secuenciación del genoma Whole Genome Sequencing (WGS) y el uso

de tecnologías de secuenciación, se ha revolucionado el estudio de MTB, al permitir la identificación de polimorfismos genéticos y variaciones significativas que se encuentran relacionadas con la resistencia a antibióticos y la epidemiología molecular de la tuberculosis asociada a su virulencia (11). Secuenciar el genoma permite identificar SNPs y otros marcadores genéticos que son de gran importancia para el seguimiento de linajes, la detección de resistencia, y los análisis filogenéticos (12).

Los análisis genómicos comparativos de MTB en Nepal determinaron los tipos de mutaciones de resistencia a los medicamentos presentes de MTB multidrogorresistente (MTB-MDR) teniendo en cuenta la resistencia a los medicamentos antituberculosos de primera y segunda línea de tratamiento luego de comparar los aislamientos de MTB-MDR de Nepal con regiones orientales de Nepal. Determinaron el espoligotipo *in silico* y la resistencia a fármacos codificadas genéticamente lo cual dio como resultado que, los aislamientos de TB-XDR (Extremadamente resistentes), tenían mutaciones que confieren resistencia a antibióticos de primera línea como la isoniazida, rifampicina y etambutol, asociados a variaciones en los genes promotores *efabG1-inhA* y *ahpC* (13).

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. Filogenia de *Mycobacterium tuberculosis*

El orden de los Actinomycetales está conformado por la familia *Mycobacteriaceae*, *Actinomycetaceae*, *Streptomyetaceae* y *Nocardiaceae*. Dentro de la familia *Mycobacteriaceae* se encuentra un solo género, el género *Mycobacterium*, el cual en sus orígenes solamente tenía dos especies, *Mycobacterium leprae* y MTB, descubierto en 1882 por Robert Koch (14).

El género *Mycobacterium* agrupa a más de 170 especies. MTB hace parte del complejo *M.tuberculosis* (MTC), junto con otras especies: *M.bovis*, *M.africanum*, *M.caprae*, *M.microti* y

M. canetti, siendo MTB la más frecuente (14).

2.1.1. Características microbiológicas

MTB es un bacilo catalasa positivo, filamentoso, con una longitud de 0.2 a 0.6 μ por 1 a 10 μ de largo, ligeramente curvo (15), ácido-alcohol resistente (BAAR), aerobio estricto, intracelular obligado, inmóvil, no formador de esporas y de crecimiento lento con un tiempo de duplicación aproximado de 18 a 20 horas, en donde su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 35 a 37°C. (14). En cultivo, forma colonias que son rugosas, secas y de color blanquecino en medios sólidos tales como Lowenstein Jensen o Middlebrook 7H10 y 7H11, que requiere de varias semanas para desarrollarse apropiadamente (16). Su pared celular es una estructura altamente compleja, compuesta por una abundante capa de ácidos micólicos, arabinogalactano, glicolípidos tales como lipoarabinomano, lipomano y rehalosa-dimicólicos. Esta estructura le brinda impermeabilidad ante compuestos nocivos, a la desecación de desinfectantes y medicamentos, forjando así un papel importante en su virulencia (17). Dentro de los compuestos de esta pared celular, se encuentra la familia de lípidos dimicocerosatos de tioceroles, los cuales intervienen en la modulación del sistema inmunológico del hospedero durante la patogénesis, proceso que incluye la invasión de macrófagos, el enmascaramiento de patrones moleculares asociados a los patógenos, la resistencia a la muerte por óxido nítrico y la prevención del reclutamiento de macrófagos activados en el sitio de la infección (18).

2.1.2. Características genómicas

El genoma de MTB se caracteriza por ser altamente conservado, resultado de un proceso evolutivo basado en la clonación y la adaptación a un nicho ecológico muy restringido, lo cual le impide adquirir fácilmente material genético externo, considerando así, un pan-genoma cerrado (19).

Las secuencias de inserción (IS) constituyen un componente principal de los elementos repetitivos

bacterianos y se han utilizado frecuentemente para la tipificación de especies y cepas (20). Dentro de los múltiples sitios del genoma de MTB se encuentra la secuencia de inserción (IS6110, considerada como un elemento móvil repetitivo específico , cuya longitud es de 1.355 pb y está flanqueada por repeticiones invertidas (IR) de 28 pb (21).

Esta secuencia de inserción presenta un alto grado de polimorfismo con respecto al número de copias y los sitios de inserción. Por lo cual se considera un marcador molecular de gran importancia para el diagnóstico y la tipificación de cepas de esta bacteria. Al ser elementos móviles y con localización en diferentes sitios, se ha utilizado para diagnosticar y caracterizar a nivel molecular cepas de MTB mediante el uso de la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del IS6110 (21).

La secuenciación del genoma completo de MTB se dio por primera vez en 1998 dado por Stewart T. Cole y colaboradores, en donde se obtuvo un tamaño de 4.411.529 pares de bases con un 65.5% de contenido de G + C y aproximadamente 4.000 genes codificantes (22). Se ha evidenciado que algunas regiones genómicas presentan un contenido de G + C más alto, cercano al 80%, correspondientes a las regiones codificadas por la familia de proteínas PE y PPE (23). Hasta la fecha, se han secuenciado y caracterizado completamente los genomas de varias especies del género *Mycobacterium*, entre ellas. MTB H37Rv (Cole, 1998 ; Camus, 2002), *M. tuberculosis* CDC1551 (Fleischmann, 2002), *Mycobacterium bovis* (Garnier, 2003), *Mycobacterium leprae* (Cole, 2001) y *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (Li, 2005). Lo cual ha permitido establecer una base comparativa para comprender la evolución genómica del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) y su relación con otras especies micobacterianas patógenas (19).

2.1.2.1 Epidemiología molecular

En la actualidad, para llevar a cabo estudios sobre la dinámica o el proceso de transmisión de MTB se emplea la epidemiología molecular, como su nombre lo indica, esta implica el estudio de la distribución de enfermedades en poblaciones humanas, identificadas a nivel molecular. Es una herramienta que permite llevar a cabo el seguimiento de enfermedades infecciosas como la TB, una enfermedad donde los pacientes infectados con una cepa determinada pueden sufrir recaídas debido a la reactivación de la misma cepa o de una diferente tras el proceso de curación (24).

Este método emplea marcadores genéticos que permiten estudiar la transmisión, diversidad y origen de MTB en poblaciones humanas. En las últimas décadas WGS ha permitido generar una transformación en este campo, permitiendo identificar cadenas de transmisión y diferenciar reactivaciones de infecciones recientes con una resolución que supera en gran medida a métodos fenotípicos que son clásicos. La importancia de la epidemiología molecular radica en que, por medio de esta se pueden confirmar los brotes de TB en individuos en los que los genotipos coinciden, haciendo posible inferir la existencia de una posible cadena de transmisión o un vínculo epidemiológico entre los casos dados en el brote, sugiriendo así que las infecciones se podrían haber originado a partir de una misma fuente o por el contrario, de contactos cercanos dentro de una comunidad (25).

Los enfoques moleculares que son usados actualmente incluyen: 1. WGS para determinar SNPs y reconstruir árboles filogenéticos de alta resolución 2. Paneles de SNPs validados o también llamados barcodes para la tipificación rápida de linajes y sublinajes de MTB y 3. Métodos dirigidos para la detección de mutaciones que se encuentren asociados con la resistencia a medicamentos (26).

MTB comprende diez linajes filogenéticos adaptados al ser humano, estudios han demostrado que estos linajes presentan una estructura fitogeográfica poblacional, con los diferentes linajes asociados a regiones geográficas distintas. (Figura 1) (27).

Específicamente los linajes L1, L2, L3, L4 y L7 pertenecen a MTB, a diferencia de L5 y L6 históricamente identificados como *M. africanum* del África Occidental (L5 de aislamientos en países del Golfo de Guinea Ecuatorial: Burkina Faso, Camerún, República del Congo, Nigeria, Ghana y en el Congo), (L6 de aislamientos principalmente de Uganda). A nivel geográfico L2 y L4 son los linajes más extendidos a nivel mundial, no obstante, L2 domina principalmente en el este de Asia y se le ha asociado en repetidas ocasiones con la resistencia a los medicamentos anti-tuberculosis de primera línea. L1 y L3 se han aislado principalmente en regiones alrededor del Océano Índico. En contraste, L5 y L6 predomina en África occidental, y L7 se encuentra casi exclusivamente en Etiopía. En los últimos años se han descubierto dos linajes nuevos, L8 el cual fue construido a partir de dos cepas aisladas en pacientes de Ruanda y Uganda y L9, el cual posee sólo cinco cepas aisladas en Somalia, en la República de Djibout y en una cepa aislada en Europa, cuyo origen se desconoce (18).

Finalmente el linaje L10, descubierto en los últimos años, es poco frecuente a nivel mundial y, aparte de la diseminación migratoria, probablemente limitado a África central, se caracteriza por una nueva región de delección e inserciones de IS6110 (28).

La distribución geográfica y las principales diferencias en la presentación clínica de los linajes del complejo MTB se resumen en la siguiente tabla.

LINAJE	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	PRESENTACIÓN DE TB
L1 (Indo-Oceánico)	Este de África, Centro-Sur- y Sureste de Asia	En comparación con las cepas del linaje 2 y 3, estas cepas producen altos niveles de IFN-gamma. No se han aislado de sitios extrapulmonares.
L2 (Familia Beijing)	Centro y Este de Asia, Europa Oriental, y Sudáfrica	Asociadas a sitios extrapulmonares; con pérdida de peso en el hospedero más rápido que el linaje 6; cepas asociadas en casos de recaída, falla en el tratamiento, y presencia de fiebre en los primeros meses de tratamiento.

L3 (Indo-África Oriental)	Este y Centro de África, y Sureste de Asia	Asociadas a infección extrapulmonar; en comparación con el linaje 4, estas cepas producen altos niveles de moléculas antiinflamatorias
L4 (Euroamericano)	Asia, Europa, África y las Américas	Asociadas a la producción de la alfa-1- glicoproteína y proteína C-reactiva, alta concentración de neutrófilos; produce baja masa corporal en el hospedero en comparación del linaje 1; asociadas principalmente a tuberculosis pulmonar (TBP).
L5 (<i>M. africanum</i>)	África Occidental	Menor tasa de progresión a la enfermedad en comparación con MTB
L6 (<i>M. africanum</i>)	África Occidental	Menor tasa de progresión a la enfermedad en comparación con MTB; cepas aisladas principalmente de sitios extrapulmonares.
L7 (Etiópe)	Etiopía	Las cepas de este linaje causan síntomas leves en lugar de graves (forma subclínica), por lo que los pacientes esperan más tiempo antes de buscar atención médica
L8	Ruanda y Uganda	Solamente dos cepas han sido analizadas, por lo que se desconoce la patología que causa este linaje.
L9	África Oriental	No existe información clínica, epidemiológica y experimental de estas cepas que describan sus características fenotípicas (virulencia, tasa de transmisión y fármaco-resistencia, entre otras).
L10	África central	Linaje descubierto en los últimos años, se han identificado pocos aislamientos por lo cual se desconoce con exactitud la su presentación clínica

Tabla 1. Distribución geográfica y características clínicas de los linajes del complejo MTB; la información presentada sobre L1-L9 fue tomada y modificada de: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.563>. La información de L-10 fue tomada de <https://doi.org/10.3201/eid3003.231466>.

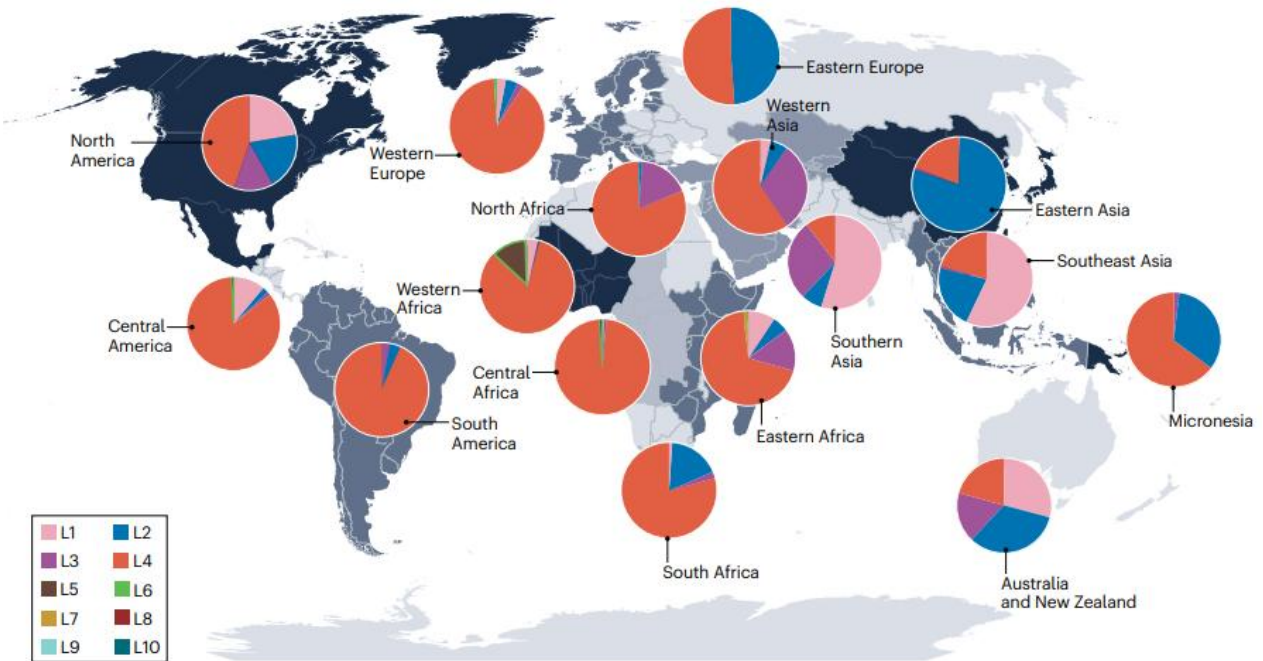


Figura 1. Distribución filogeografía global de los linajes de MTBC. Los gráficos circulares muestran la proporción de los diferentes linajes de MTBC en las regiones geográficas correspondientes, indicadas por los distintos tonos de gris. Se combinaron los datos de L5 y L6. Tomado de <https://www.nature.com/articles/s41579-025-01159-w>.

