

Análisis *in silico* de algunas mutaciones presentes en el gen *pncA* de *Mycobacterium tuberculosis*

In silico analysis of some mutation targeting *pncA* gene of *Mycobacterium tuberculosis*

K. Y. Barrientos-Adrian^{1*}, J. Flores Gracia¹, C. Molina-Torres²,
C. Venegas-Barrera¹, G. Guevara-Guerrero¹, A. Rendón-Pérez³

¹Tecnológico Nacional de México Instituto Tecnológico de Cd. Victoria División de Estudios de Posgrado e Investigación. Boulevard Emilio Portes Gil No. 1301, C. P. 87010, Ciudad Victoria, Tamaulipas. *Correo electrónico: k.barrientos@hotmail.es

²Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, Hospital Universitario José E. González, Monterrey, Nuevo León, México.

³Centro de Investigación, Prevención y Tratamiento de Infecciones Respiratorias (CIPTIR). Hospital Universitario de Monterrey, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Monterrey, México.

*Autor de correspondencia

Resumen

La pirazinamida es un profármaco utilizado en infecciones contra *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia se debe principalmente a mutaciones en el gen *pncA*. En este estudio se realizó la detección de mutaciones puntuales de este gen, en aislamientos clínicos del estado de Nuevo León. Se elaboraron modelos tridimensionales de la enzima pirazinamidasa por secuenciación y mediante el uso de herramientas computacionales. Se observó la presencia de mutaciones importantes en ocho muestras, en dos de ellas se presentaron codones de terminación. Las predicciones realizadas mostraron que las mutaciones Q10P Y W68S afectan estructuralmente al sitio activo. Las mutaciones P62L y D63A se presentan en un sitio importante; sin embargo, la enzima permanece estable. Por el contrario, cuando se analiza la mutación S179R se encuentra que la función enzimática es altamente inestable.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*; resistencia; pirazinamida.

Abstract

Pyrazinamide is a prodrug used in infections against *Mycobacterium tuberculosis* and its resistance is mainly due to mutations in the *pncA* gene. In this study, the detection of point mutations of this gene was performed in clinical isolates from the State of Nuevo León. Three-dimensional models of the pyrazinamidase enzyme were made by sequencing and using computational tools. The presence of important mutations in eight samples was observed, and in two of them termination codons are shown. The analyzes performed showed that the Q10P and W68S mutations structurally affected the active site. The P62L and D63A mutations occur in an important site; however, the enzyme remains stable. On the contrary, when the S179R mutation is analyzed, the enzymatic function is found to be highly unstable.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; resistance; pyrazinamide.

Recibido: 24 de enero de 2020

Aceptado: 4 de mayo de 2020

Publicado: 20 de mayo de 2020

Como citar: Barrientos-Adrian, K. Y., Flores Gracia, J., Amelia-Molina, C., Venegas-Barrera, C., Guevara-Guerrero, G., & Rendón, A. (2020). Análisis *in silico* de algunas mutaciones presentes en el gen *pncA* de *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Universitaria* 30, e2816. doi: <http://doi.org/10.15174/au.2020.2816>

Introducción

La pirazinamida (PZA) es un importante antituberculoso, eficaz contra bacilos semilantes que no son eliminados por ningún otro medicamento (Cuevas-Córdoba & Zenteno-Cuevas, 2010). Esta característica la coloca como uno de los pilares en el tratamiento contra la tuberculosis, junto con la isoniazida y la rifampicina. Este medicamento ha permitido acortar el tiempo de duración de la terapia antituberculosa de nueve a seis meses, contra cepas sensibles y multidrogo resistentes (MDR-TB) (Aggarwal *et al.*, 2018; Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades [Cenaprece], 2016). La PZA difiere de muchos de los medicamentos en su mecanismo de acción, debido a que es capaz de actuar en múltiples blancos, como la producción de energía, probablemente en la síntesis de pantotenato y coenzima A y en el proceso de trans-traducción (Zhang, Shi, Zhang & Mitchison, 2014). Lo anterior forma parte de un proceso vital en condiciones de estrés para la bacteria que reutiliza ribosomas estancados durante la traducción y marca proteínas incompletas para su degradación (Personne & Parish, 2014).

La resistencia a PZA se da por mutaciones en los genes *RpsA*, involucrado en el proceso de trans-traducción, y el gen *panD* que participa en la síntesis de β -alanina, precursor de la biosíntesis de pantotenato y coenzima A; sin embargo, las mutaciones más importantes se presentan en el gen *pncA* (Cuevas-Córdoba *et al.*, 2013), que codifica a la enzima pirazinamidasa (PZase)/nicotinamidasa (Louw *et al.*, 2006), encargada de convertir a esta prodroga en su forma activa (Zhang *et al.*, 2014).

La PZA atraviesa la membrana celular del bacilo de la tuberculosis por difusión pasiva y en el interior la PZase lo transforma en ácido pirazinoico (POA) (Juréen, Werngren, Toro & Hoffner, 2008). El ácido pirazinoico se bombea hacia el exterior de la bacteria y bajo condiciones ácidas (pH 5,5), el POA se protona a $H^+ + POA$ y vuelve a entrar en la bacteria, donde libera el H^+ , y el ácido pirazinoico se bombea de nuevo al exterior. Este proceso cíclico conllevará a un aumento en la acidez citoplasmática, lo que hará que enzimas vitales puedan ser inhibidas y contribuya a la muerte celular (Scheen *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2014).

