

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología-Microbiología

Influencia de las mutaciones del gen *pncA* de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogoresistentes sobre los parámetros cinéticos y actividad enzimática de Pirazinamidasas recombinantes

Tesis

Presentada por:

Bach. Yaneth Mariluz Quispe Hualpa

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO – MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2019

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 327

En la ciudad de Tacna, en el auditorium de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; siendo las 09:10 horas del día 12 de abril del 2019, estando presente el jurado calificador nominado por Resolución de Facultad N° 9306-2019-FACI-UN/JBG, conformado por los siguientes docentes:


Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina	Presidente
Mblgo. Luis Lloja Lozano	Miembro
Msc. Angela Verónica Choque Miranda	Secretaria

Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del Reglamento de Grados y títulos de la Facultad de Ciencias.

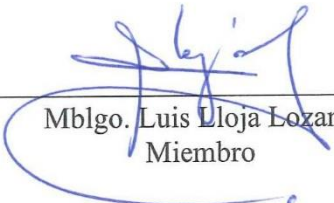
A continuación, el Presidente del Jurado instó a la Bachiller Yaneth Mariluz Quispe Hualpa, a exponer la tesis titulada: Influencia de las mutaciones del gen *pncA* de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogoresistentes sobre los parámetros cinéticos y actividad enzimática de Pirazinamidasas recombinantes.

Siendo las 09:40 horas, la tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador. Terminado este proceso, se invitó a que los miembros emitan su calificación de acuerdo al reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: Aprobado por Unanimidad con el calificativo de Sobresaliente (18) de acuerdo al Reglamento de Grados y títulos de la Facultad de Ciencias.


Siendo las 10:10 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.



Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina
Presidente



Mblgo. Luis Lloja Lozano
Miembro



Msc. Angela Choque Miranda
Secretaria

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado la oportunidad de crecer, por estar a mi lado cada día, por fortalecer mi mente y corazón y por haber puesto en mi camino a personas maravillosas que me han sido de soporte y compañía durante el periodo de estudio.

A mi familia, por ser el regalo más grande que Dios me dio, les agradezco por toda la confianza y apoyo que brindaron desde mucho más antes de mis primeros pasos, todo se lo debo a ustedes, lo material nunca podrá compensar lo que por mí hicieron.

A mi familia Peluche y AGEUP, quienes me ayudaron en los momentos más difíciles y compartieron mis momentos de alegría.

A mis asesores y Co asesores, Dr. César Cevallos Columbus, Dra. Patricia Sheen y MSc. Ricardo Antiparra, les agradezco por todo su apoyo y perseverancia para conmigo.

Al Laboratorio de Biología Molecular y Bioinformática de la UPCH, que me brindó el soporte para mi tesis, le agradezco el haberme permitido ser parte él.

¡Los amo!

Todo lo puedo en Cristo que me fortalece. Filipenses 4:13.

CONTENIDO

Pág.

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis.....	3
1.2. Objetivos.....	3
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Tuberculosis	4
2.2. Pirazinamida.....	5
2.3. Pirazinamidasa.....	8
2.4. Cinética enzimática	12
2.5. Clonamiento de genes y Expresión de Proteínas recombinantes	22
2.6. Purificación de enzimas recombinantes	31
2.7. Concentración de enzimas recombinantes.....	33
2.8. Medición de la concentración y actividad enzimática.....	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Población y muestra	35
3.2. Diseño de investigación.....	36
3.3. Materiales y equipos.....	37
3.4. Técnica de trabajo.....	38
IV. RESULTADOS	45