Cada uno de estos linajes difieren en procesos relacionados con virulencia, progresión de la enfermedad y potencial de transmisión. Según la literatura, estas diferencias fenotípicas se asocian a procesos de evolución presentes en los linajes al tratar de adaptarse a diferentes poblaciones humanas. A su vez, estos linajes se ven influenciados directamente por factores presentes en cada una de las poblaciones humanas, principalmente a nivel inmunológico, a nivel clínico, en su capacidad de transmisión y en el desarrollo de la fármaco-resistencia (18).

La filogeografía global de MTB sugiere una coevolución de los linajes del complejo MTBC con el huésped humano y a su vez indica que distintos linajes de MTB podrían tener tendencia a adquirir resistencia a diversos fármacos; se destacan las cepas L2/Beijing, las cuales adquirieron resistencia a fármacos in vitro más rápidamente que las cepas L4/Euroamericanas (29).

En Colombia, la epidemiología molecular de MTB muestra que el linaje Euroamericano (L4) resulta

ser el más predominante, principalmente los sublinajes LAM y Haarlem (30). Esta predominancia ha sido documentada mediante varios estudios, como por ejemplo, uno realizado en 2014, en donde se analizaron 414 aislamientos de MTB procedentes de diferentes regiones del país, encontraron que los sublinajes más comunes son sublinajes LAM y Haarlem, principalmente importantes centros urbanos como lo son Medellín y Cali. Los spoligotipos dominantes fueron LAM9 (SIT 42) y Haarlem (SIT 62). Estos resultados respaldan el hecho de que el linaje LAM presenta mayor estabilidad y transmisibilidad, factores que favorecen su circulación (31). Estudios pan-genómicos del linaje 4 de MTB se han asociado con la presencia de inserciones/deleciones (indels) y SNP de menor tamaño que generan cambios en el marco de lectura, lo que incrementa la variabilidad genética (29).

En diversos estudios realizados en Colombia, se ha documentado una asociación directa entre el linaje Beijing y fenotipos que presentan multirresistencia ya sea MDR o XDR en la región del Pacífico colombiano, especialmente en Buenaventura y en Valle del Cauca. En Colombia, este linaje se reportó por primera vez en 1998 en 11 aislamientos provenientes de pacientes nuevos y que fueron previamente tratados de Buenaventura. Como se menciona en la tabla 1, este linaje está presente en el Centro y Este de Asia, Europa Oriental y Sudáfrica. Este genotipo fue descrito en 1995 en China, en donde se asocia con una mayor virulencia y resistencia a los medicamentos antituberculosos. (32)

En Buenaventura un estudio, identificó una alta frecuencia de cepas Beijing en aislamientos de TB-MDR. En Buenaventura, se ha observado una alta tasa de resistencia frente a los fármacos de primera línea dada por la presencia del genotipo Beijing. Además, se menciona una marcada tendencia asociada a pacientes jóvenes y transmisión activa frente a este genotipo, dada posiblemente por factores bacteriológicos, del huésped o la unión de estos dos (32).

2.1.2.1.1 Genotipos circulantes de *Mycobacterium tuberculosis*

Se han desarrollado diversidad de técnicas para la genotipificación de cepas del complejo MTB y detallar su estructura demográfica. Como por ejemplo, la técnica de Van Embden la cual era estándar para tipificar micobacterias, que tenía como principio el análisis de polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción o RFLP y la detección de la variabilidad en la presencia y posición de la secuencia de inserción IS6110. Posterior a ello, nuevas técnicas más rápidas y menos laboriosas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o el Análisis de las Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciales - Número Variable de Repeticiones en Tándem (MIRU-VNTR) han reemplazado las técnicas más antiguas (33).

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) abarca un grupo genéticamente conservado de bacterias que infectan principalmente al ser humano, con una diversidad dada por nueve linajes principales, (L1- L9) que muestran asociación geográfica, étnica y las cuales pueden estar adaptadas específicamente para humanos y otras en animales. De estos nueve linajes, L4 es la que está en la mayoría del mundo abarcando, América, Europa y parte de África, mientras que L2 o Beijing predomina en Asia Oriental y se relaciona con cepas resistentes a medicamentos, Por otra parte, L3 o Delhi/CAS está mayormente concentrado en el subcontinente indio y en África oriental, Adicionalmente, L1 o indo-Oceánica, es común en regiones del Pacífico y del Sudeste Asiático.

En Colombia la distribución de linajes de MTB se ha visto marcada por la presencia del genotipo Beijing, uno de los genotipos más prevalentes asociados con la TB-MDR, lo cual lo posiciona como un patógeno emergente en el país. Los primeros aislamientos pertenecientes a este genotipo fueron reportados por primera vez en 1998, principalmente en la región suroeste del país (34). Por otro lado, estudios realizados en el Valle del Cauca, revelan que el L2- Beijing circula en Buenaventura en la costa del Pacífico, siendo este el genotipo más prevalente en la región y el tercero más frecuente

a nivel nacional (35). No obstante, estudios realizados durante la última década, muestran un patrón de diversidad dominado por el linaje de la Línea 4 - Euro-Americana, con predominio de los sublinajes LAM Latin-American-Mediterranean y Haarlem (36).

Estudios locales empleando la técnica de genotipificación MIRU-VNTR en ciudades como Cali confirman la predominancia de los sublinajes antes mencionados y además de ello, han permitido identificar agrupaciones que sugieren transmisión reciente en contextos urbanos, principalmente de los linajes Latinoamericano mediterráneo (LAM), Haarlem, Beijing y Camerún (33).

Por otro lado en Norte de Santander se ha aplicado la técnica de WGS, en donde los análisis comparativos mostraron la composición filogenética de las poblaciones locales, por medio de una clasificación de sublinajes L4 distribuidos en H1 del clado Haarlem, LAM3, LAM9, LAM 1, LAM 11 y T, siendo los más frecuentes H1, LAM9 y LAM11 (10).

Finalmente, un estudio realizado en el Amazonas obtuvo como resultado que los genotipos de 74 aislamientos pertenecían a L4, de los cuales 72 fueron del linaje LAM y 2 del genotipo Haarlem (37). La presencia de cepas Beijing y de determinados grupos, como indígenas, mencionado en el artículo, sugiere un foco de vigilancia para controlar cadenas de transmisión de TB multidrogorresistente.

2.2 Tuberculosis en Colombia.

2.2.1 Situación epidemiológica

De acuerdo con el Informe Mundial 2024 de Tuberculosis de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en donde se menciona información obtenida del año 2023, el número total de personas infectadas por tuberculosis en este año fue de 10,8 millones de casos. Lo cual representa un incremento progresivo en comparación con 2022 donde se presentaron 10,7 millones de casos, 10,4 millones en 2021 y 10,1 millones en 2020, mostrando un retroceso en las metas de reducción de esta enfermedad (3).

En el SIVIGILA para el año 2023 se notificaron 20.027 casos de tuberculosis, presentando un incremento del 13,9% en comparación con el año 2022, donde se notificaron 17.495 casos. Las entidades territoriales con mayor reporte de casos fueron: Antioquia 4.042 casos, Cali 1.710, Bogotá 1.457, Santander 1.179 y Barranquilla 1.002. A diferencia del Archipiélago de San Andrés y Providencia, Vaupés, Guainía las cuales reportaron el menor número de casos de TB siendo 7, 15 y 19 respectivamente (38).

En Colombia, según el Instituto Nacional de Salud (INS) en 2024, se notificaron al SIVIGILA 24.816 casos de TB. Las entidades territoriales con mayor reporte de casos fueron: Antioquia 4421 casos, Cali 1650, Bogotá D.C 1.447, Santander 1.248, Barranquilla 981, Norte de Santander 850, Valle 807. Siendo el Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina con 9 casos, Vaupés 20, Guainía 27, Vichada 33 siendo estas las entidades territoriales con menor número de casos (3).

En cuanto la incidencia, se presentó un total de 36,78 por 100.000 habitantes, lo cual evidencia un incremento comparado con la tasa de 28,24 por 100.000 habitantes en 2019 y un aumento de 3,3 % comparado con la tasa de 2023 de 35,61 por 100. 000 habitantes). En el 2024, las entidades territoriales con mayor tasa de incidencia son: Amazonas (81,10 x 100.000 habitantes), Barranquilla

(69,54 x 100.000), Cali (67,82 x 100. 000), Caquetá (65,53 x 100 000), Risaralda (63,35 x 100 000) Guajira (61,76 x 100 000), Meta (60,66 x 100 000) y Antioquia (58,13 x 100 000) (3).

2.2.2 Métodos de diagnóstico molecular

MTB presenta una gran diversidad genética que impacta directamente en la presentación de la enfermedad, la transmisión y la susceptibilidad a los fármacos, razón por la cual los métodos moleculares son esenciales para llevar a cabo el análisis de esta diversidad, ya que permiten clasificar las cepas obtenidas de MTB en distintos linajes y sublinajes.

Dentro de estos métodos encontramos PCR en tiempo real (RT-PCR), microarrays, PURE-LAMP, secuenciación de nueva generación (NGS) y WGS, no obstante el método de detección más reciente es TB-CRISPR. En la Tabla 2. se describen cada uno de ellos con el objetivo de conocer el mecanismo mediante el cual permiten identificar MTB (39).

Método	Principio / mecanismo de detección
RT-PCR	Detecta genes amplificados como IS6110, <i>hupB</i> , <i>gyrA</i> , <i>mpt64</i> y otros genes de virulencia, mediante la amplificación en tiempo real del ADN de MTB.
Microarray	Se utilizan para obtener datos como SNPs, con alta densidad y genes de resistencia como <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>rpoB</i> .
PURE-LAMP	Detecta el ADN DE MTB aproximadamente en dos horas mediante amplificación y detección visual mediante luz ultravioleta (UV).
NGS	A partir del ADN extraído se realiza un proceso de secuenciación masiva en donde los resultados se cargan en bases de datos o se analizan mediante herramientas bioinformáticas, para identificar mutaciones presentes en las secuencias de MTB.
WGS	Lee todo el genoma de MTB, lo cual permite evaluar variaciones de baja frecuencia y detectar mutaciones SNPs y mutaciones poco comunes en secuencias de MTB.

RFLP	Adicional a ello se encuentra el método RFLP, uno de los métodos más utilizados para la genotipificación de MTB. Se fundamenta en la fragmentación del ADN, separación por medio de electroforesis en gel y uso de sondas específicas para IS6110 que se une con los fragmentos obtenidos, generando patrones de bandas que permiten determinar la homología entre cepas de MTB.
-------------	--

Tabla 2. Métodos diagnósticos moleculares de MTB. La tabla presenta los principales métodos diagnósticos moleculares, acompañados de su fundamento para llevar a cabo el proceso de detección de MTB. La información fue tomada y adaptada del artículo Mousavi-Sagharchi SMA, Afrazeh E, Seyyedian-Nikjeh SF, Meskini M, Doroud D, Siadat SD. New insight in molecular detection of Mycobacterium tuberculosis. *AMB Express*. 2024 Jun 21;14(1):74. doi: 10.1186/s13568-024-01730-3. PMID: 38907086; PMCID: PMC11192714.

2.2.3 Diagnóstico en poblaciones de alto riesgo

Las personas privadas de la libertad (PPL) constituyen un grupo poblacional con alto riesgo de adquirir la enfermedad a causa de elementos que afectan el sistema inmunológico, como coinfección con VIH, consumo de sustancias psicoactivas, alcoholismo y malnutrición, además de lo cual se añaden deficiencias sanitarias y hacinamiento carcelario (40).

Por estas razones, el tamizaje y diagnóstico de la tuberculosis en esta población debe ser una prioridad en la salud pública. La evaluación a la población PPL junto con la población de habitantes de calle, se realiza cuando el paciente presenta tos con expectoración de más de 15 días o aquellos con síntomas respiratorios de al menos un día que hayan tenido contacto con casos confirmados de tuberculosis, en ambas situaciones se debe garantizar que se realice prueba molecular, el cultivo líquido y la radiografía de tórax. En los individuos cuyo resultado del cultivo líquido sea positivo se debe realizar la identificación de la especie y la prueba de sensibilidad a fármacos (rifampicina e isoniacida) (40).

2.2.4 Tratamiento actual empleado

El tratamiento recomendado por la OMS y los programas nacionales de control se centran en la administración de 3 a 4 fármacos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol) con una duración de 4 a 6 meses (41), en donde se le administra al paciente isoniazida+rifampicina+pirazinamida+etambutol por 56 dosis de lunes a sábado. Seguido por 4 meses con isoniazida y rifampicina hasta completar 112 dosis de lunes a sábado (*Ministerio de Salud y Protección Social, Colombia*). *Abecé tuberculosis, 2021*). Durante el transcurso del tratamiento se recomienda no suspenderlo antes de tiempo dado que, los bacilos tuberculosos presentes el huésped podrían generar resistencias a los medicamentos. Cuando esto sucede o que la TB no responde a los medicamentos habituales, se denomina «farmacorresistente» y esto genera un cambio en el tratamiento, en este caso el tratamiento inicia con un esquema oral de 6 meses de duración en donde se combine la bedaquilina, el linezolid, moxifloxacino y pretomanid (1). Seguido de 14 meses de Linezolid, Clofazimina y Levofloxacino (*Ministerio de Salud y Protección Social (Colombia)*). *Abecé tuberculosis, 2021*)

2.3 Mecanismos de resistencia

Las micobacterias poseen una resistencia natural a bastantes antibacterianos, dado que tienen una pared compleja, hidrófoba, con una permeabilidad reducida para variedad de compuestos, por ello, el tratamiento se debe realizar con antibacterianos combinados y específicos, que según la evolución del paciente se deben o no variar (42).