Las mutaciones en el gen *pncA* pueden generar la pérdida de la actividad en la enzima pirazinamidasa. La enzima pirazinamidasa está conformada por una cadena de 185 aminoácidos, la cual tiene seis hojas β paralelas con hélices α en ambos lados, que en conjunto forman un dominio α/β (Petrella *et al.*, 2011).

El sitio de unión al sustrato en el gen *pncA* de *M. tuberculosis* tiene una tríada catalítica constituida por los residuos Asp8 en la terminación de la cadena β -1, Lys96 en la terminación de la cadena β 3 y Cys138 en el extremo N-terminal de α -hélice 3. Al frente de la cavidad donde se une el sustrato se encuentra el sitio de unión de iones metálicos, en donde se presenta el ion Fe^{2+} . Los residuos importantes que mantienen al ion son Asp49, His51, His57 e His71, formando un sitio para la unión de PZA (Petrella *et al.*, 2011).

Lo antes mencionado demuestra que, para poder obtener una mayor comprensión del origen de la resistencia a los medicamentos, es necesario realizar un análisis de la estructura tridimensional de la enzima codificada por el gen mutado (Petrella *et al.*, 2011).

En este estudio se analizaron muestras que presentaban reporte de resistencia y algunas que carecían de ella, con la finalidad de obtener modelos tridimensionales de ambos tipos de muestras. La obtención de estos datos permitió obtener una comparación estructural de las proteínas nativas y la observación de los cambios que ocurren en la estructura a causa de mutaciones en el gen *pncA*. El principal objetivo de este trabajo fue detectar las mutaciones puntuales presentes en el gen *pncA* en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* con reporte de resistencia a PZA y mediante análisis *in silico* para poder visualizar y esquematizar los cambios que dan origen a la resistencia a nivel molecular.

Materiales y métodos

Muestras Clínicas

Las cepas analizadas se aislaron de pacientes con tuberculosis pulmonar, asiladas en el Centro de Investigación, Prevención y Tratamiento de Infecciones Respiratorias del Hospital Universitario José E. González de Monterrey, Nuevo León, México. Las cepas fueron recuperadas entre los años 1998 al 2015, procedentes de 10 jurisdicciones sanitarias del estado de Nuevo León. En total se analizaron 29 muestras de las cuales solo cuatro presentaban resistencia a pirazinamida. Las 25 muestras restantes tenían resistencia a otros fármacos de primera línea. La razón de esta última inclusión fue porque en la literatura se encuentran reportes de probable resistencia a pirazinamida si ya existe resistencia a isoniazida y rifampicina, es decir, multidrogoresistencia (MDR-TB) (Alame-Emane *et al.*, 2015). La sensibilidad de los fármacos de primera línea se determinó por el método de las proporciones múltiples (*Clinical and Laboratory Standards Institute* [CLSI], 2011). Las muestras fueron sembradas en medio Lowenstein Jensen, incubándose a 37 °C por dos a tres semanas.

Extracción del Ácido desoxirribonucleico (ADN)

La extracción de ADN de los aislamientos de *M. tuberculosis* se realizó utilizando la técnica de CTAB-NaCl (Murray & Thompson, 1980) o el kit comercial QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN (Germantown, MD).

Amplificación Mediante PCR Del Gene *pncA*

La amplificación del gen *pncA* se realizó con los iniciadores propuestos por Sekiguchi *et al.* (2007), 5´ - (GGCGTCATGGACCCTATAC)-3´ 5´ - (CAACAGTTCATCCCGGTTC)-3´. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25µl para obtener un fragmento de 670 pb que incluye el promotor de este gen.

La reacción de la PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: Buffer de PCR 1X (Promega, Madison, WI), MgCl₂ 1.5 mM, primers gen *pncA* 500 µM, dNTPs 200 µM, Taq pol. (Promega, Madison, WI) 1.25U, ADN 20 ng en un volumen de reacción de 25 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 94 °C por 10 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56.2 °C por un minuto, 72 °C por un minuto y una extensión final de 72 °C por 10 minutos.

Los productos amplificados fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 110 V por 60 minutos y visualizados con luz ultravioleta.

Secuenciación del gen *pncA*

Los productos obtenidos después de la PCR fueron purificados con el kit comercial ExoSAP-IT™ de *Invitrogen* (*Life Technologies*, Burlington, ONT CANADA) y fueron usados como moldes para la secuenciación del ADN. Las muestras purificadas fueron analizadas en el laboratorio de biología molecular del taller de plantas, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), una vez obtenidas las secuencias de ADN fueron editadas en el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.2.6.0 (Hall, 1999), utilizando la secuencia de *pncA* de tipo salvaje (NC_000962.3) como base para la detección de alguna variación; además se utilizó la plataforma en línea Mubii-TB-DB (<https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/mubii/mubii-select.cgi>) para la identificación de las mutaciones, deleciones e inserciones que han sido reportadas.