4.1. Clonamiento, expresión y purificación de PZAsa de Mtb	45
4.2. Parámetros cinéticos de PZAsas recombinantes	47
4.3. Actividad enzimática de PZAsas recombinantes	49
4.4. Influencia de las mutaciones en el gen <i>pncA</i> sobre los parámetros cinéticos y actividad enzimática de PZAsas recombinantes.	50
V. DISCUSIONES	59
VI. CONCLUSIONES	67
VII. RECOMENDACIONES	68
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
IX. ANEXOS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01 Microbiología de la tuberculosis	4
Figura 02 Mecanismo de acción de la PZA	7
Figura 03 Estructura molecular de la PZAsa de Mtb	9
Figura 04 Detalles de los sitios catalíticos de la PZAsa	10
Figura 05 Mecanismo de reacción de la PZAsa	11
Figura 06 Diagrama de energía de una reacción química	13
Figura 07 Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente	13
Figura 08 Transcurso de formación de un complejo enzima – sustrato.....	15
Figura 09 Gráfico de Lineweaver – Burk	18
Figura 10 Plásmido pET28a	24
Figura 11 Vectores de clonación y expresión	25
Figura 12 Fundamentos de la expresión de proteínas en Lemo21 (DE3).....	26
Figura 13 Tipos de cortes de enzimas de restricción	28
Figura 14 Tipos de filtración	33
Figura 15 Reacción de Wayne	34
Figura 16 Verificación de clonamiento de gen <i>pncA</i> de cepa WT H37Rv de Mtb	46
Figura 17 Curva de purificación de PZAsa recombinante de cepa WT H37Rv	46

Figura 18 Análisis de PZAsa recombinante de Mtb cepa WT H37Rv por SDS – PAGE 12 %.....	46
Figura 19 Gráfico de cajas de valores de K_m de PZAsas recombinantes de acuerdo a los cambios de aminoácidos producidos por las mutaciones del gen <i>pncA</i>	51
Figura 20 Gráfico de cajas de valores de K_{cat} de PZAsas recombinantes de acuerdo a los cambios de aminoácidos producidos por las mutaciones del gen <i>pncA</i>	53
Figura 21 Gráfico de cajas de valores de E_{ff} de PZAsas recombinantes de acuerdo a los cambios de aminoácidos producidos por las mutaciones del gen <i>pncA</i>	55
Figura 22 Gráfico de cajas de valores de actividad enzimática de PZAsas recombinantes de acuerdo a los cambios de aminoácidos producidos por las mutaciones del gen <i>pncA</i>	58
Figura 23 Modelamiento de PZAsa con cambio de aminoácido V125F	81
Figura 24 Modelamiento de PZAsa con cambio de aminoácido L172P	81
Figura 25 Modelamiento de PZAsa con cambio de aminoácido A171T	82
Figura 26 Modelamiento de PZAsa con cambio de aminoácido P62L.	82
Figura 27 Curva de purificación por cromatografía de afinidad de PZAsa recombinantes de cepa de Mtb con mutación G373T en el gen <i>pncA</i>	83
Figura 28 Análisis de PZAsa recombinante de Mtb con mutación G373T en el gen <i>pncA</i> por SDS – PAGE 12 %	83

Figura 29 Curva de purificación por cromatografía de afinidad de PZAsa recombinante de cepa de Mtb con mutación G511A en el gen <i>pncA</i>	84
Figura 30 Análisis de PZAsa recombinante de Mtb con mutación G511A en el gen <i>pncA</i> por SDS – PAGE 12 %	84
Figura 31 Curva de purificación por cromatografía de afinidad de PZAsa recombinante de cepa de Mtb con mutación T515C en el gen <i>pncA</i>	84
Figura 32 Resultados de la prueba de Bradford para demostración de la presencia de proteínas en las alícuotas obtenidas de la purificación por cromatografía de afinidad	85
Figura 33 Resultados del test de Wayne para demostración de actividad de PZAsa a partir de alícuotas obtenidas de purificación por cromatografía de afinidad	85
Figura 34 Análisis de PZAsa recombinante de Mtb con mutación T515C en el gen <i>pncA</i> por SDS – PAGE 12 %	85
Figura 35 Curva de purificación por cromatografía de afinidad de PZAsa recombinante de cepa de Mtb con mutación G185A en el gen <i>pncA</i> por SDS – PAGE 12 %	86
Figura 36 Análisis de PZAsa recombinante de Mtb con mutación G185A en el gen <i>pncA</i> por SDS – PAGE 12 %	86
Figura 37 Test de Wayne de PZAsa WT H37Rv de Mtb	86

Figura 38 Test de Wayne de PZAsas recombinantes de Mtb con mutaciones con mutaciones G373T y T515C en el gen <i>pncA</i>	87
Figura 39 Test de Wayne de PZAsa recombinante de Mtb con mutación G511A en el gen <i>pncA</i>	87