MTB no forma esporas y a su vez es altamente resistente a la desecación, luego de 2 horas de exposición a la luz solar se ocasiona su muerte. En esputo puede tener una exposición solar de 20 a 30 horas y 6 - 8 meses al abrigo de la luz solar y aun así puede resistir ante estas condiciones. Adicional a ello, esta presenta resistencia a ácidos, álcalis y diversos desinfectantes, entre ellos el formaldehído, el glutaraldehído, el fenol, derivados, el etanol de 70% o menor grado y el hipoclorito

(43).

Estudios genéticos han explicado que la resistencia de MTB a los fármacos antituberculosos está dada por mutaciones cromosómicas en los genes que codifican el punto diana del fármaco o enzimas que se encuentren implicadas en la activación de este. La tasa de resistencia es más elevada para ETB y más para RIF y las quinolonas (44).

La mayor parte de la resistencia en MTB es causada por mutaciones y mecanismos moleculares asociadas al desarrollo de estas. Asimismo, el estrés externo dado por medicamentos o por hipoxia, induce la tolerancia a los medicamentos, en donde poblaciones bacterianas denominadas “persistentes”, al parecer han desarrollado tolerancia a los fármacos en ausencia de mutaciones genotípicas (45), probablemente dado por un mecanismo codificado genéticamente, donde la mutación se da en la región *glp K* gen; el cual está involucrado en el metabolismo del glicerol. Si en esta región se generan inserciones o deleciones se generan genotipos tolerantes a fármacos. Es por ello que MTB-MDR y MTB-XD poseen un alto enriquecimiento en esta región, generando mutaciones en el cambio de marco (45).

Adicionalmente, MTB exhibe 2 tipos de resistencia. La resistencia intrínseca que se refiere a la propiedad innata de MTB que hace que un medicamento o un grupo de estos sea menos eficaz, de la misma manera, resulta importante detallar que esta resistencia está presente en todos o la mayoría de miembros de MTB. Por otro lado, la resistencia adquirida se refiere a la resistencia a los antibióticos que va evolucionando por medio de mutaciones cromosómicas o transferencia horizontal de genes. Un ejemplo de ello son las mutaciones de pérdida parcial de función en la enzima activados de la isoniazida (INH) *katG* es el mecanismo principal que produce resistencia a la INH, por otro lado, en el caso de la resistencia a la rifampicina se produce por mutaciones puntuales en la región determinante de resistencia a la rifampicina en la Subunidad beta de la ARN

polimerasa (*rpoB*). (46)

La resistencia intrínseca en MTB está dada por variedad de mecanismos entre los cuales se atribuye principalmente a la impermeabilidad de la membrana externa micobacteriana (MOM) dado que, los solutos hidrófilos no pueden pasar a través de los ácidos micólicos (46). Por otro lado, las bombas de eflujo se dan debido a la permeabilidad selectiva de la envoltura micobacteriana, ya que, cuando el fármaco logra atravesar la red compleja de la envoltura que como se mencionó anteriormente está compuesta principalmente por peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos, funcionan como una línea de defensa para MTB. Las bombas de eflujo son proteínas transmembranales que hacen más fácil el traslado de moléculas pequeñas fuera del citosol o del periplasma. (46), un ejemplo de este suceso está demostrado por la bomba de eflujo MmpS5/L5 es activa contra diversos fármacos, entre ellos la bedaquilina y la clofazimina, promoviendo así la resistencia intrínseca en MTB y así mismo, puede aumentar más mediante mutaciones, promoviendo la resistencia adquirida a los medicamentos.

Otro mecanismo de resistencia está dado por mecanismos de resistencia citosólica intrínseca de resistencia intrínseca a medicamentos se puede observar dentro de *whiB7* que es un factor de transcripción que detecta cuando se produce una parada en la traducción, que puede darse por estrés ribosomal en medio de un tratamiento de medicamentos, factores de estrés dados por el huésped, entre otros. (47)

2.4 Mecanismos de virulencia

MTB cuenta con dos tipos de factores de virulencia, los cuales se dividen en función de su naturaleza en factores de virulencia no proteicos y factores de virulencia proteicos (48).

Dentro de los factores de virulencia no proteicos se encuentran lípidos, glicolípidos, glicanos, ácidos nucleicos y metabolitos; componentes presentes en la superficie celular de MTB y que participan

en procesos esenciales como la supervivencia intracelular, el reconocimiento inmunológico y la interacción huésped-patógeno (48). Entre ellos se encuentran: 1. Los ácidos micólicos (MA) que bloquean el receptor TLR2 disminuyendo la producción de IL-8, y activan TREM2 para aumentar MCP-1 y el reclutamiento de macrófagos permisivos a MTB. 2. El ácido dimicólico de trehalosa (TDM), que activa el receptor Mincle, inhibiendo la maduración del fagosoma y permitiendo que así MTB sobreviva dentro de los macrófagos. 3. Los dimicocerosatos de ftioceol (PDIM), que permiten que MTB evada el reconocimiento de los TLRs al ocultar los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) de MTB, 4. Lipoarabinomanano manosilado (ManLAM) presente en la activación de la vía de vigilancia citosólica y quien facilita la entrada de MTB en los macrófagos y evita su destrucción al inhibir la maduración del fagosoma (49).

Los factores de virulencia proteicos de MTB le permiten sobrevivir, replicarse, evadir las defensas del huésped y manipular los procesos celulares del sistema inmunitario, evitando su eliminación y permitiendo un constante proceso de infección (49). Estos factores se dividen en función de la interacción con el huésped en: 1. Modificadores de la actividad de TLR2, 2. Reguladores de la producción de citocinas, 3. Disruptores de la función del fagosoma y moduladores de la autofagia y 4. Muerte celular (49).

Dentro de los principales factores de virulencia proteicos se encuentra el sistema de secreción de antígeno secretor temprano (ESAT-6), también conocido como sistema de secreción tipo VII, que desempeña un papel crucial en la virulencia. MTB posee cinco sistemas de secreción (ESX-1 a ESX-5). ESX-1, -3 y -5 se encuentran principalmente asociados al proceso de virulencia, contribuyendo cada uno de forma única a la capacidad del patógeno para infectar y persistir en el huésped. Los genes ESX codifican las proteínas de la familia PE-PPE y los componentes conservados *EccB*, *EccC*, *EccD* y *MycP*. (48).

2.5 Genómica comparativa de Micobacterias

La genómica comparativa constituye una herramienta esencial para el análisis de la diversidad genética al utilizar gran variedad de herramientas que permiten comparar secuencias genómicas y así identificar regiones homólogas y de diferencia entre cada una de ellas. Adicionalmente, permite identificar genes que pueden encontrarse relacionados con diversos sistemas biológicos, lo cual puede influir en enfoques innovadores para el tratamiento de enfermedades humanas y así mejorar la calidad de la salud (50).

En el caso de MTB, el uso de esta herramienta permite la detección de genes que podrían estar asociados a la resistencia a fármacos de primera y segunda línea. Mediante la aplicación de esta herramienta es posible detectar mutaciones en genes como *rpoB* (resistencia a rifampicina), *katG* (resistencia a isoniacida), *embB* (resistencia a etambutol), entre otros (51). Además de la resistencia, la genómica comparativa ha facilitado la identificación de genes y detección de mutaciones relacionadas con la virulencia, permitiendo que aumente la capacidad de la bacteria para invadir, sobrevivir y multiplicarse dentro del huésped, como lo es los sistemas de dos componentes SDC, que regulan aspectos implicados en la virulencia, entre ellos se encuentra PhoP/PhoR, que regula de forma positiva genes requeridos en el proceso de hipoxia, estrés oxidativo y la disminución de pH (52). En conjunto, la genómica comparativa permite caracterizar la resistencia y además, mediante estos estudios se puede comprender los mecanismos moleculares que determinan la patogenicidad y adaptación evolutiva de MTB.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

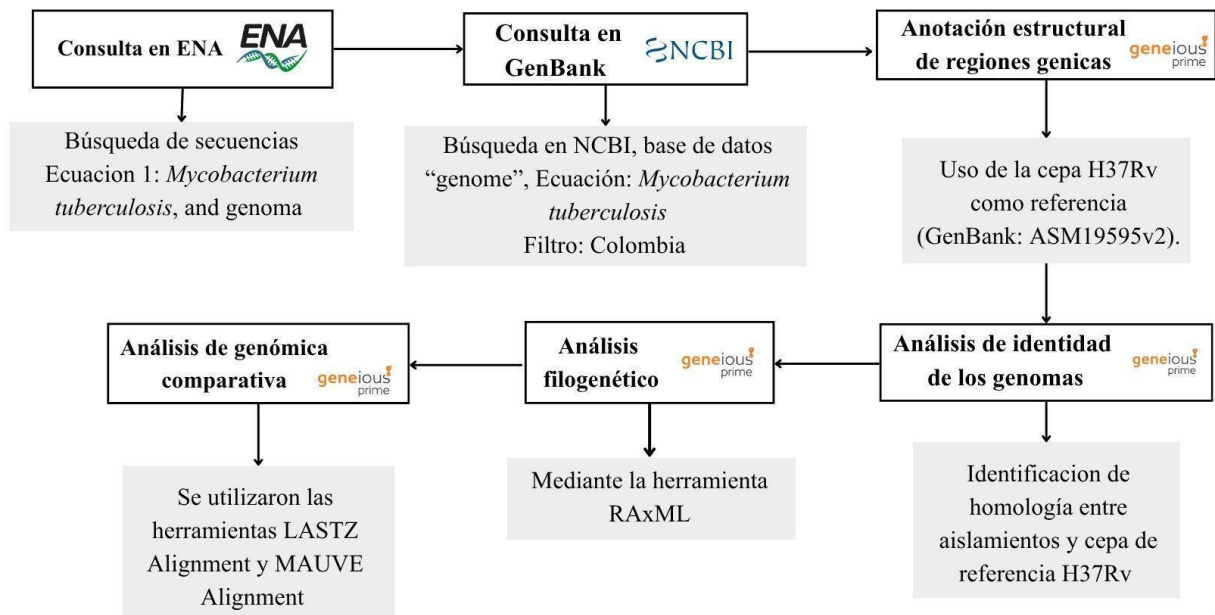


Figura 2. Diseño metodológico

3.1 Búsqueda de genomas completos de *Mycobacterium tuberculosis* de aislamientos de pacientes colombianos.

Para la obtención de genomas completos de MTB, se realizó una búsqueda en las bases de datos del Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA) y la base de datos Genomes del National Center for Biotechnology Information (NCBI). En la base de datos del ENA se utilizó la ecuación de búsqueda “*Mycobacterium tuberculosis* AND genome”, arrojando un total de más de 1.000 registros, por lo cual se añadió a la ecuación el filtro “AND Colombia” con el fin de limitar los registros a aislamientos provenientes de pacientes colombianos. Para complementar dicha información se realizó la búsqueda en el NCBI en donde se utilizó la ecuación de búsqueda en “*Mycobacterium tuberculosis*” y se aplicó el filtro: Country: Colombia.

Los criterios de inclusión establecidos para la selección de las secuencias fueron que los genomas debían estar completos, es decir, que correspondieran a ensamblajes finalizados y no a fragmentos o secuencias parciales. Además, se filtraron los resultados para asegurar que cada registro correspondiera a MTB de cualquier región de Colombia. Esta metodología permitió recolectar un

conjunto representativo y de alta calidad de genomas completos para posteriores análisis genómicos.

3.2 Anotación estructural de regiones génicas de los genomas de MTB de aislamientos de pacientes colombianos.

Se llevó a cabo una anotación estructural de genes y otras regiones de los aislamientos de MTB recuperados de bases de datos públicas que no tuviesen datos de anotación genómica tomando como referencia la cepa mundial H37Rv (acceso GenBank: ASM19595v2). Durante este proceso, se buscó similitud entre las secuencias de los genomas provenientes de aislamientos para identificar genes codificantes, regiones reguladoras, y otras características con el fin de establecer un marco comparativo funcional entre los aislamientos.

Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple de los genomas empleando la herramienta "MAFFT Alignment" integrada en el software Geneious Prime 2025. MAFFT es un programa de alineamiento de secuencias múltiples ampliamente utilizado en secuencias múltiples de ADN o proteínas, reconocido por su alta precisión, velocidad y capacidad de manejar grandes volúmenes de datos genómicos. Este algoritmo usa la transformada rápida de Fourier (FFT) con el fin de convertir las secuencias en representaciones numéricas que facilitan la detección de regiones homólogas y la optimización del alineamiento global (53).

3.3 Análisis de identidad de los genomas seleccionados de *Mycobacterium tuberculosis*.

La herramienta "*MAFFT Alignment*" dentro del software Geneious Prime 2025 se utilizó para identificar la homología de los aislamientos encontrados en las bases de datos, en comparación con la cepa de referencia H37Rv. Se utilizó la secuencia Logo para mapear regiones idénticas. Asimismo, se desarrolló una matriz de identidad que permitió evaluar la homología de los genomas de interés de manera individual respecto al genoma de referencia.

3.4 Análisis de genómica comparativa de aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* respecto a la cepa de referencia mundial H37Rv.

Se realizó un análisis de genómica comparativa por medio de las herramientas de alineamiento de genomas LASTZ Alignment y MAUVE Alignment dentro del software Geneious prime 2025. LASTZ es un programa de alineamiento de secuencias que utiliza algoritmos de alineamiento local basados en el concepto de "alineamiento final". Permite encontrar regiones de similitud entre dos secuencias, y luego extiende y depura estas regiones para identificar alineamientos más precisos. En contraste, MAUVE utiliza un enfoque de alineamiento de genomas enteros basado en la detección de bloques de secuencias conservadas. Identifica regiones llamadas "locally collinear blocks" (LCBs), que representan regiones homólogas entre genomas. A diferencia de LASTZ, MAUVE se utiliza para comparar genomas completos y detectar eventos de reordenamiento genómico.