Modelado molecular de la enzima PZA-*pncA*

Las secuencias de aminoácidos obtenidas y analizadas se modelaron con el programa en línea SWISS-MODEL Workspace/GMQE. La plataforma contiene una colección actual de modelos de proteínas en 3D generados a partir de homología disponibles en el UniProtKB, que es un centro de recopilación de información sobre proteínas. Una vez obtenidos los modelos 3D, se analizaron con el programa EduPyMOL versión 1.7.4.5-wing64, para hacer la comparación estructural y poder visualizar las interacciones que se están llevando a cabo. El análisis nos permitió lograr una mejor comparación entre la estructura tridimensional de tipo salvaje y las estructuras de las muestras a analizar.

Evaluación del modelo

La calidad de los modelos fue evaluada para confirmar que las características estructurales del modelo son coherentes. La calidad química y física fue probada con el servidor Verify3D (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D/>) y RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>); ambos detectan los errores haciendo uso de perfiles estadísticos, interacción de energía y características espaciales (Saddala & Adi, 2018).

Evaluación de las Mutaciones

Con la finalidad de realizar una predicción de la estabilidad de la proteína para cada mutación puntual del gen *pncA*, se analizaron las mutaciones encontradas con el programa CUPSAT (<http://cupsat.tu-bs.de/>). El programa predice y detecta los cambios en la energía libre ($\Delta\Delta G$) que suceden cuando ocurren mutaciones durante el proceso de plegamiento-desplegamiento de las proteínas. El valor positivo de $\Delta\Delta G$ indica que la mutación se estabiliza termodinámicamente; por el contrario, los valores negativos indican una desestabilización. La magnitud $\Delta\Delta G$ será un indicativo para conocer el alcance de la mutación (Yoon, Nam, Kim & Ro, 2014).

Análisis estadístico

Para poder comprobar si existe una relación entre la presencia de resistencia a pirazinamida, si ya existe a isoniazida y rifampicina (Alame-Emane *et al.*, 2015), se realizó un análisis de correspondencia simple (ACO), que es una técnica multivariada descriptiva y exploratoria que analiza tablas de contingencia. El análisis se realizó utilizando el programa STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., 2007), tomando en cuenta solo las muestras que presentaban resistencia a isoniazida y rifampicina (23 muestras), caso particular para este análisis.

Resultados

Secuenciación de los productos amplificados

La secuenciación de los amplicones obtenidos para 29 muestras arrojó la presencia de mutaciones importantes para ocho muestras. En cuatro de ellas (230, 470, 441, 572) se presentaba resistencia fenotípica a PZA, pero solo en las muestras 230 y 470 se detectaron mutaciones correspondientes en el marco de lectura analizado. En el resto de las muestras analizadas que no presentaban reporte de resistencia fenotípica a PZA (seis muestras) también se observó la presencia de mutaciones importantes. En la tabla 1 se presentan los resultados de la secuenciación, así como el reporte de resistencia fenotípica.

Tabla 1. Análisis de la secuenciación del gen *pncA*.

Secuencia ID	Resistencia Fenotípica	Cambio de nucleótido en el gen <i>pncA</i>	Cambio de aminoácido
41	S,H,R	- A 29 C	Q 10 P
470	R,P	Inserción +140C	Codón de paro 47 UGA
514	H,E,R	Inserción +145A	Codón de paro 56 UGA
654	S,H,E,R	C 185 T	P62L
J842	H,E,R	A 188 C	D 63 A
230	S,H,R,P	C 203 G	W 68 S
F363	H,E,R	T 452 C	L 151 S
35	E	A 535C	S 179 R

*S = Estreptomina; H = Isoniazida; E = Etambutol; R = Rifampicina; P = Pirazinamida.

Fuente: Elaboración propia.

El análisis de las secuencias mostró inserciones en dos de las muestras; en una de las muestras una "A" en la posición 145 y en la otra una "C" en la posición 140. Lo anterior generó un corrimiento en el marco de lectura, que conllevó a un codón de terminación para los dos casos.

Modelamiento Molecular de la Enzima PZA-*pncA*

Los alineamientos realizados en este trabajo mostraron un alto porcentaje de similitud con el modelo de *M. tuberculosis* presente en la base de datos y con código de acceso 3pl1.1.A (Petrella *et al.*, 2011). Esto nos permitió realizar los alineamientos estructurales para cada una de las muestras que presentaron mutaciones importantes. En la figura 1 se observa una representación de la estructura tridimensional proteica de *MtpncA* para la muestra H37rv.

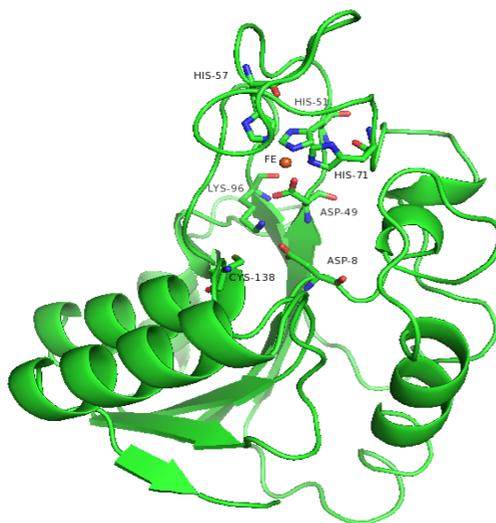


Figura 1. Representación de la estructura tridimensional proteica de *MtpncA* para la muestra H37rv. Se representan los residuos importantes para la catálisis (Asp 8, Lys 96 y Cys 138) y los residuos involucrados con la unión del cofactor enzimático (Asp 48, His 57 y His 71); el ion de hierro se representa con una cruz roja.