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 01 Mutaciones en el gen <i>pncA</i> de los ADN de Mtb y sus respectivos cambios de aminoácidos en la traducción	35
Tabla 02 Distancia entre los cambios de aminoácidos de las mutaciones y los aminoácidos del sitio activo y de unión al metal de la enzima	35
Tabla 03 Mix de cinética enzimática	42
Tabla 04 Estándares de PZA para medición de actividad enzimática	43
Tabla 05 Característica de cepas de Mtb MDR y de las mutaciones que estas albergan	45
Tabla 06 Parámetros cinéticos y actividad enzimática de PZAsas recombinantes de Mtb	49
Tabla 07 Análisis estadístico de Tukey y agrupación de subconjuntos de la influencia de las mutaciones en el gen <i>pncA</i> sobre los parámetros cinéticos y actividad enzimática de PZAsas recombinantes	56
Tabla 08 K_m de PZAsas recombinantes de Mtb	88
Tabla 09 K_{cat} de PZAsas recombinantes de Mtb	88
Tabla 10 E_{ff} de PZAsas recombinantes de Mtb	88
Tabla 11 Actividad enzimática de PZAsas recombinantes de Mtb	88

RESUMEN

La pirazinamida es un profarmaco que al ingresar a *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y mediante la acción de la pirazinamidasa (PZAsa), enzima codificada por el gen *pncA*, es convertida a su forma activa, el ácido pirazinoico (POA) el cual es un tóxico y potencial inhibidor de micobacterias en estado de latencia. Las mutaciones en el gen *pncA* constituyen el principal mecanismo de resistencia a PZA. En este estudio, se evaluó la influencia de las mutaciones del gen *pncA* de cepas de Mtb multidrogoresistentes sobre los parámetros cinéticos y actividad enzimática de PZAsas recombinantes a través de técnicas de clonamiento molecular y expresión de proteínas recombinantes. Para ello, se trabajó con mutaciones (G373T, T515C, G511A y G185A) que en la estructura de las PZAsas recombinantes dan lugar a cambios de aminoácidos (V125F, L172P, A171T y P62L) alejados de los sitios catalíticos. Nuestros hallazgos de acuerdo a los análisis estadístico muestran que las mutaciones no afectaron los valores de K_m ($p > 0.05$), sin embargo, los demás parámetros cinéticos (K_{cat} y E_{ff}) y actividad enzimática ($p < 0.05$) sí fueron afectados. La PZAsa con el cambio de aminoácido L172P mostró una funcionalidad (K_{cat} : 11 min^{-1} ; E_{ff} : $8.24 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$; actividad enzimática: $0.51 \mu\text{mol POA} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1} \text{PZAsa}$) mucho menor al de las otras PZAsas y acuerdo al análisis de Tukey al compararse con la PZAsa WT H37Rv se evidenció este orden: WT H37Rv > V125F > A171T > P62L > L172P. En conclusión las mutaciones del gen *pncA* afectan negativamente los parámetros cinéticos (K_{cat} y E_{ff}) y actividad enzimática de PZAsas recombinantes.

Palabras clave: Pirazinamidasa, Mutaciones, Parámetros cinéticos, Actividad enzimática.

ABSTRACT

Pyrazinamide is a prodrug that enters *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and through the action of pyrazinamidase (PZAsa), an enzyme encoded by the *pncA* gene, is converted to its active form, pyrazinoic acid (POA) which is a toxic and potential inhibitor of mycobacteria in a latent state. Mutations in the *pncA* gene are the main mechanism of resistance to PZA. In this study, the influence of mutations of the *pncA* gene of multidrug-resistant Mtb strains on the kinetic parameters and enzymatic activity of recombinant PZAsas was assessed through molecular cloning techniques and expression of recombinant proteins. For this, we worked with mutations (G373T, T515C, G511A and G185A) that in the structure of the recombinant PZAsas give rise to amino acid changes (V125F, L172P, A171T and P62L) far from the catalytic sites. Our findings according to the statistical analysis show that the mutations did not affect the K_m values ($p > 0.05$), however, the other kinetic parameters (K_{cat} y E_{ff}) and enzymatic activity ($p < 0.05$) were affected. The PZAsa with the amino acid change L172P showed a functionality (K_{cat} : min^{-1} ; E_{ff} : $8.24 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$; enzyme activity: $0.51 \mu\text{mol POA} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1}\text{PZAsa}$) much less than another PZAsas and according to the Tukey analysis when compared with the PZAsa WT H37Rv this order was evidenced: WT H37Rv > V125F > A171T > P62L > L172P. In conclusion, mutations of the *pncA* gene negatively affect the kinetic parameters (K_{cat} y E_{ff}) and enzymatic activity of recombinant PZAsas.