El análisis se desarrolló por medio de ambas herramientas realizando dos alineamientos globales de los genomas encontrados de pacientes colombianos respecto al genoma de referencia mundial H37Rv (acceso GenBank: ASM19595v2). Para la identificación de variantes génicas se utilizó la herramienta "Annotated & Predict" y la opción "Find Variations/SNP's", ajustando el mapeo de lecturas contra los genomas de referencia. Adicionalmente se seleccionó la opción "Analyze Effects on Translations" que permite conocer cómo se verá afectado el fenotipo de la proteína.

3.5 Análisis filogenético

Con el fin de evaluar el comportamiento de los genomas de interés y su homología respecto al genoma de referencia H37Rv y a Beijing-like, se generó un árbol filogenético de máxima verosimilitud con los 24 genomas usando la herramienta RAXML, la cual es una herramienta de reconstrucción diseñada para inferir árboles filogenéticos a partir de secuencias moleculares. El

análisis filogenético se desarrolló utilizando el modelo general reversible del tiempo de evolución (GTR), el cual permite describir los cambios del DNA durante el proceso de desarrollo. Este modelo asume que las sustituciones nucleotídicas son reversibles en el tiempo, es decir, que la probabilidad de cambio de una base a otra es simétrica y puede ocurrir en ambas direcciones a lo largo del proceso evolutivo. Además, este modelo incorpora la noción de que las tasas de sustitución son constantes en cualquier dirección temporal, permitiendo la reversión de cambios nucleotídicos.

Para evaluar la confiabilidad de este proceso de implemento un Bootstrap de 1000 inferencias de remuestreo y se utilizó *M. canettii* (acceso a GenBank: ASM25337v1) como outgroup debido a su posición divergente y su mayor variabilidad genética en comparación con las subespecies principales de MTB. Es importante mencionar que el genoma del aislamiento denominado como “*Santander_17*” no se logró usar en el análisis filogenético (los algoritmos detectaban errores en su secuencia).

4. RESULTADOS

En total se analizaron 24 genomas de MTB pertenecientes a cepas colombianas. De estos, 18 genomas proceden de un estudio realizado en Norte de Santander (10). Estos aislamientos clínicos fueron previamente secuenciados con tecnología de lectura corta (Illumina), en dicho proceso, estas secuencias fueron sometidas a control de calidad y posteriormente se ensamblan de novo utilizando algoritmos de ensamblaje para lecturas cortas, generando archivos FASTA. Por otra parte, los 6 genomas restantes fueron obtenidos mediante el repositorio NCBI, donde se encontraban disponibles en estado ensamblado y curado, lo cual asegura que estos aislamientos ya pasaron por un proceso de verificación de calidad y anotación básica, estos fueron aislados de Buenaventura y se identificaron como la cepa Beijing-Like. La tabla 3 describe la información asociada a los genomas.

Código de Acceso	Base de datos	Tamaño (pb)	Anotación	Procedencia
SAMEA114861640	ENA	4.411.532	No	Santander (1)
SAMEA114861641	ENA	4.411.532	No	Santander (2)
SAMEA114861642	ENA	4.411.532	No	Santander (3)
SAMEA114861643	ENA	4.411.532	No	Santander (4)
SAMEA114861644	ENA	4.411.532	No	Santander (5)
SAMEA114861645	ENA	4.411.532	No	Santander (6)
SAMEA114861646	ENA	4.411.532	No	Santander (7)
SAMEA114861647	ENA	4.411.532	No	Santander (8)
SAMEA114861648	ENA	4.411.532	No	Santander (9)
SAMEA114861649	ENA	4.411.532	No	Santander (10)
SAMEA114861650	ENA	4.411.532	No	Santander (11)
SAMEA114861651	ENA	4.411.532	No	Santander (12)
SAMEA114861652	ENA	4.411.532	No	Santander (13)
SAMEA114861653	ENA	4.411.532	No	Santander (14)
SAMEA114861654	ENA	4.411.532	No	Santander (15)
SAMEA114861655	ENA	4.411.532	No	Santander (16)
SAMEA114861656	ENA	4.411.532	No	Santander (17)
SAMEA114861657	ENA	4.411.532	No	Santander (18)
CP017598.1 Beijing-Like 1104	NCBI	4.380.156	Si	Buenaventura
CP017593.1 Beijing-Like 35049	NCBI	4.427.062	Si	Buenaventura
CP017594.1 Beijing-Like 36918	NCBI	4.427.062	Si	Buenaventura
CP017595.1 Beijing-Like 38774	NCBI	4.427.062	Si	Buenaventura
CP017597.1 Beijing-Like 50148	NCBI	4.427.062	Si	Buenaventura
NZ_CP010873.1	NCBI	4.427.062	Si	Buenaventura

Tabla 3. Aislamientos utilizados en el análisis de genómico comparativo de MTB. Todos los aislamientos procedentes de la región de Santander carecen de anotación genómica

4.1 Anotación estructural de regiones génicas de los genomas de *Mycobacterium tuberculosis* de aislamientos de pacientes colombianos.

Se anotaron las regiones génicas de los 18 genomas de MTB pertenecientes a la región de Santander, Colombia, tomando como referencia el genoma de la cepa de referencia mundial H37Rv, mediante el software Geneious Prime. En primer lugar, se importaron los archivos FASTA correspondientes a cada uno de los aislamientos y se ejecutó el módulo de anotación estructural mediante la opción

Annotate and Predictor. En este proceso se identificaron un total de 3814 genes, de los cuales 48 codificaban para RNAs y el restante para proteínas (CDS). Asimismo, se identificaron siete regiones no clasificadas (Misc feature). Para la visualización circular de los genomas se usó la herramienta *Circular Map*. Ver la figura 3, la cual representa la estructura génica de las anotaciones en los 18 aislamientos provenientes de Santander que no contaban con anotaciones genómicas en la base de datos del ENA de MTB.

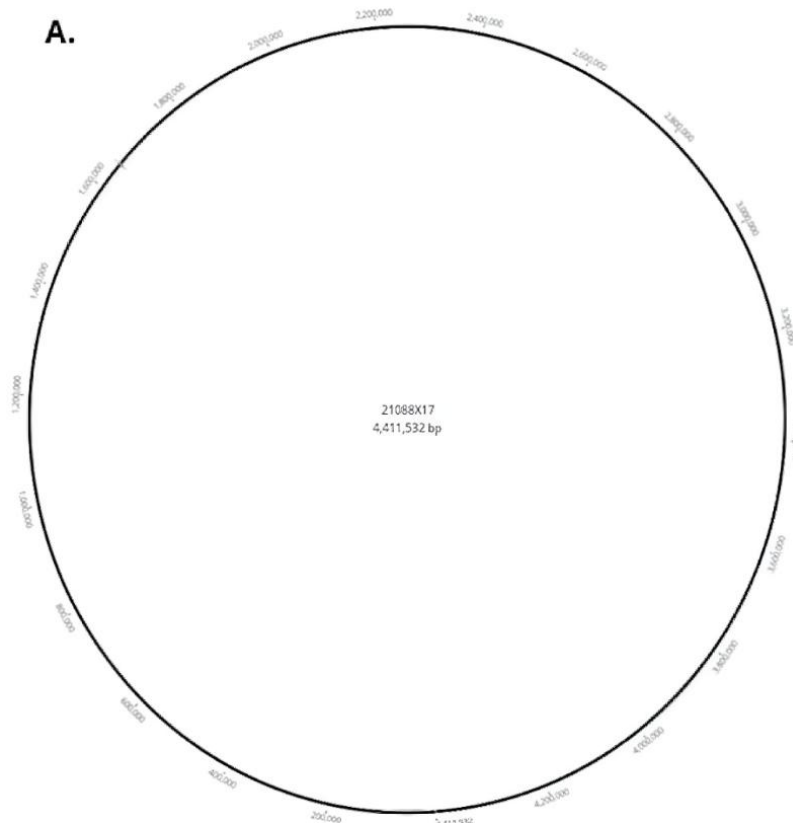


Figura 3A. Genomas sin proceso de anotación. En la figura se observan las ubicaciones genómicas sin identificación de genes, información que permite identificar la necesidad de realizar un proceso de anotación previo al análisis comparativo. Fuente propia.

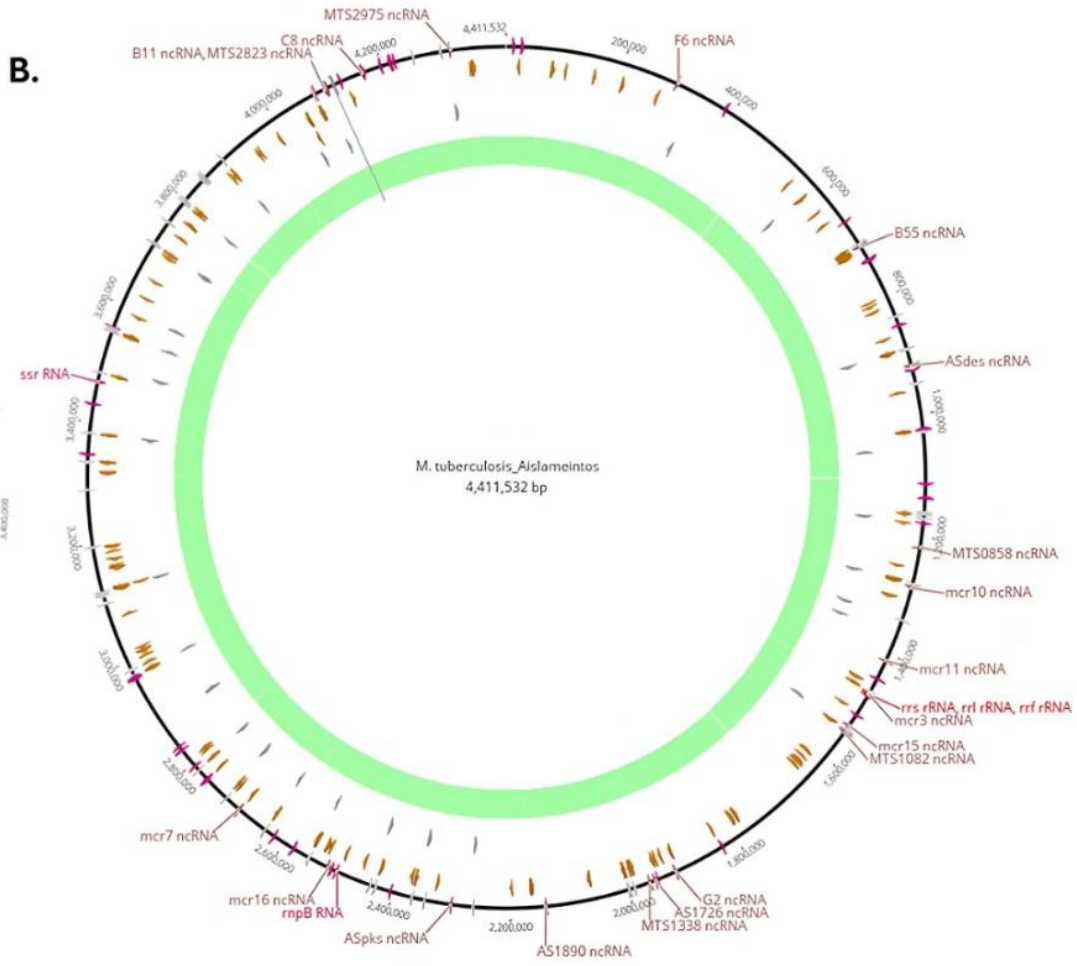


Figura 3B. Representación gráfica de los genomas una vez fueron anotados. Este proceso permite observar genes codificantes, regiones no codificantes, rRNAs, tRNAs y demás elementos funcionales distribuidos alrededor. Fuente propia.

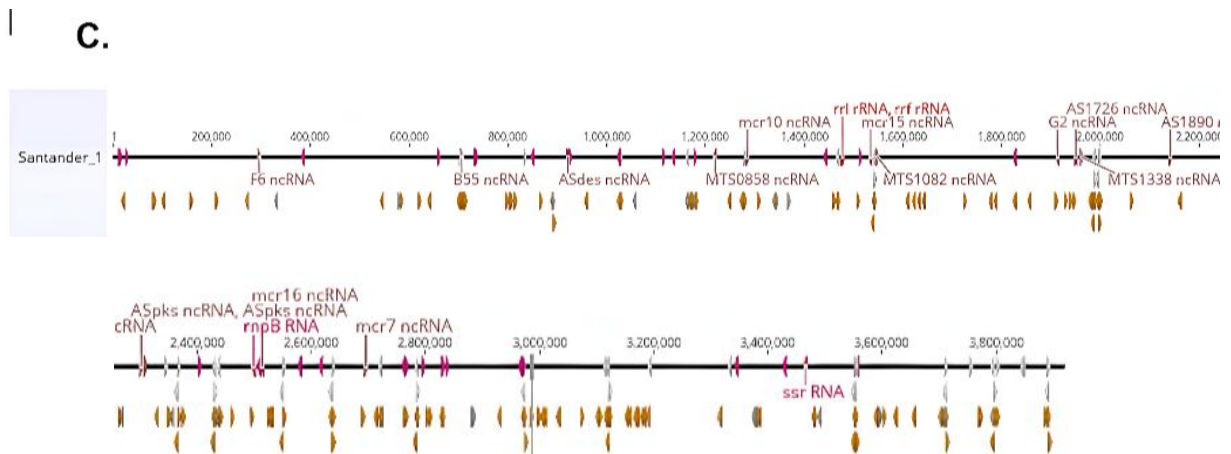
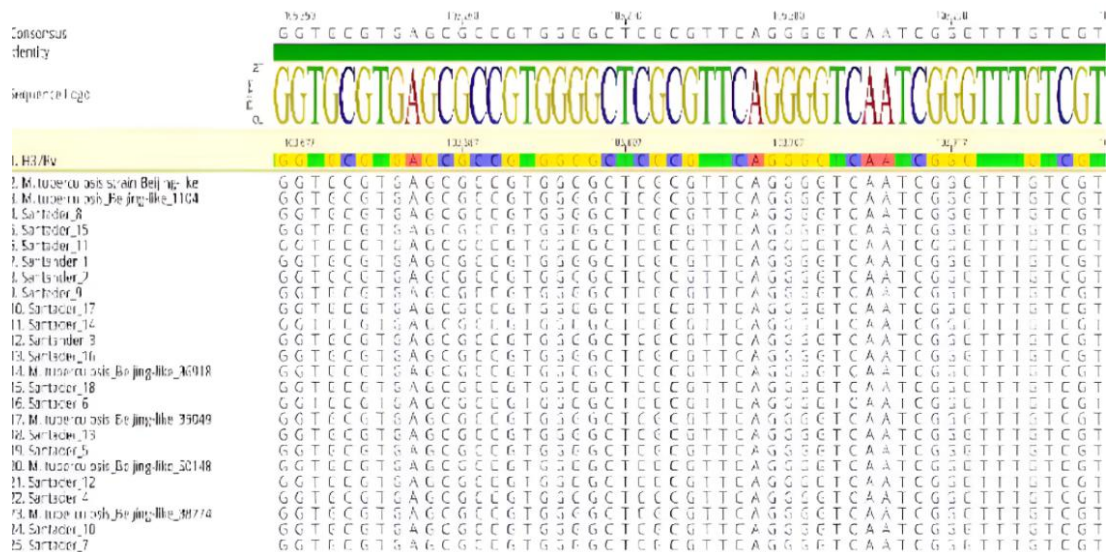


Figura 3C. Representación lineal del genoma secuenciado. Esta figura se generó a partir del modo *Linear Map*, que permite ver el genoma en disposición lineal de una fracción del genoma anotado del aislamiento “Santander 1”. Fuente: propia.