Fuente: Elaboración propia.

Una mutación interesante se presentó cercana a una de las regiones "calientes" (Tracevska, Jansone & Baumanis, 2004) en el codón 10. Con base en el análisis de esta mutación, se pudo observar que se presentó un cambio en la estructura, debido a la sustitución de glutamina por prolina (Nelson & Cox., 2000), dado que se ve afectado el aminoácido valina 9 y ácido aspártico 8, ubicados en el sitio activo de la enzima. Al observar el modelo de la estructura 3D se puede observar que existe una variación en la cadena con respecto a la H37Rv, principalmente en el aminoácido ácido aspártico 8, originada por el cambio de glutamina (figura 2A).

La mutación P62L está presente en un giro donde se encuentra un sitio importante para la unión del cofactor enzimático, el efecto de esta mutación comienza en la histidina 57, observándose un ligero desplazamiento en el enlace peptídico. En ácido aspártico 63, serina 65 y serina 66 se observó que no se presentaba ningún cambio estructural; sin embargo, en el aminoácido serina 67, triptófano 68 y prolina 70 se observó un evidente desplazamiento (figura 2B).

En la muestra F363 se presentó una mutación correspondiente a ácido aspártico 63 por alanina, que se encuentra en un sitio importante como ya fue mencionado. Al observar el modelo tridimensional, el efecto se puede ver plasmado en los aminoácidos serina 65, serina 66 y serina 67. En serina 65 aparece un desplazamiento en la posición del oxígeno perteneciente al grupo carboxilo que está formando parte del enlace peptídico con serina 66. El efecto se puede observar en el OH perteneciente al grupo radical R, mientras que en serina 67 se observa una modificación en ambos sitios (figura 2C).

La mutación en el codón 68, triptófano por serina, se encuentra en una posición importante y es altamente conservada (Aggarwal *et al.*, 2017). En el análisis del modelo tridimensional se observa que solo se modifica serina 67.

En la mutación L151S se presentó un codón después de la terminación de una alfa hélice y dos codones antes del comienzo de una lámina beta (Aggarwal *et al.*, 2017). En la observación del modelo tridimensional no se detectó un cambio aparente (figura 2D).

Entre la alfa hélice 4 y la lámina beta 6 se presentó la mutación en el codón 179, que corresponde al cambio de serina por arginina (Aggarwal *et al.*, 2017). Al analizar la mutación en el programa EduPyMOL, se observa que el efecto se da en valina un codón atrás de ella, permitiendo que se pegue una cadena (Berg, Tymoczko & Stryer, 2008) (figura 2E).