Keywords: Pirazinamidase, mutations, Kinetic parameters, kinetic activity

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). En el 2017, 10 millones de personas desarrollaron la enfermedad y el 23 % de la población mundial estuvo infectada con la forma latente, en el Perú se reportaron 100 nuevos casos de TB por cada 100 000 personas. Se estima que anualmente se dan 1,4 millones de casos resistentes a Pirazinamida (PZA).

La PZA es un fármaco de primera línea cuya actividad en un ambiente de pH ácido la hace única y eficaz en la eliminación de bacilos en estado de latencia; al ingresar al bacilo y mediante la actividad de la Pirazinamidasa (PZAse), enzima codificada por el gen *pncA* (561 pb); se convierte a su forma activa, el ácido pirazinoico (POA), molécula letal para la bacteria.

La principal causa de resistencia a PZA son las mutaciones en el gen *pncA*, las cuales producen la disminución y pérdida de la funcionalidad (parámetros cinéticos [K_m , K_{cat} , E_{ff}] y actividad enzimática) de la PZAse. Sin embargo, más de un estudio muestra que no todas las mutaciones ejercen el mismo efecto perjudicial sobre la enzima, mucho depende de la posición del cambio de aminoácido (producido por la mutación en el *pncA*) respecto a las regiones catalíticas de la enzima; el sitio activo (D49, H51, H57 y H71) y de unión al metal (D8, K96 y C138), aquellos que se hallan cerca o en estas posiciones tienden a perjudicar la estructura – función de la PZAse mientras que los que están más alejados pueden hasta mostrar una funcionalidad similar a la PZAse wild type (WT), dando lugar a fenotipos susceptibles. La actividad de la PZAse es medida por el test de Wayne.

A pesar de que la PZA es un componente crucial en el tratamiento de TB, en el Perú la resistencia a este fármaco es un problema constante en la población y son muy pocos los esfuerzos por disminuir su prevalencia, por lo tanto, un mejor conocimiento de las bases genéticas ayudará a los esfuerzos para el desarrollo de técnicas de diagnóstico (basados en moléculas de mejor sensibilidad, especificidad y rentabilidad) que puedan ser fácilmente aplicadas en centros de salud de áreas con alta incidencia de casos. Además, permitirá a los médicos planificar y ofrecer un manejo clínico más efectivo para los casos de TB, reduciendo la probabilidad de aparición de resistencia.

Debido a la alta correlación entre las mutaciones del gen *pncA* y la pérdida de funcionalidad de la PZAsa, en este estudio se plantea; a partir del ADN de cepas de *M. tuberculosis* multidrogoresistentes, la evaluación de la influencia de las mutaciones del gen *pncA*; cuya traducción genera cambios de aminoácidos alejados de los sitios catalíticos de la enzima, sobre los parámetros cinéticos y actividad enzimática de PZAsas recombinantes.

1.1. HIPÓTESIS

Las mutaciones del gen *pncA* de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogoresistentes influyen sobre los parámetros cinéticos y la actividad enzimática de las pirazinamidasa recombinantes.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

- Evaluar la influencia de las mutaciones del gen *pncA* de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogoresistentes sobre los parámetros cinéticos y actividad enzimática de pirazinamidasa recombinantes.

1.2.2. Objetivos específicos

- Cuantificar los parámetros cinéticos (K_m , K_{cat} y E_{ff}) y actividad enzimática de pirazinamidasa recombinantes (WT H37Rv y con cambios de aminoácidos en su estructura P62L, V125F, A171T y L172P).
- Determinar la asociación entre las mutaciones del gen *pncA* y los parámetros cinéticos de pirazinamidasa recombinantes.
- Determinar la asociación entre las mutaciones del gen *pncA* y la actividad enzimática de las pirazinamidasa recombinantes.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. TUBERCULOSIS

2.1.1. Epidemiología

La TB es una enfermedad causada por Mtb. En el 2017, dió lugar a 1,6 millones de muertes y 10 millones de personas desarrollaron la enfermedad, el 4,6 % bajo la forma MDR y el 0,4% bajo la forma extremadamente resistente (XDR). En el Perú se reportaron 100 nuevos casos de TB por cada 100 000 personas. Se estima que 1,7 billones de personas (23 % de la población mundial) tiene la infección bajo una latente (OMS, 2018).