4.2 Análisis de identidad de los genomas seleccionados de *Mycobacterium tuberculosis*.

La identidad general de los aislamientos de MTB se evaluó mediante un alineamiento múltiple de genomas completos (figura 4) utilizando la herramienta LASTZ Alignment en el software Geneious Prime versión 2025, la cual permite la detección precisa de cambios nucleótidos mediante la comparación directa con la secuencia de referencia H37Rv. Esta herramienta es ampliamente usada para análisis comparativos de genomas estrechamente relacionados, ya que identifica regiones conservadas, SNPs, inserciones y deleciones (54).

La figura 4 muestra el alineamiento, la zona superior muestra la secuencia consenso, representando el nucleótido que fue más frecuente en cada una de las posiciones del conjunto de secuencias. Esta representación gráfica tipo sequence logo permite identificar las posiciones que están altamente conservadas mostradas por letras grandes y predominantes y muestra las posiciones con variabilidad representado por la aparición de múltiples nucleótidos de menor tamaño.



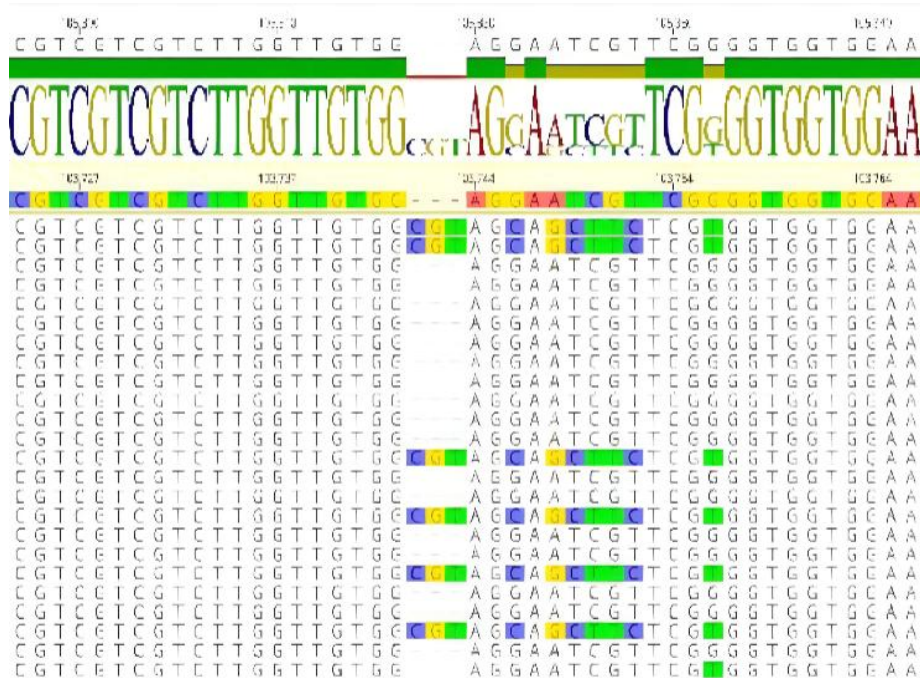


Figura 4. Alineamiento de los aislamientos evaluados de MTB. En la gráfica se presenta un fragmento aleatorio del genoma del alineamiento múltiple, en el cual se evidencia un alto porcentaje de identidad y una única región polimórfica (solo se representa una región del genoma, el comportamiento fue similar a lo largo del genoma). La secuencia LOGO ilustra de manera efectiva las regiones conservadas y polimórficas, destacando su relevancia en el análisis genómico. Las letras de diferentes colores y tamaños ubicadas en la parte superior varía en función de si en la posición en la que están ubicadas todos los nucleótidos son iguales en todas las secuencias. Las regiones donde se observan letras sin color indican que allí los nucleótidos coinciden con la secuencia LOGO. Los bloques de color indican mutaciones compartidas en los diferentes aislamientos, que pueden asociarse a un linaje o a una región específica.
Fuente: propia

La matriz de distancias permitió definir la homología de los aislamientos de manera independiente (Anexo 1). Todos los aislamientos mostraron una alta homología con H37Rv, con porcentajes de identidad que oscilaron entre el 97 y 99%.

4.3 Análisis de genómica comparativa de aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* respecto a la cepa de referencia mundial H37Rv.

El análisis de genómica comparativa entre la cepa de referencia mundial de MTB H37Rv fue

seleccionada dado que constituye el estándar más utilizado a nivel mundial en investigación de MTB, siendo un genoma completamente secuenciado, muy bien anotado, validado funcionalmente y de uso común que ha conservado su virulencia (8). Además, H37Rv mantiene la capacidad de generar enfermedad en humanos y su genoma (NC_00962.3), como se mencionó anteriormente, fue el primero en ser secuenciado completamente, lo que permitió establecer una anotación funcional detallada y comparativa frente a otros aislamientos clínicos, es por ello que sirve como marco de referencia para identificar los genes que están implicados con la resistencia y virulencia.

El análisis comparativo de los 24 aislamientos clínicos reveló un total de 28.462 modificaciones asociadas a sustitución, extensión, truncación y pérdida de codón de inicio; con el fin de depurar la información y tener un enfoque en las alteraciones con mayor relevancia funcional se decidió excluir las sustituciones del análisis ya que muchas de ellas corresponden a mutaciones sinónimas las cuales no ejercen un impacto significativo en la estructura o funcionalidad de las proteínas. Así mismo, durante la depuración de información se decidió eliminar aquellas proteínas hipotéticas presentes en los tres eventos restantes.

Se obtuvieron un total de 11 eventos de extensión, 5 eventos de pérdida de codón de inicio y 13 eventos de truncación. Dentro de estos resultados se decidió escoger 15 proteínas para llevar a cabo su análisis más detallado, estas proteínas fueron seleccionadas ya que en la literatura y evidencia científica se han reportado varios estudios sobre su funcionalidad y capacidad de conferir a MTB virulencia, resistencia y evasión del sistema inmune.

Gen involucrado	Proteína que codifica	Tipo de modificación	Efecto en la proteína	Función biológica
<i>Rv3868</i>	<i>EccCa</i> del sistema de secreción ESX-1	Sustitución	Extensión	ATPasa

<i>Rv2875</i>	Proteína inmunogénica mayor secretada <i>Mpt70</i>	Sustitución	Extensión	Respuesta inmune Patogénesis
<i>Rv1496</i>	Subunidad grande de la enzima metilmalonil-CoA mutasa	SNP	Extensión	Conversión de metabolitos Adaptación bacteriana
<i>Rv3800c</i>	Sintasa poliquetídica 13	SNP	Extensión	Biosíntesis de ácidos micólicos Contribución a la resistencia
<i>Rv0978c</i>	PE_PGRS17	SNP	Extensión	Modulación de la respuesta inmune
<i>Rv0355c</i>	PPE7	SNP	Extensión	
<i>Rv0335c</i>	PPE6	Sustitución	Extensión	
<i>Rv0834c</i>	PE_PGRS4	Sustitución	Extensión	Contribución a la virulencia
<i>Rv3347c</i>	PPE55	Sustitución	Pérdida del codón de inicio	Interacción con el huésped
<i>Rv3514</i>	PE_PGRS49	Sustitución	Pérdida del codón de inicio	Evasión de la respuesta inmune
<i>Rv2524c</i>	Enzima clave en la biosíntesis de poliquétidos	SNP	Pérdida del codón de inicio	
<i>Rv2524c</i>	Enzima clave en la biosíntesis de poliquétidos	SNP	Pérdida del codón de inicio	Formación lípidos en la pared Contribución a la virulencia Adaptación al huésped
<i>Rv0462</i>	Reductasa de quinonas NAD(P)H <i>LpdA</i>	SNP	Truncación	Protección contra estrés oxidativo Contribución a la virulencia
<i>Rv3791</i>	Alfa-(1→3)-arabinofuranosiltransferasa	SNP	Truncación	Mantenimiento de la pared celular

<i>Rv0934</i>	Permeasa del transportador ABC específico de fosfato <i>PstA</i>	SNP	Truncación	Transporte de fosfato Contribución a la virulencia
---------------	--	-----	------------	---

Tabla 4. Variantes génicas en genes involucrados en los 24 aislamientos analizados, respecto al genoma de referencia mundial, H37Rv. Las funciones biológicas aquí mencionadas corresponden a información obtenida mediante búsqueda bibliográfica sobre las funciones de estas proteínas y genes en MTB, no reflejan el impacto específico de las variantes encontradas, debido a que el estudio se realizó mediante aproximaciones bioinformáticas.

4.4 Análisis filogenético

Los resultados de la aproximación filogenética revelaron dos agrupaciones entre los aislamientos y las cepas de referencia (figura 5). El primer grupo está conformado por los genomas de los aislamientos Santander 6, Santander 16, Santander 23, Santander 18, Beijing-Like 50148, Beijing-Like 1104, Beijing-Like 36918, Beijing-Like, Beijing-Like 38774 y Beijing-Like 50148. Por su parte el grupo 2, contiene solo aislamientos referentes a Santander en donde también se encuentra la cepa de referencia H37Rv. Finalmente, el aislamiento Santander 9, no presentó ninguna agrupación. Cabe resaltar que se incluyeron los genomas que cumplieron con los criterios de calidad establecidos y que el objetivo del análisis filogenético fue evaluar el posible genotipo de los aislamientos pertenecientes a Norte de Santander.

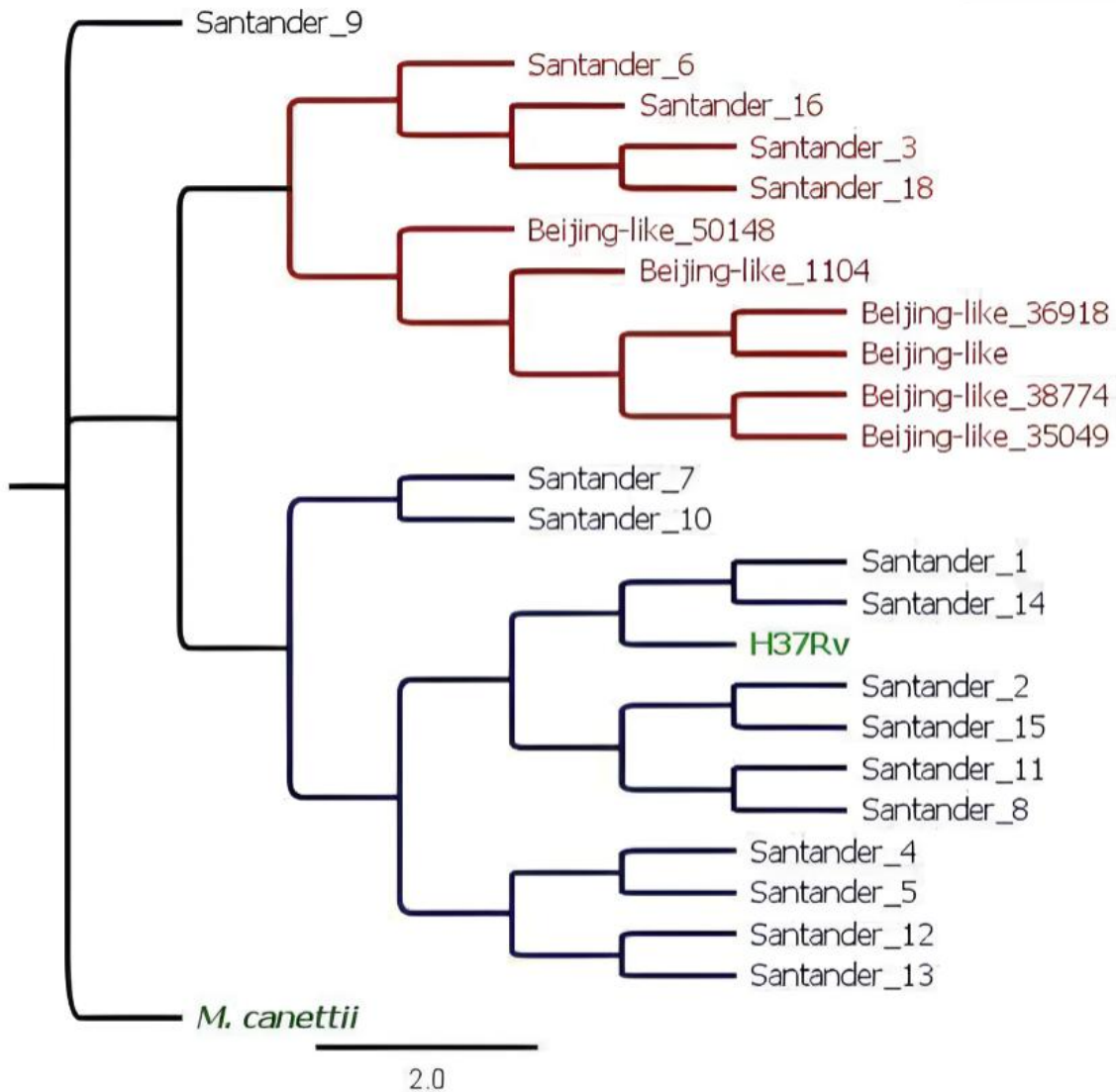


Figura 5. Representación filogenética de aislamientos de MTB.