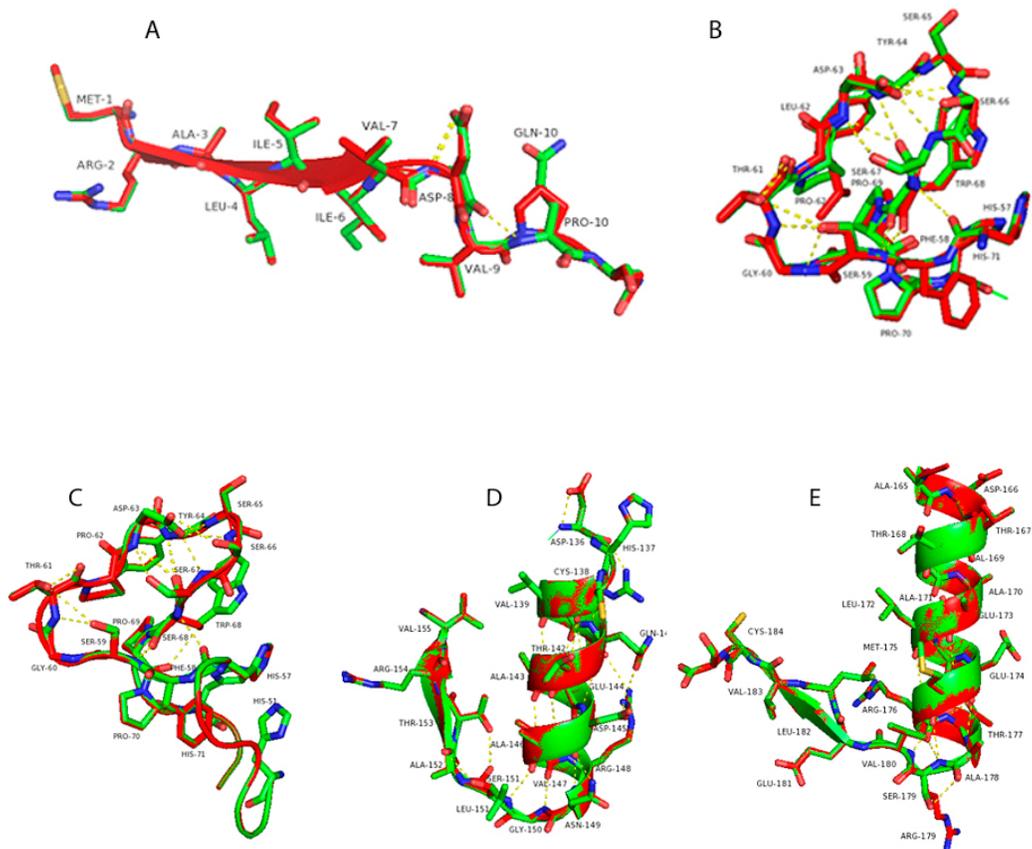


Figura 2. Superposición de las regiones mutadas en *MtpncA* H37rv en color verde y cada una de las mutaciones para cada una de las muestras en rojo. La ejemplificación de la proteína muestra el aminoácido de interés en una representación donde muestra sus cadenas laterales y las atracciones con líneas intermitentes amarillas.

A representación de la cadena de aminoácidos de metionina 1 hasta Glutamina 10, presente en la muestra 41.

B cambio de Prolina por Leucina en la muestra 654.

C ejemplificación de la mutación de ácido Aspártico por Alanina en la muestra F363.

D representación de la mutación Leucina por Serina J842.

E representación de la mutación Serina por Arginina en la muestra 35.

Fuente: Elaboración propia.

Evaluación del Modelo

La evaluación estructural de los modelos 3D con el programa Verify3D mostró los aminoácidos con una puntuación superior a 0.2, lo cual es considerado como consistente (Saddala & Adi, 2018). El análisis con el programa RAMPAGE muestra porcentajes de los residuos encontrados en la región favorecida (azul) del 91.8% hasta el 98.30%; en la región permitida (amarillo), muestra valores del 1.0% a 6.0% y solo en dos modelos muestra el 0.70% y 2.2% en las regiones atípicas (blanco).

Tabla 2. Evaluación de la calidad de los modelos 3D.

Mutaciones ID	Verify3D	PROCHECK		
	Porcentaje de residuos con un porcentaje promedio 3D-1D score $\geq 0.2^*$	Número de residuos en la región favorecida	Número de residuos en la región permitida	Número de residuos en la región atípica
Q10P	93.51%	98.0%	2.0%	0%
P62L	92.97%	98.0%	2.0%	0%
D63A	92.97%	97.0%	3%	0%
W68S	92.97%	98.0%	2.0%	0%
L151S	91.89%	91.8%	6.0%	2.2%
S179R	92.43%	98.30%	1.0%	0.70%

Fuente: Elaboración propia.

Evaluación de la Mutación

El análisis en el programa CUPSAT reveló que tres de las mutaciones encontradas en este trabajo se pueden clasificar como energéticamente inestables o desfavorables.

Tabla 3. Predicción de la estabilidad de las mutaciones.

Secuencia ID	^a Solvacca (%)	^b $\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Estabilidad	Descripción del del residuo mutado en la Estructura <i>pncA</i> 3D
Q10P	0.0	-8.77	DS	Desfavorable
P62L	19.66	1.11	E	Favorable
D63A	63.52	-0.11	DS	Favorable
W68S	14.51	-0.03	DS	Desfavorable
L151S	15.36	0.15	E	Favorable
S179R	96.51	-1.35	DS	Desfavorable

DS = desestabilizado; E = estable

a Accesibilidad relativa a solventes del residuo de tipo salvaje estimado del programa CUPSAT

b Predicción de la estabilidad térmica de la proteína ($\Delta\Delta G$) de la mutación

c Estabilidad del residuo mutado

Fuente: Elaboración propia.

Análisis Estadístico

Con el análisis de correspondencia simple, se encontró que la presencia de resistencia a isoniazida y rifampicina no están asociados con la presencia de mutaciones que generan resistencia en pirazinamida ($\chi^2 = 4.84804$, $gl = 2$, $p = 0.0886$).

Discusión

La resistencia de *M. tuberculosis* a pirazinamida ha sido asociada con mayor frecuencia a mutaciones en el gen *pncA*; sin embargo, se ha documentado la existencia de mutaciones en los genes *RpsA* y *panD*. En este estudio se llevó a cabo el análisis de mutaciones en el gen *pncA* para aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*, además de un detallado análisis *in silico* del modelado molecular de las mutaciones encontradas (Cuevas-Córdoba *et al.*, 2013). De las 29 muestras analizadas, cuatro tenían el reporte de resistencia a pirazinamida (230, 441, 470, 572), pero solo en dos de ellas (470 y 230) fue posible encontrar

mutaciones en la secuenciación del gen amplificado, lo que indica que probablemente en las muestras 441 y 572 la resistencia se esté llevando a cabo por mutaciones en los genes *RpsA* o *panD* (Cuevas-Córdoba *et al.*, 2013). Las muestras 514, 41, 654, j842, F363 y 35 no presentaban reporte de resistencia a PZA, pero se encontraron mutaciones en el gen *pncA*.