Anualmente se dan 1,4 millones de casos resistentes a Pirazinamida (Whitfied et al, 2015).

2.1.2. Agente causal: *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)

Mtb es un microorganismo aeróbico ácido alcohol resistente (Gonzalez, 2014), de forma bacilar delgada y ligeramente curva. Posee colonias elevadas, verrugosas y adherentes, de color blanquecino o amarillento, difíciles de emulsificar (Padilla et al, 2004).

Los aislamientos requieren de 16 a 20 horas para su duplicación, por ello, crecen de 4 a 6 semanas (Sheen et al, 2007).

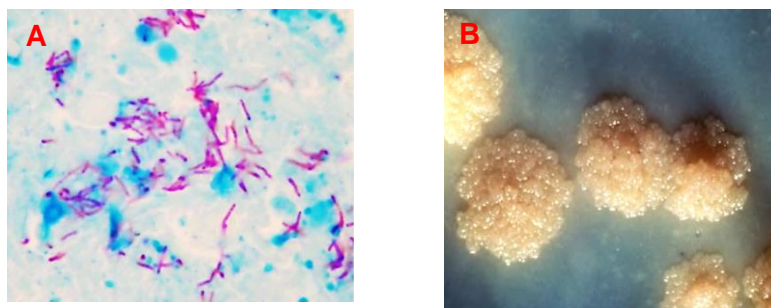


Figura 01. Microbiología de la TB. **A.** Bacilo de la tuberculosis, tinción Ziehl-Neelsen. **B.** Colonias de *Mycobacterium tuberculosis*.

Fuente: Centro de Control Prevención de Enfermedades, NIH, dominio público.

A) Ciclo Infeccioso y persistencia de Mtb

Inicia cuando un individuo con tuberculosis (TB) pulmonar expone aerosoles cargados con Mtb, estos al ser inhalados son fagocitados por los macrófagos alveolares. Los macrófagos de individuos sanos controlan eficazmente la proliferación del bacilo; pero, el patógeno nunca es erradicado del organismo (infección persistente) (Kaufmann et al., 2002); en hospederos inmunocomprometidos éste crece rápidamente progresando hacia una TB primaria activa (Knechel et al., 2009; Van Cravel et al., 2002).

Dosis infec. Mín. (DIM): Menos de 10 bacilos (DB, 2002).

B) Esquema terapéutico

La OMS recomienda cuatro fármacos en un periodo de seis meses: Isoniazida (H), rifampicina (R), etambutol (E) y pirazinamida (PZA) durante los dos primeros meses; H y R en los cuatro meses restantes (2HREPZA/4HR) (WHO, 2013).

2.2. PIRAZINAMIDA (PZA)

La PZA es un fármaco de primera línea (Zhang et al., 2003) que inhibe bacilos latentes que se hallan dentro de macrófagos, cuyo característico pH ácido (Vandal et al. 2009) se origina por la inflamación. (Zhang et al., 2014) Elimina grandes poblaciones de Mtb cuando han sido previamente expuestas a Isoniazida *in vivo* (McCune et al., 1956).

La MIC de PZA es de **100 µg/ml** (Said et al., 2005).

2.2.1. Mecanismo de acción

A pesar de la importancia de la PZA en el tratamiento de la TB, su mecanismo de acción es poco conocido (Zhang et al., 2008).

Basado en varios estudios (Zhang et al., 2003; Scorpio et al., 1996; Zhang et al., 1999; Shi et al., 2011) se asume que la PZA ingresa a Mtb por difusión pasiva y se transforma en el citoplasma a su forma activa (POA), por la PZAsa, enzima codificada por el gen *pncA* de Mtb (Scorpio et al., 1996).

El POA producido se libera al espacio extracelular mediante un sistema deficiente de eflujo, donde se protona en HPOA, siempre que el medio extracelular sea ácido. (Zhang et al., 1999) El HPOA externo difunde a la célula a través de la membrana por un gradiente de potencial eléctrico y libera un protón en el citosol. El POA es un potencial y tóxico inhibidor del crecimiento de Mtb latente aun en un bajo pH (Junaid M., 2018).