5. DISCUSIÓN

El control de la TB necesita de investigaciones basadas en tipificación molecular que permita el entendimiento de las características de propagación y conocimiento de las relaciones entre cepas de MTB, que junto con una adecuada comprobación de mutaciones, aseguren un tratamiento efectivo de la enfermedad y por extensión, impidan la transmisión de la enfermedad, por ello surge el presente estudio que tuvo como objetivo identificar las variantes genéticas entre aislamientos de

MTB de pacientes colombianos respecto a la cepa de referencia H37Rv.

El análisis de genómica comparativa entre la cepa de referencia mundial de *M. tuberculosis* H37Rv reveló gran variedad de modificaciones las cuales podrían afectar la función biológica de las proteínas si la modificación se genera en un sitio crítico para esta, lo que podría afectar negativa o positivamente a las vías metabólicas, las interacciones proteína-proteína, la actividad enzimática, entre otras. Asimismo, se podrían generar modificaciones en la estructura tridimensional de la proteína afectando la capacidad de plegarse correctamente, o confiriendo un plegamiento diferente el cual podría estar asociado a eventos de adaptación y supervivencia dentro del hospedero (evasión al sistema inmune y susceptibilidad ante medicamentos) (55).

Los genes involucrados en este grupo de modificaciones génicas codifican para proteínas relacionadas con la biosíntesis de PGL/p-HBAD, con la virulencia y la respuesta inmune del hospedero, proteínas integrales de la membrana, enzimas y proteínas metabólicas y proteínas asociadas a la regulación y transcripción génica. Una de las familias proteicas que presentó un mayor número de eventos fueron las de las familias PEE y PE-PGRS. Acorde a diversos estudios, estas familias desempeñan un papel fundamental en los mecanismos conferidos a MTB como contribución a la virulencia, resistencia a fármacos y evasión del sistema inmune.

Dentro de los efectos asociados a las mutaciones en los genes codificantes de las proteínas se identifican tres: mutaciones asociadas con la extensión en la secuencia primaria de las proteínas, mutaciones que generan pérdida del codón de inicio y mutaciones causales de la truncación en la proteína.

Se identificaron eventos de extensión en la secuencia de las proteínas *EccCa*, *Mpt70*, *Metilmalonyl-CoA mutasa*, *Sintasa poliquetídica 13*, PE_PGRS17, PE_PGRS50, PPE7, PPE6, PE_PGRS4 y PGL/p-HBAD, generados por SNPs y sustituciones de nucleótidos. Esto puede suceder si el SNP

modifica el codón de terminación y lo cambia a un codón que codifica para un aminoácido, provocando que la traducción no se detenga y continúe sintetizando aminoácidos hasta encontrar un nuevo stop más adelante (56)

La Proteína *EccCa* es una ATPasa perteneciente a la familia CbxX/CfqX del sistema de secreción ESX-1 de MTB (57). El evento de extensión identificado en esta proteína, podría indicar hipotéticamente, una alteración a nivel estructural que afecte su capacidad de unión a sustratos o cofactores dentro del Sistema ESX-1.

El Sistema ESX-1 es fundamental en el proceso de resistencia y evasión de la respuesta inmune del huésped en la etapa primaria de la infección, debido a que desencadena rupturas fagosómicas y libera componentes de virulencia bacteriana hacia el compartimento citosólico de las células inmunes del huésped (58). Según estudios realizados por Soler-Arnedo et al 2020, “la delección o inactivación de ESX-1 no afecta el crecimiento *in vitro*, pero causa atenuación de la virulencia en modelos de infección (59) en este contexto, el evento de extensión identificado en la proteína *EccCA*, podría afectar la funcionalidad y eficiencia del Sistema ESX-1. Se han asociado cinco factores virulentos principales a este sistema, dentro de los cuales se encuentra, CFP-10, ESAT- 6, *EspA*, *EspC* y *EspR*, en donde genes como *Rv3868* (codificante de *EccA*) son vitales para la secreción de estas proteínas virulentas

Por otro lado, estudios realizados por Luthra et al (2008) mencionan que un sistema secretor ESX-1 defectuoso impide que el patógeno mutante abandone el fagocito infectado y se propague a las células vecinas. Adicional a ello, la inactivación de la proteína *EccCa* (Gen *Rv3868* que codifica para la proteína *eccA1*) altera la capacidad del patógeno de secretar los factores de virulencia, razón por la cual se considera que es probable que esta proteína interactúa con otros factores del Sistema ESX-1 para proporcionar energía para la exportación de los factores de virulencia (60).

La proteína Pks3 es un policétido sintasa que está implicada en la síntesis de ácidos micolipánicos y micolipénicos, los cuales son ácidos grasos ramificados presentes en la poliactiltrehalosa (PAT), que es un glicolípido exclusivo de la envoltura de (61). Según Wang TT et al (2023), la familia de genes PKS codifican proteínas multifuncionales que contienen dominios necesarios para llevar a cabo reacciones de condensación, reducción y ciclación durante el proceso de biosíntesis de lípidos micobacterianos complejos, esenciales en la virulencia y en la supervivencia del bacilo a nivel intracelular. Adicionalmente, la expresión de esta proteína es regulada en respuesta a diversas condiciones tales como el estrés, hipoxia y variaciones en el pH, lo que sugiere la adaptación de MTB durante una infección crónica.

Respecto a las proteínas de la familia PGRS que presentaron este tipo de evento; información dentro del UniProt (<https://www.uniprot.org/>), se menciona que la PE_PGRS17 posee la capacidad de unirse al receptor TLR2 activando las vías de señalización ERK1/2, p38 MAPK y NF-kappa-B (62), lo que resulta en la maduración de células dendríticas (CD), así como en una mejora en su capacidad para estimular la proliferación y secreción de citocinas de células T CD4+ (45). Se ha descrito que reducen la presentación de antígenos al proteger proteínas presentes en la proteólisis y el procesamiento de la proteasoma dependiente de ubiquitina, lo que podría estar asociado con eventos de evasión inmunológica y modulación de la respuesta inmune (45).

Estudios realizados por Chen T, Zhao Q, Li W, Xie J. (2013), mencionan que esta proteína podría facilitar la supervivencia del patógeno y perjudicar a la célula huésped mediante la remodelación del nicho inmunitario de los macrófagos, compuesto principalmente por citocinas inflamatorias (63). Actualmente no se reportan estudios que mencionan eventos de extensión en este grupo de proteínas, sin embargo, un evento mutacional en los genes codificantes para este tipo de proteínas podrían estar asociados a modificaciones en el proceso de unión al receptor TLR2, intensificando la activación de

las vías de señalización ERK1/2, p38 MAPK y NF- κ B, lo cual podría potenciar su efecto inmunomodulador, contribuyendo a la evasión inmunológica del patógeno. Por otra parte, estudios genómicos muestran que, PE-PGRS4 presenta una variabilidad estructural entre sublinajes del MTBC. Lo cual, sugiere que el gen puede estar sujeto a presiones evolutivas, posiblemente dadas por adaptación, relacionadas con la respuesta del huésped o con condiciones ambientales (64). A su vez, se ha identificado que, mutaciones no sinónimas se han asociado con cepas resistentes a diversos antibióticos, esto a causa de que las mutaciones se dan muy cerca de los sitios activos de la proteína, lo que conlleva las alteraciones estructurales de esta (65).

A nivel general, estudios realizados por De Maio F, Berisio R, Manganelli R, Delogu G, (2020) mencionan que las proteínas PE_PGRS comparten una arquitectura estructural conservada con tres dominios principales: el dominio PE N-terminal; el dominio PGRS, que puede variar en secuencia y tamaño y se caracteriza por la presencia de múltiples repeticiones de aminoácidos GGA-GGX; la secuencia altamente conservada que contiene el motivo GRPLI que une los dominios PE y PGRS y el extremo C-terminal único que puede variar en tamaño (66).

Teniendo en cuenta que estas proteínas presentaron un evento de extensión es de gran importancia realizar un análisis adicional a nivel funcional con modelación de la estructura terciaria para análisis de acoplamiento molecular de la proteína.

De otra parte, las proteínas PPE 7 y PPE 6, al presentar este tipo de mutación, podrían estar asociadas a una posible alteración en el plegamiento o la funcionalidad de estas. En la actualidad no existen reportes en la literatura que describen eventos de extensión o elongación en estas proteínas específicas, ni estudios experimentales que evalúen sus consecuencias estructurales o biológicas. Sin embargo, la funcionalidad de estas proteínas se basa en la activación del proceso de inflamación del huésped al aumentar la expresión de citocinas proinflamatorias, incluido el factor de necrosis tumoral

alfa (TNF- α), la interleucina (IL)-1 β y la IL-6, mientras que suprime la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-10, posiblemente a través del factor nuclear kappa B, ERK1/2 y las vías de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (67). Esto podría indicar que el impacto potencial de esta mutación sobre la función, la estabilidad o la interacción con el huésped sigue siendo incierto y podría representar un punto de interés para futuras investigaciones sobre la familia PPE.

La proteína PGL/p-HBAD presentó un evento de extensión, lo cual podría tener repercusiones funcionales significativas. Hasta el momento, no existen estudios en la literatura que describan las consecuencias de un evento de extensión en esta proteína específica, por lo que su impacto estructural y biológico continúa sin esclarecer. Sin embargo, la familia de proteínas PGL de *M. tuberculosis* se asocian con la producción de β -dioles de cadena larga altamente específicos, dimicocerosatos de ftiocerol, y antígenos glicolípidos fenólicos (PGL) estructuralmente relacionados, que son importantes factores de virulencia (68)

En el caso de la proteína PGL/p-HBAD, esta forma parte de la ruta biosintética de los fenólicos glicolípidos (PGL-tb) y de los derivados del ácido p-hidroxibenzoico (p-HBAD), componentes lipídicos de la envoltura externa de *M. tuberculosis*. Se evidencia que se encuentran relacionados con factores de virulencia ya que su presencia se ha asociado con una menor activación de macrófagos y una disminución en la producción de citocinas proinflamatorias (68)

En cuanto a mutaciones asociadas a la pérdida del codón de inicio, se observaron en la secuencia de las proteínas PE_PGRS49, PE 55, PPE 5, Sistema Toxina-antitoxina (TA) y la enzima clave en la biosíntesis de poliquétidos.

La proteína PEPGRS 49 se caracteriza por participar en la modulación de la respuesta inmune (66). Estudios recientes indican que PEPGRS 49 contiene múltiples epítomos T y B, lo que sugiere su alto potencial inmunogénico y su posible reconocimiento por moléculas HLA (69). Teniendo en

cuenta el evento presentado en la proteína, se podría pensar que este tipo de mutación impediría la traducción adecuada de la proteína, generando una isoforma que afecta la exposición en la superficie de la bacteria lo que podría estar asociado a eventos de evasión del sistema inmune por parte de MTB.

Por otro lado, en un estudio de Tiwari BM, Kannan N, Bhavana T, Nisha K, Lakshmi V, Tirumalai R. (2012), observaron que cepas recombinantes de *M. smegmatis* que expresaban PE5 mostraron una supervivencia mayor en líneas celulares, lo que indica su papel potencial en la persistencia bacteriana. Adicionalmente, los macrófagos que fueron infectados por esta cepa presentaron niveles altos de citoquinas antiinflamatorias. Todo esto es consistente con las estrategias usadas por MTB que subvierte el control de macrófagos de cargas bacilares intracelulares (70). Este estudio sugiere además de lo antes mencionado que, posiblemente esta proteína es inmunomoduladora y también que es probable que participe en establecer y mantener la infección cambiando el equilibrio de Th1 a Th2 y con ello, favorecer la infección de MTB. Es por ello por lo que, la pérdida de codón de inicio en esta proteína se podría interpretar como un mecanismo de evasión antigénica, donde la bacteria no expone una proteína reconocida por el sistema inmune, favoreciendo su permanencia intracelular mediante el silenciamiento de un antígeno funcionalmente activo (70).

La proteína MazE4 es codificada por el gen *Rv1495*. Esta forma parte del sistema toxina- antitoxina MazEF de MTB, el cual tiene un papel importante en la respuesta adaptativa del bacilo frente a condiciones de estrés. Este sistema se compone por la toxina MazF, que posee una actividad endorribonucleasa y su antitoxina MazE, que tiene como función neutralizar su efecto citotóxicos en condiciones normales. Singh et al (2016) demostró que la toxina mencionada interactúa con el dominio C-terminal de la topoisomerasa I de MTB lo que genera una inhibición de la actividad catalítica entre las dos proteínas (71)

Diversos estudios indican que los sistemas MazEF en MTB activan bajo inanición, la exposición a antibióticos o el estrés oxidativo, induciendo un estado de persistencia bacteriana. Dadas las condiciones, MazF ejerce su función ribonucleolítica, generando que el ARN mensajero se degrade y se detenga la traducción proteica, favoreciendo la entrada del bacilo en un estado no replicativo (72). En conjunto, estos hallazgos respaldan que este sistema contribuye a la capacidad de latencia prolongada en MTB, permitiendo que el bacilo pueda estar en latencia prolongada, generando la supervivencia de este bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Este evento puede representar un blanco terapéutico prometedor en el desarrollo de estrategias que permitan combatir la tuberculosis latente (72)

La proteína Polyketide beta-ketoacyl synthase (pks4), está involucrado en vías biosintéticas que son necesarias y específicas para la producción de lípidos ya sea únicos o conjugados de glucolípidos que son determinantes para la virulencia (73), generados por la fabricación de lípidos ramificados que después se incorporan a la pared celular de MTB afectando así la impermeabilidad y las interacciones con el huésped (74).