En las secuencias analizadas para el gen *pncA* se encontró la presencia de diversas mutaciones presentes a lo largo del gen (Aggarwal *et al.*, 2017); sin embargo, no habían sido interpretadas y modeladas como en el presente estudio. La mutación W68 analizada por Aggarwal y colaboradores en el 2017, se presenta en una región cercana al cofactor enzimático, causando efectos directos en la función de la enzima. Trabajos anteriores analizan la sustitución por arginina o glicina; en el presente estudio la sustitución fue por serina. El efecto que provoca esta mutación puede variar según el aminoácido involucrado, razón por la cual se optó por realizar su análisis (Aggarwal *et al.*, 2017; Petrella *et al.*, 2011).

Aggarwal *et al.* (2017) mencionaron que, además de ión Fe²⁺, PZA también se une a la cavidad y se ha observado que hay cierto grado de agrupamiento en tres regiones de PZase (3 a 17, 61 a 85 y 132 a 142); las mutaciones presentes en estos residuos afectan de manera importante. En el presente estudio se presentaron cuatro mutaciones dentro de estas regiones.

La mutación Q10P se encuentra en un sitio cercano a asparagina 8, que está involucrado en la catálisis (Tracevska *et al.*, 2004). En el modelo de la estructura 3D se observó que existe una variación en la cadena con respecto a H37Rv. El aminoácido ácido aspártico 8 presentaba un puente de hidrógeno con glutamina 10, como se observa en el modelo realizado por Petrella *et al.* (2011). Al presentarse la sustitución por prolina, provoca una pérdida de puentes de hidrógeno. El ácido aspártico 8 presentaba una atracción electrostática con valina 7 que también se ve afectada (Luscombe, Laskowski & Thornton, 2001; Pace, Scholtz & Grimsley, 2014). La pérdida de estas interacciones influye directamente a ácido aspártico 8, por lo que provocará un cambio en el sitio activo de la enzima (figura 2A). Al realizar el análisis de CUPSAT (tabla 3), se observa que la proteína no alcanza a estabilizarse, provocando un efecto desfavorable en la función enzimática.

La segunda mutación encontrada, P62L, se encuentra en un bucle que abarca desde los residuos His51 hasta His71; esta estructura cierra la cavidad unión al sustrato. Al realizar el modelado, se observó que el efecto de esta mutación provoca modificaciones río abajo de este codón, así como en el aminoácido histidina 57, fenil alanina 58 y en serina 59 se puede observar que se originó un puente de hidrógeno con glicina 60 (Luscombe *et al.*, 2001; Pace *et al.*, 2014).

En los aminoácidos siguientes al P62L (figura 2B) aparentan estar intactos, esto debido a que leucina y prolina tienen como características presentar cadenas laterales no polares sin carga, ambos son alifáticos (Berg *et al.*, 2008; Nelson & Cox., 2000). Esto favorece a que ácido aspártico 63 se mantenga, dado que este forma una atracción electrostática con serina 65 y serina 66, por lo que mantiene estables estos sitios. En el aminoácido serina 67 interactuaba formando un puente de hidrógeno con prolina 62 (Luscombe *et al.*, 2001; Pace *et al.*, 2014); sin embargo, se ve fuertemente afectado por la mutación, originando la pérdida de este puente de hidrógeno que desestabiliza la estructura. El aminoácido triptófano 68 también presenta una pérdida de puente de hidrógeno unido con histidina 57 (Aggarwal *et al.*, 2017; Petrella *et al.*, 2011). Aggarwal *et al.* (2017) mencionan a triptófano 68 como un aminoácido importante, dado que delinea con his137 y phe13 los sitios de unión al cofactor enzimático. En este estudio se observó afectado, sin embargo, no genera un efecto grave como lo confirma el análisis en CUPSAT (tabla 3), que menciona que la proteína se alcanza a estabilizar y la mutación no genera un efecto trascendente en la misma.

La tercera mutación analizada se presentó en el aminoácido ácido aspártico 63, que forma una atracción electrostática (puente salino) debido a que la cadena lateral de este aminoácido está

completamente ionizada y contiene un grupo carboxilo cargado negativamente (-COO-) (Berg *et al.*, 2008; Pace *et al.*, 2014) y, por tanto, provoca que se produzca esta atracción con los residuos triptófano 64, serina 65, serina 66 y serina 67. La cadena lateral del ácido aspártico 63 también se encuentra formando una interacción con la cadena lateral de serina 66. El aminoácido continuo serina 67 forma puentes de hidrógeno con el grupo amino de ácido aspártico 63 y triptófano 64. La cadena lateral de serina 67 forma un puente de hidrógeno con ácido aspártico 63 (Luscombe *et al.*, 2001; Pace *et al.*, 2014). En la mutación del codón 63 por la alanina, el ácido aspártico pierde la cadena lateral, por lo que se pierden todas las interacciones antes mencionadas (figura 2C). Con el análisis de CUPSAT (tabla 3) se pudo confirmar que la proteína pierde su estabilidad debido a esta mutación. Al encontrarse en la cavidad que cierra la unión al sustrato, la mutación afecta de manera importante impidiendo la unión y de esta manera genera la resistencia (Berg *et al.*, 2008; Nelson & Cox., 2000).