Esta proteína al ser esencial en la generación de los ácidos grasos al sufrir una mutación de tipo pérdida de codón de inicio puede generar que estas moléculas no se produzcan o queden incompletas lo que, conlleva a nivel de la pared celular una alteración en esta al disminuir la integridad de la barrera lipídica afectando así la resistencia de MTB (74). Además, los lípidos resultantes de pks4 se asocian con la respuesta inmune del huésped y, al no producirse, la infección podría ser menos eficiente al momento de establecer la infección, permanecer dentro de los macrófagos o generar granulomas estables. En este sentido, la pérdida funcional de pks4 no solo podría comprometer la envoltura micobacteriana, sino que también puede modificar el equilibrio entre virulencia y persistencia del bacilo en el huésped.

Por su parte las proteínas que presentaron una mutación que generó truncación en la proteína fueron: PE35, Reductasa de quinonas NAD(P)H LpdA, Alfa-(1→3)- arabinofuranosil transferasa y Permeasa del transportador ABC específico de fosfato PstA.

A la proteína PE35 se le ha atribuido un papel inmunomodulador relevante durante la infección de *M. tuberculosis*. Se ha demostrado que PE35 y su par génico PE 38, estimulan la secreción de citocinas como IL-10 y MCP-1 en macrófagos humanos, mediada por TLR2 y la activación de vías de señalización MAPK, lo que sugiere que este par de proteínas puede participar en la regulación de la respuesta inmunológica del hospedero (75, 76). Además, PE35 se ha usado como antígeno discriminatorio en ensayos serológicos para diferenciar tuberculosis pulmonar y extrapulmonar en sujetos vacunados con BCG frente a controles, lo que evidencia su expresión durante la infección clínica y su reconocimiento por el sistema inmune (77). Una mutación que afecte el codón de inicio, como en el caso de estudio, el gen PE35 puede impedir la síntesis completa de la proteína, o en casos menos severos, provocar su traducción desde un codón interno alternativo. Esto daría lugar a una forma truncada que carecería del extremo N-terminal, región que incluye el dominio PE. Este dominio es clave porque contiene señales de secreción y estructuras necesarias para que la proteína sea exportada correctamente o interactúe con PPE68 y el receptor TLR2. Si esta región se pierde o se altera, la capacidad de MTB para modular la respuesta inmunológica del huésped mediante el complejo PE35/PPE68 se vería comprometida. En consecuencia, podría disminuir la inducción de IL-10, una citoquina con función antiinflamatoria, lo que limitaría la estrategia del patógeno para generar un entorno inmunológico menos hostil.

La proteína dihidrolipoamida deshidrogenasa (lpdA), es una enzima que desempeña un papel importante en el metabolismo de MTB, particularmente en el proceso de generación de energía y en

la biosíntesis de ácidos micólicos, que son componentes clave en la pared celular. A partir del tipo de mutación registrado en este análisis, se podría inferir que este tipo de modificación eventualmente estaría asociado a la resistencia de metabolitos reactivos de nitrógeno y óxido nítrico, debido a que esta enzima juega un papel importante en este proceso (78).

La proteína aftC, hace parte de las arabinosiltransferasas, las cuales son una familia de glicosiltransferasas unidas a la membrana que participan en la biosíntesis del segmento arabinano de dos glicoconjugados clave, arabinogalactano y lipoarabinomanano, en la pared celular micobacteriana. Estas enzimas han resultado ser esenciales para el crecimiento de MTB y son objetivos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos

antituberculosos. En cuanto a la proteína aftC, ésta introduce puntos de ramificación α - (1 \rightarrow 3)

en el dominio interno del arabinano en la síntesis de arabinogalactano y lipoarabinomanano

(79). En el estudio realizado por Madduri, BTSA, Allen, L., Taylor, SC, Besra, et al. Se menciona

que una depleción de aftC provoca una reducción del crecimiento celular, alteraciones en la composición de la envoltura celular, un LAM truncado e incapacidad para formar biopelículas.

Además, la depleción de aftC da lugar a un mutante de *M. bovis* con una infectividad reducida en monocitos humanos THP-1, pero con una inmunogenicidad significativamente mayor (80). A partir

de la información previamente descrita se podría inferir de manera hipotética, que un evento de truncación presente en la proteína aftC afectaría la composición de la pared celular micobacteriana,

provocando la formación de un LAM truncado y afectando la formación de biopelículas, las cuales son un importante factor de virulencia de MTB.

La proteína *pstAI*, componente transmembrana del sistema de transporte específico de fosfato (Pst), tiene como función principal facilitar el transporte activo de fosfato inorgánico a través de la membrana; siendo responsable de la translocación del sustrato hacia el interior de la célula (78). De acuerdo con el estudio realizado por Tischler AD, Leistikow RL, Kirksey MA, Voskuil MI, McKinney JD. (2013), la proteína *pstAI* forma parte de los componentes del sistema junto con *PstS3*, *PstC2* y *PhoT*, los cuales son necesarios para la supervivencia en los macrófagos, siendo *pstAI* esencial para los procesos relacionados con virulencia y de persistencia de MTB frente a la inmunidad del huésped dependiente de IFN- γ (81). En contraste, en el estudio realizado por Tischler AD, Leistikow RL, Kirksey MA, Et al (2013), se analizó la función de la proteína *pstAI* mediante la generación un mutante *pstAI*, el cual mostró sensibilidad a las respuestas inmunitarias del huésped que dependen de (IFN- γ) (81). La atenuación observada en las bacterias mutantes, permiten inferir que el mutante *pstAI* es parcialmente atribuible a una función reguladora del sistema Pst de MTB. Además, determinaron que *pstAI* tiene un papel crucial en el control de la expresión de los genes cuando las concentraciones de fósforo inorgánico (Pi) son abundantes, controlando la actividad del sistema SenX3-RegX3, el cual regula la respuesta bacteriana a la disponibilidad de fosfato. De igual manera, al realizar el estudio en ratones, *pstAI* demostró ser prescindible para la replicación y virulencia en ratones deficientes en IFN- γ (IFN- γ -/-), sin embargo, es necesario para la replicación sostenida y virulencia en ratones que carecen de la sintasa de óxido nítrico inducible por IFN- γ (NOS2 -/-) o la GTPasa regulada por IFN- γ *Irgm1*. (59) Finalmente, la filogenia la circulación de dos linajes de MTB, incluyendo un grupo relacionado con el linaje Beijing, conocido por su posible mayor virulencia y resistencia a fármacos, y otro grupo más cercano a la cepa de referencia H37Rv, lo que indica diversidad genética significativa que puede influir en la respuesta al tratamiento y en el control epidemiológico de la tuberculosis en el país.

6. CONCLUSIONES

- En este estudio los polimorfismos que tuvieron mayor frecuencia fueron aquellos que presentaron un evento de extensión, afectando a las proteínas: PE_PGRS17, Mpt70, PPE6, PPE7, PE_PGRS4 y PE_PGRS50, cuyas funciones se encuentran implicadas en los mecanismos de virulencia, resistencia y evasión del sistema inmune, por lo cual son modificaciones estructurales cuya repercusión funcional desempeña un papel clave en la patogenicidad de MTB.
- El análisis filogenético mostró la existencia de dos linajes distintos de MTB, uno de ellos vinculado al linaje Beijing conocido por su alta resistencia y virulencia, y otro que es muy similar a la cepa de referencia mundial H37Rv. Esta variedad genética indica que el bacilo ha evolucionado y se ha adaptado en las poblaciones de Colombia lo cual subraya la relevancia de seguir realizando investigaciones genómicas que faciliten entender la dinámica epidemiológica y molecular de MTB en el país, con el fin de encontrar patrones que permitan asociar mutaciones con poblaciones específicas, generando así la posibilidad de plantear nuevos tratamientos que vayan direccionados hacia este tipo de situaciones.
- Los resultados obtenidos en este trabajo de grado destacan la importancia de continuar desarrollando investigaciones sobre genómica y biología estructural de MTB, debido a que son estudios que resultan ser fundamentales para entender cómo esta bacteria puede adaptarse, evadir la respuesta inmune del huésped y desarrollar resistencia a los tratamientos disponibles

7. LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES DEL ESTUDIO

- Poca información en la literatura sobre estudios relacionados con las proteínas de MTB y su funcionalidad; fue posible identificar gran cantidad de proteínas codificadas en los

aislamientos analizados, sin embargo, al momento de realizar búsqueda sobre su función biológica o sobre los efectos derivados de mutaciones, como extensiones, truncaciones o pérdidas de codones de inicio, no se encontraron referencias o estudios previos que permitieran interpretar su posible efecto en la bacteria.

- Se recomienda llevar a cabo estudios más detallados mediante análisis experimentales *in vitro* e *in vivo*, con el fin de conocer y validar el impacto que podrían tener mutaciones o variaciones genéticas y su posible relación con la resistencia antimicrobiana o la adaptación bacteriana de MTB.
- Es viable realizar estudios funcionales y estructurales enfocados en las proteínas PE, PPE, PKS, PGL y las demás proteínas estudiadas en este trabajo, con el fin de ampliar el conocimiento sobre su participación en los mecanismos de resistencia y virulencia de MTB. El uso de enfoques experimentales permitiría validar los hallazgos *in silico* y así fortalecer la interpretación biológica de las mutaciones identificadas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization: WHO. Tuberculosis [Internet]. Who.int. World Health Organization: WHO; 2019. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2024 [Internet]. Who.int. 2024. Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>
3. Coordinador H, Sepúlveda M, Subdirector C, Yaneth R, Acevedo, Ruge D. Informe de Evento 2024 Tuberculosis INSTITUTO NACIONAL DE SALUD Elaborado por: Revisado por: Aprobado por [Internet]. 2024. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/TUBERCULOSIS%20INFORME%20DE%20EVENTO%202024.pdf>
4. Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. FEMS Microbiology Reviews

- [Internet]. 2017 Mar 25;41(3):354–73. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsre/article/41/3/354/3089982>
5. Chin KL, Anibarro L, Chang ZY, Praneetha Palasuberniam, Mustapha ZA, Sarmiento ME, et al. Impacts of MDR/XDR-TB on the global tuberculosis epidemic: Challenges and opportunities. *Current Research in Microbial Sciences*. 2024 Oct 1;7:100295–5.
 6. Victoria MLM, Victoria MLM. Genes y determinantes de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* que contribuyen a la evasión de la respuesta inmune. *Vaccimonitor* [Internet]. 2020 [cited 2025 Nov 17];29(2):82–92. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2020000200082
 7. Zaw MT, Emran NA, Lin Z. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of *rpoB* gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of infection and public health* [Internet]. 2018;11(5):605–10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29706316>
 8. Ioerger TR, Feng Y, Ganesula K, Chen X, Dobos KM, Fortune S, et al. Variation among Genome Sequences of H37Rv Strains of *Mycobacterium tuberculosis* from Multiple Laboratories. *Journal of Bacteriology*. 2010 Jul 15;192(14):3645–53.
 9. JIANG Y, WEI J, LIU H, LI G, GUO Q, QIU Y, et al. Polymorphisms in the PE35 and PPE68 antigens in *Mycobacterium tuberculosis* strains may affect strain virulence and reflect ongoing immune evasion. *Molecular Medicine Reports*. 2015 Nov 19;13(1):947–54.
 10. Bohada-Lizarazo DP, Bravo-Sanabria KD, Cárdenas-Malpica P, Raúl Rodríguez. Comparative Genomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Circulating in North Santander, Colombia. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2024 Aug 28;9(9):197–7.
 11. Nikolayevskyy V, Kranzer K, Niemann S, Drobniewski F. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of recent transmission and tracing outbreaks: A systematic review. *Tuberculosis*. 2016 May;98:77–85.
 12. Niemann S, Supply P. Diversity and Evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: Moving to Whole-Genome-Based Approaches. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014 Sep 4;4(12):a021188–8.
 13. Leong KWC, Gautam SS, Pradhan M, Singh YI, KC R, Rajbhandari SK, et al. Comparative genomic analyses of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Nepal and other geographical locations. *Genomics*. 2022 Mar;114(2):110278.