La cuarta mutación fue en el aminoácido triptófano 68, donde presentó un cambio por serina, el cual provoca un ligero desplazamiento de su grupo carboxilo en el aminoácido serina 67; el cambio de triptófano por serina provoca que se establezca un puente de hidrógeno entre la cadena lateral de serina 68 con el grupo carboxilo de prolina 69 (Luscombe *et al.*, 2001; Pace *et al.*, 2014). El análisis con CUPSAT confirma que la proteína pierde su estabilidad a causa de la mutación, datos que confirman lo reportado por Yoon *et al.* (2014) (tabla 3).

La quinta mutación analizada fue en el codón 151, en donde se encuentra el aminoácido lisina formando puentes de hidrógeno con alanina 146 y dándole estabilidad a una hélice alfa. Este aminoácido forma otro puente de hidrógeno con treonina 150. Al ocurrir la mutación por serina, provoca que el OH de la cadena lateral de este aminoácido forme otro puente de hidrógeno con alanina 152 (Luscombe *et al.*, 2001; Pace *et al.*, 2014), lo que podría provocar un cambio de posición en la lámina beta; sin embargo, en el modelo tridimensional no se observa este hecho (figura 2D). El análisis de CUPSAT (tabla 3) confirma que la proteína logra estabilizarse, por lo que el efecto de esta mutación no parece ser trascendente (Allana *et al.*, 2017).

La última mutación, S179R, en donde la serina se presenta al final de una hélice alfa y forma dos puentes de hidrógeno con arginina 175, el OH de la cadena lateral de serina 179 también formaba un puente de hidrógeno con alanina 178 (Pace *et al.*, 2014). Al ocurrir la mutación por arginina, se pierde este puente de hidrógeno, lo que podría provocar que se desestabilice este sitio; sin embargo, al estar situados casi al final de la proteína es probable que su efecto no sea tan trascendente (figura 2E) (Allana *et al.*, 2017; Louw *et al.*, 2006). Al realizar el análisis de CUPSAT se pudo observar que la proteína pierde su estabilidad a causa de esta mutación.

Además de la presencia de mutaciones por cambio de aminoácidos, también se presentó un codón de paro originado por la inserción de una "A" en el codón 48, generando el codón de terminación en la posición 56, lo cual provocaría una proteína incompleta; esta mutación no había sido reportada en la literatura con anterioridad. Las mutaciones que dan origen a un codón de un aminoácido a UGA producen la terminación prematura de la síntesis de la cadena polipeptídica. Sin embargo, si existe una segunda mutación que cambiara la base apropiada en el anticodón de un tRNA, la terminación es suprimida y puede generarse una proteína completa (Singer, 1993). De igual manera sucede con las demás mutaciones analizadas en este estudio; pueden también ser revertidas por mutaciones supresoras que lean incorrectamente el codón mutado, lo que provocaría que no hubiese cambio en la estructura primaria de la proteína. La principal limitante en este estudio es la falta de un análisis enzimático en estas muestras, lo que reforzaría los resultados obtenidos con el modelaje molecular y tridimensional de la proteína mutada.

El análisis de correspondencia simple para determinar asociación entre la presencia de resistencia de TB-MDR y su relación con resistencia a pirazinamida mostró que no existe asociación en las muestras aquí analizadas. Estos datos difieren de lo reportado por Alame-Emane *et al.* (2015), quienes, a pesar de tener un mayor número de muestras (272), no realizaron un análisis estadístico que soportara la asociación de resistencia.

Conclusión

Los sistemas de salud en nuestro país no realizan como rutina la prueba de resistencia a pirazinamida debido a que PZA es activo contra *M. tuberculosis* solo a un pH ácido (pH 5.5), lo que impide su fácil análisis. La detección de mutaciones presentes en el gen *pncA* que generan resistencia en este profármaco es de suma importancia, ya que es considerado como base estructural de la terapia antituberculosa.

Con la creciente aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los fármacos para su control, se prevé un panorama alarmante. Los pacientes infectados tienen de un 50% a un 80% de éxito en el tratamiento y son una fuente de infección por periodos más largos que los pacientes que presentan cepas sensibles. La comprensión del efecto de la mutación genética en la estructura de la proteína es necesaria para ayudar al conocimiento del desarrollo de nuevos y mejores fármacos. El presente estudio se basó en el análisis de secuencias del gen completo *pncA*, a partir de las cuales se generaron modelos tridimensionales, con los cuales se pudieron realizar predicciones sobre el efecto que se da con el cambio de aminoácidos.

En conclusión, con base en el análisis realizado, las modificaciones en los aminoácidos Q10P, W68S y S179R podrían ser importantes para el correcto plegamiento y funcionamiento de la actividad enzimática y podrían estar relacionadas con la resistencia a pirazinamida, hecho que deberá ser confirmado con modelos experimentales. El análisis *in silico* es de suma importancia y nos permite conocer el impacto de las mutaciones sobre la secuencia de aminoácido y la actividad de la proteína que nos da un panorama de la probable resistencia que genera la mutación analizada.

Agradecimientos

Se agradece al laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario José E. González de Monterrey, Nuevo León, México por su colaboración y el aporte del material biológico. A cada uno de los autores de este manuscrito por sus aportaciones para la realización y mejora del contenido. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la valiosa e indispensable beca otorgada, la cual permitió la realización de esta investigación.