14. Dorronsoro I, Torroba L. Microbiología de la tuberculosis. Anales del Sistema Sanitario de Navarra [Internet]. 2007;30. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v30s2/original5.pdf>
15. Lusayda SC. Bot Detection [Internet]. Udes.edu.co. 2025 [cited 2025 Nov 17]. Disponible en: <https://repositorio.udes.edu.co/server/api/core/bitstreams/564d855a-c19a-421d-8184-d59547a3032c/content>
16. Technical Data. Please refer disclaimer Overleaf. M198 [Internet]. [cited 2025 Nov 17]. Disponible en: <https://www.himedialabs.com/media/TD/M198.pdf>
17. Delogu G, Sali M, Fadda G. The Biology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases [Internet]. 2013 Nov 15;5(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3867229/>
18. Anaximandro Gómez-Velasco, Molina-Torres CA, Vera-Cabrera L, Alíed Bencomo-Alem, Muñoz-Jiménez SG, Héctor Javier Sánchez-Pérez, et al. Diversidad genética del Complejo de *Mycobacterium tuberculosis*: implicaciones clínicas y epidemiológicas. Tip revista especializada en ciencias químico-biológicas. 2023 Jun 29;26.
19. Cubillos-Ruiz A, Juan Carlos Morales, Zambrano M. Analysis of the genetic variation in *Mycobacterium tuberculosis* strains by multiple genome alignments. BMC Research Notes. 2008 Nov 7;1(1):110–0.
20. Roychowdhury T, Mandal S, Bhattacharya A. Analysis of IS6110 insertion sites provide a glimpse into genome evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Scientific Reports. 2015 Jul 28;5(1).
21. Comín J, Otal I, Samper S. In-depth Analysis of IS6110 Genomic Variability in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Frontiers in Microbiology. 2022 Feb 24;13.
22. Artículo De Revisión, Molecular B, Dilia Fontalvo Rivera, Doris Gómez Camargo. médicas uis revista de los estudiantes de medicina de la universidad industrial de santander Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar [Internet]. 2015. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/muis/v28n1/v28n1a04.pdf>
23. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature [Internet]. 1998 Jun;393(6685):537–44. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/31159>
24. Oudghiri A, Chaoui I, Elmzibri M. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: A Review of Tools

- and Applications [Internet]. Omicsonline.org. 2025 [cited 2025 Nov 17]. Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/molecular-epidemiology-of-tuberculosis-a-review-of-tools-and-applications-2332-0877-1000386.pdf>
25. Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, et al. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *The Lancet Infectious Diseases* [Internet]. 2013 Feb [cited 2019 Jul 29];13(2):137–46. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3556524/>
 26. Coll F, McNerney R, José Afonso Guerra-Assunção, Glynn JR, João Perdigão, Viveiros M, et al. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis complex* strains. *Nature Communications*. 2014 Sep 1;5(1).
 27. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Seminars in Immunology*. 2014 Dec;26(6):431–44.
 28. Guyeux C, Senelle G, Meur AL, Supply P, Gaudin C, Phelan JE, et al. Early Release - Newly Identified *Mycobacterium africanum* Lineage 10, Central Africa - Volume 30, Number 3—March 2024 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC. wwwncdc.gov [Internet]. 2024 May;30. Disponible en: https://wwwncdc.gov/eid/article/30/3/23-1466_article
 29. Rodríguez-Castillo JG, Llerena C, Argoty-Chamorro L, Guerra J, Couvin D, Rastogi N, et al. Population structure of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Colombia. *Tuberculosis*. 2020 Dec;125:102011.
 30. Hurtado-Páez U, Álvarez Zuluaga N, Arango Isaza RE, Contreras-Moreira B, Rouzaud F, Robledo J. Pan-genome association study of *Mycobacterium tuberculosis* lineage-4 revealed specific genes related to the high and low prevalence of the disease in patients from the North-Eastern area of Medellín, Colombia. *Frontiers in microbiology* [Internet]. 2023 Apr;13:1076797. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36687645/>
 31. Cabezas Vinuesa L, Jiménez Arias P. Distribution of *Mycobacterium tuberculosis* lineages in South America. *Anatomía Digital*. 2021 Jul 5;4(3):34–58.
 32. Ferro B. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Southwestern Colombia. *Emerging Infectious Diseases*. 2011 Jul;17(7):1259–62.
 33. García DF, Astudillo M. Genotipificación de aislamientos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante MIRU-VNTR, Cali, Colombia, 2013-2015. *Biomédica*. 2019 May 1;39:71–85.

34. Puerto G, Erazo L, Wintaco M, Castro C, Ribón W, Guerrero MI. *Mycobacterium tuberculosis* Genotypes Determined by Spoligotyping to Be Circulating in Colombia between 1999 and 2012 and Their Possible Associations with Transmission and Susceptibility to First-Line Drugs. Cloeckaert A, editor. PLOS ONE. 2015 Jun 11;10(6):e0124308.
35. Pérez-Llanos FJ, Dreyer V, Barilar I, Utpatel C, Kohl TA, Murcia MI, et al. Transmission Dynamics of a *Mycobacterium tuberculosis* Complex Outbreak in an Indigenous Population in the Colombian Amazon Region. Microbiology Spectrum [Internet]. 2023 Jun 15;11(3):e0501322. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37222610/>
36. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. TUBERCULOSIS BOLETIN EPIDEMIOLÓGICO SEMANA 12 [Internet]. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD; 2025. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2025_Boletin_epidemiologico_semana_12.pdf
37. Amin M, Afrazeh E, Seyyedeh Fatemeh Seyyedean-Nikjeh, Meskini M, Delaram Doroud, Seyed Davar Siadat. New insight in molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*. AMB express. 2024 Jun 21;14(1).
38. Social P. REPUBLICA DE COLOMBIA [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-227-de-2020.pdf>
39. Alejandra M, María A, Andrea C, Serrano G, Yaliana Tafur Cardona. Tuberculosis, Métodos Diagnósticos y su Validez. Revista Navarra Médica. 2018 Jan 5;3(2):15–23.
40. V Jarlier. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiology Letters. 1994 Oct 15;123(1-2):11–8.
41. Universidad de Buenos Aires. Bacterias que no toman la coloración de Gram -PARTE I *Mycobacterium* [Internet]. Disponible en: <https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/2020-07/T6A%20Texto%20Clase%206-Mycobacterium-Sordelli%202020.pdf>
42. Heym B, Honoré N, Schurra C, Cole ST, Heym B, Truffot-Pernot C, et al. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. The Lancet. 1994 Jul;344(8918):293–8.
43. González-Martin J. Microbiología de la tuberculosis. Seminarios de la Fundación Española de Reumatología. 2014 Jan;15(1):25–33.
44. Poulton NC, Rock JM. Unraveling the mechanisms of intrinsic drug resistance in *Mycobacterium*

- tuberculosis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2022 Oct 17 [cited 2023 May 8];12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9618640/>
45. Nguyen L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Archives of Toxicology*. 2016 May 9;90(7):1585–604.
 46. Ramón-Luing LA, Palacios Y, Ruiz A, Téllez-Navarrete NA, Chavez-Galan L. Virulence Factors of *Mycobacterium tuberculosis* as Modulators of Cell Death Mechanisms. *Pathogens* [Internet]. 2023 Jun 1;12(6):839. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-0817/12/6/839>
 47. Rahlwes Kathryn C, Dias Beatriz RS, Campos Priscila C, Alvarez-Arguedas S, Shiloh Michael U. Pathogenicity and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence*. 2022 Nov 23;14(1).
 48. National Human Genome Research Institute. Comparative Genomics Fact Sheet [Internet]. Genome.gov. 2019 [cited 2025 Nov 17]. Disponible en: https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Comparative-Genomics-Fact-Sheet?utm_source
 49. Oppong A, Phelan J, João Perdigão, Machado D, Miranda A, Portugal I, et al. Genome-wide analysis of *Mycobacterium tuberculosis* polymorphisms reveals lineage-specific associations with drug resistance. *BMC Genomics*. 2019 Mar 29;20(1).
 50. Gonzalo-Asensio J, Mostowy S, Harders-Westerveen J, Huygen K, Hernández-Pando R, Thole J, et al. PhoP: A Missing Piece in the Intricate Puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* Virulence. Ahmed N, editor. *PLoS ONE*. 2008 Oct 23;3(10):e3496.
 51. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a Novel Method for Rapid Multiple Sequence Alignment Based on Fast Fourier Transform. *Nucleic Acids Research*. 2002 Jul 15;30(14):3059–66.
 52. Geneious. LASTZ - Geneious [Internet]. Geneious.com. 2020 [cited 2025 Nov 17]. Disponible en: <https://www.geneious.com/plugins/lastz>
 53. Zhang Z, Dong L, Li X, Deng T, Wang Q. The PE/PPE family proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: evolution, function, and prospects for tuberculosis control. *Frontiers in Immunology*. 2025 Jun 17;16.
 54. Hall MB, Lima L, Coin LJM, Iqbal Z. Drug resistance prediction for *Mycobacterium tuberculosis* with reference graphs. *Microb Genom* [Internet]. 2023;9(8). Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/mgen/9/8/mgen001081.pdf?expires=1763685066&id=id&accname=guest&checksum=B8372AFF79B115A5E660BD665B1C9FDD>
 55. Luthra A, Gaur A, Ramachandran R. Rv3868 (EccA1), an essential component of the

- Mycobacterium tuberculosis* ESX-1 secretion system, is thermostable. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* [Internet]. 2013 Feb 12;1834(6):1181–6. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1570963913000678>
56. Mikkil Illemann Johansen, Maiken Engelbrecht Petersen, Faddy E, Anders Marthinsen Seefeldt, Alexander Alexandrovich Mitkin, Lars Østergaard, et al. Efficacy of rifampicin combination therapy against MRSA prosthetic vascular graft infections in a rat model. *Biofilm*. 2024 Feb 1;100189–9.
57. Shukla S, Bhardwaj N, Singh A. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: An evolutionary perspective and its adaptation to the lung microenvironment. *The Microbe* [Internet]. 2024 Oct 10;5:100189. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2950194624001560>
58. Luthra A, Mahmood A, Arora A, Ramachandran R. Characterization of Rv3868, an essential hypothetical protein of the ESX-1 secretion system in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 2008;283(52):36532–41. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18974091/>
59. Domenech P, Reed MB, Barry CE. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis MmpL* Protein Family to Virulence and Drug Resistance. *Infection and Immunity*. 2005 Jun;73(6):3492–501.
60. UNIPROT. UniProt [Internet]. UniProt. 2025 [cited 2025 Nov 17]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q79FU2/entry>
61. Chen T, Zhao Q, Li W, Xie J. *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS17 Promotes the Death of Host Cell and Cytokines Secretion via *Erk* Kinase Accompanying with Enhanced Survival of Recombinant *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2013 Aug;33(8):452–8.
62. Davies-Bolorunduro OF, Jaemsai B, Ruangchai W, Noppanamas T, Boonbangyang M, Bodharamik T, et al. Analysis of complete genomes of *Mycobacterium tuberculosis* sublineage 2.1 (Proto-Beijing) revealed the presence of three pe_pgrs3-pe_pgrs4-like genes. *Scientific Reports* [Internet]. 2024 Dec 28 [cited 2025 Jan 8];14(1). Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-79351-w>
63. Qian W, Ma N, Zeng X, Shi M, Wang M, Yang Z, et al. Identification of novel single nucleotide variants in the drug resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by whole-

- genome analysis. *BMC Genomics*. 2024 May 14;25(1).
64. De Maio F, Berisio R, Manganeli R, Delogu G. PE_PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: A specialized molecular task force at the forefront of host–pathogen interaction. *Virulence*. 2020 Jan 1;11(1):898–915.
 65. Suo J, Wang X, Zhao R, Ma P, Ge L, Luo T. *Mycobacterium tuberculosis* PPE7 Enhances Intracellular Survival of *Mycobacterium smegmatis* and Manipulates Host Cell Cytokine Secretion Through Nuclear Factor Kappa B and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2022 Oct 1;42(10):525–35.
 66. Pérez E, Constant P, Lemassu A, Laval F, Daffé M, Guilhot C. Characterization of Three Glycosyltransferases Involved in the Biosynthesis of the Phenolic Glycolipid Antigens from the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Oct;279(41):42574–83.
 67. Ruaro-Moreno M, Monterrubio-López GP, Reyes-Gastellou A, Castelán-Vega JA, Jiménez-Alberto A, Aparicio-Ozores G, et al. Design of a Multi-Epitope Vaccine against Tuberculosis from *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS49 and PE_PGRS56 Proteins by Reverse Vaccinology. *Microorganisms* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2023 Dec 5];11(7):1647. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/7/1647#:~:text=Reverse%20vaccinology%20approaches%20use%20computational>
 68. Tiwari BM, Kannan N, Vemu L, Raghunand TR. The *Mycobacterium tuberculosis* PE Proteins Rv0285 and Rv1386 Modulate Innate Immunity and Mediate Bacillary Survival in Macrophages. Briken V, editor. *PLoS ONE*. 2012 Dec 17;7(12):e51686.
 69. Katherine P, Yuk-Ching Tse-Dinh. Rv1495 toxin as a model for inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* DNA topoisomerase I. *The FASEB Journal*. 2018 Apr 1;32(S1).
 70. Ahn DH, Lee KY, Sang Yup Lee, Sung Sup Park, Hye Eun Yoon, Kim SJ, et al. Structural analyses of the MazEF4 toxin-antitoxin pair in *Mycobacterium tuberculosis* provide evidence for a unique extracellular death factor. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2017 Nov 1;292(46):18832–47.
 71. Quadri LEN. Biosynthesis of mycobacterial lipids by polyketide synthases and beyond. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2014 Mar 14;49(3):179–211.
 72. STRING. PKS4 [Internet]. STRING. Disponible en: <https://string-db.org/network/83332.Rv1181>
 73. Tiwari B, Amarendranath Soory, Raghunand TR. An immunomodulatory role for the

- Mycobacterium tuberculosis* region of difference 1 locus proteins PE35 (Rv3872) and PPE68 (Rv3873). FEBS Journal. 2014 Jan 28;281(6):1556–70.
74. D’Orazi G, Rinaldo C, Soddu S. Updates on HIPK2: a resourceful oncosuppressor for clearing cancer. BMC. 2012 Aug 13;31(1).
75. Qian J, Chen R, Wang H, Zhang X. Role of the PE/PPE Family in Host–Pathogen Interactions and Prospects for Anti-Tuberculosis Vaccine and Diagnostic Tool Design. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2020 Nov 26;10.
76. Leung KSS, Siu GKH, Tam KKG, To SWC, Rajwani R, Ho PL, et al. Comparative Genomic Analysis of Two Clonally Related Multidrug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Single Molecule Real Time Sequencing. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2017 Nov 15;7.
77. Zhang J, Angala SK, Pramanik PK, Li K, Crick DC, Liav A, et al. Reconstitution of Functional Mycobacterial Arabinosyltransferase AftC Proteoliposome and Assessment of Decaprenylphosphorylarabinose Analogues as Arabinofuranosyl Donors. ACS Chemical Biology. 2011 May 26;6(8):819–28.
78. Hu Y, Ding Y, Cai B, Qin X, Wu J, Yuan M, et al. Bacterial effectors manipulate plant abscisic acid signaling for creation of an aqueous apoplast. Cell Host & Microbe. 2022 Apr;30(4):518-529.e6.
79. Mycobrowser [Internet]. Epfl.ch. 2019 [cited 2025 Nov 17]. Disponible en: <https://mycobrowser.epfl.ch/genes/Rv0930>

9. ANEXOS

Anexo 1: Análisis de genómica comparativa N.24