References

- Alame-Emane, A. K., Xu, P., Pierre-Audigier, C., Cadet-Daniel, V., Shen, X., Sraouia, M.,
Siawaya, J. F., Takiff, H., Gao, Q., & Gicquel, B. (2015). Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* arises after rifampicin and fluoroquinolone resistance. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 19(6), 679–684. doi: <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0768>
- Allana, S., Shashkina, E., Mathema, B., Bablshvili, N., Tukvadze, N., Shah, S., Kempker, R., Blumberg, H. M., Moodley, P., Mlisana, K., Brust, J. C. M., & Gandhi, N. R. (2017). *pncA* gene mutations associated with pyrazinamide

- resistance in drug-resistant tuberculosis, South Africa and Georgia. *Emerging Infectious Diseases*, 23(3), 491-495. doi: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2303.161034>
- Aggarwal, M., Singh, A., Grover, S., Pandey, B., Kumari, A., & Grover, A. (2018). Role of *pncA* gene mutations W68R and W68G in pyrazinamide resistance. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(3), 2567-2578. doi: <https://doi.org/10.1002/jcb.26420>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2008) *Bioquímica*. Barcelona, España: Editorial REVERTÉ.
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (Cenaprece). (2016). *Guía de la OMS para tratamiento de TB resistente a fármacos*. Recuperado de <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/GuiaDeLaOMSparaTratamientoDeTB.pdf>
- Cuevas-Córdoba, B., & Zenteno-Cuevas, R. (2010). Tuberculosis drogorresistente: Mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(9), 621-628. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.12.005>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2011). *Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes* (2nd Ed.). Wayne, PA, USA. No : M24-A2. ISBN 1-56238-746-4.
- Cuevas-Córdoba, B., Juárez-Eusebio, D. M., Almaraz-Velasco, R., Muñiz-Salazar, R., Laniado-Laborin, R., & Zenteno-Cuevas, R. (2015). Mutation at embB codon 306, a potential marker for the identification of multidrug resistance associated with ethambutol in mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9), 5455-5462. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00117-15>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.
- Jurén, P., Werngren, J., Toro, J. C., & Hoffner, S. (2008). Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(5), 1852-1854. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00110-08>
- Louw, G. E., Warren, R. M., Donald, P. R., Murray, M. B., Bosman, M., Van Helden, P. D., Young, D. B., & Victor, T. C. (2006). Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10(7), 802-807. <https://www.ingentaconnect.com/content/iatld/ijtd/2006/00000010/00000007/art00016#>
- Luscombe, N. M., Laskowski, R. A., & Thornton J. M. (2001). Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Research*, 29(13), 2860-2874. doi: 10.1093/nar/29.13.2860
- Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321-4325. doi: 10.1093/nar/8.19.4321
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2000). *Lehninger principles of Biochemistry*. New York. W.H. Freeman and Company. Third Edition.
- Pace, C. N., Scholtz, J. M., & Grimsley, G. R. (2014). Forces stabilizing proteins. *Federation of European Biochemical Societies*, 588, 2177-2184. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.006>
- Personne, Y., & Parish, T. (2014). *Mycobacterium Tuberculosis* possesses an unusual tmRNA rescue system. *Tuberculosis*, 94(1), 34-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.09.007>
- Petrella, S., Gelus-Ziental, N., Maudry, A., Laurans, C., Boudjelloul, R., & Sougakoff, W. (2011). Crystal structure of the pyrazinamidase of mycobacterium tuberculosis: Insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. *Plos one*, 6(1), e15785. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015785>
- Saddala, M., & Adi, P. J. (2018). Discovery of small molecules through pharmacophore modeling, docking and molecular dynamics simulation against *Plasmodium vivax* Vivapain-3 (VP-3). *Heliyon*, 4(5) e00612. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00612>.

- Scheen, P., Lopez, C., Mendez, M., Calla, J., Peña, L., & Zimic, M. (2004). Aspectos moleculares de la resistencia a pirazinamida en *M. tuberculosis*: Implicancias para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y terapéutica. *Revista de la Sociedad Peruana de Neumología*, 48(2), 111-116. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/hil-538636>
- Sekiguchi, J., Miyoshi-Akiyama, T., Augustynowicz-Kopec, E., Zwolska, Z., Kirikae, F., Toyota, E., Kobayashi, I., Morita, K., Kudo, K., Kato, S., Kuratsuji, T., Mori, T., & Kirikae, T. (2007). Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 179–192. doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.00750-06>
- Singer, M. (1993). *Genes y genomas, una perspectiva cambiante*. Barcelona, Villadomat: Ediciones Omega S. A.
- StatSoft Inc. (2007). Statistica, Version 8.0. Recuperado de <http://www.statsoft.com>
- SWISS-MODEL Workspace/GMQE. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296-W303.
- Tracevska, T., Jansone, I., & Baumanis, V. (2004). Spectrum of *pncA* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Latvia. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48(8), 3209–3210. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3209-3210.2004>
- Yoon, J., Nam, J., Kim, K., & Ro, Y. (2014). Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea and analysis of the correlation between the mutations and pyrazinamidase activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 2821–2828. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1706-0>
- Zhang, Y., Shi, W., Zhang, W., & Mitchison, D. (2014). Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. *Molecular Genetics of Mycobacteria* 2(4), 1–12. doi: <https://doi.org/10.1128/9781555818845.ch24>