La combinación de la acumulación de HPOA y de POA en el citosol produce un efecto letal sobre la membrana como la inhibición de la síntesis de ácidos grasos, (Zimhony et al., 2007) reducción del potencial, alteración en el transporte de nutrientes, (Zhang et al., 2003) y la interferencia de trans – traducción mediante la unión a la proteína ribosomal RpsA (Saguy, 2007) la cual compite con el RNAtm.

(Scorpio et al., 1996), se debe también por las que se hallan en la región promotora, la cual, compromete la expresión de la proteína. (Sheen et al., 2013)

Una PZAsa defectuosa es incapaz de hidrolizar la PZA a POA (Scorpio et al., 1997; Cheng et al., 2000).

Las mutaciones consisten principalmente en cambios de codones que dan lugar a sustituciones de aminoácidos; en algunos casos, inserciones o deleciones de nucleótidos (Sreevatsan et al., 1997; Scorpio, 1997; Lemaitre, 1999; Sckiguchi et al., 2007; Zimic, 2010).

Estudios previos han demostrado que, en una baja proporción de casos, el tiempo del eflujo de POA, las mutaciones en el gen *panD* y en el gen *rpsA* están asociados a la resistencia a PZA (Zhang et al., 2013; Zimic et al., 2012).

2.3. PIRAZINAMIDASA (PZAsa)

La PZAsa es una amidohidrolasa codificada por el gen *pncA*, (Rasool et al., 2017) de 561 pb, es la encargada de la conversión de la PZA a POA, es citoplásmica y expresa constitutivamente (Sun et al., 1999).

2.3.1. Estructura molecular

Pzasa es una molécula proteica simple (contiene solo 1 dominio α/β) que incluye 185 aminoácidos, su estructura consta de 6 cadenas paralelas β – plegada, 4 cadenas α – hélice y 10 loops (Petrella et al., 2015; Zimic et al., 2010). (Figura 03)

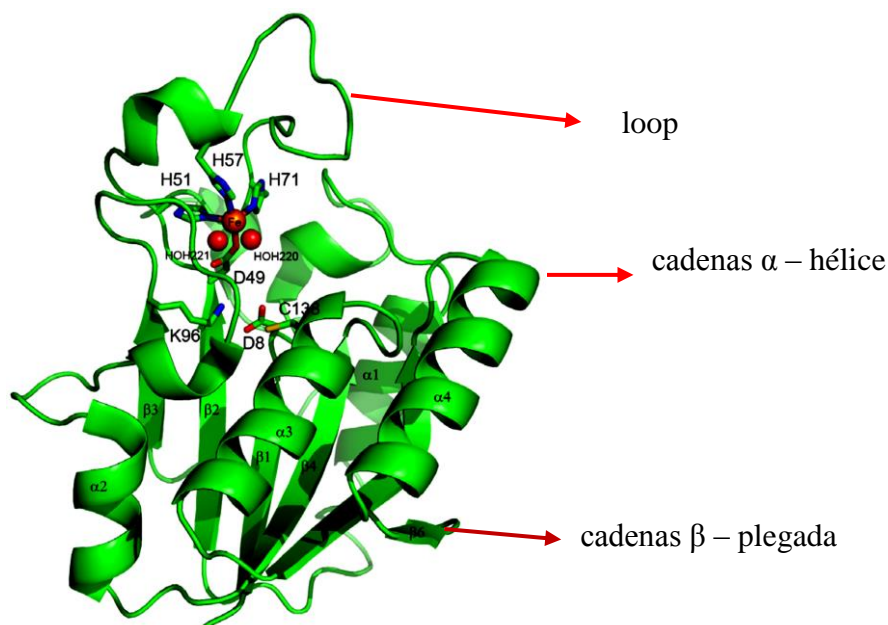


Figura 03. Estructura molecular de la PZAse de Mtb.
Fuente: Petrella et al., 2015.

La PZAse es una metaloenzima cuya actividad se da en coordinación con el hierro (Fe^{2+}) y consta de dos regiones catalíticas:

- **Sitio activo:** La cavidad de Unión al sustrato es una pequeña grieta de 10 Å de profundidad y 7 Å de ancho, se delimita por una triada catalítica constituida por Lys96 (K96) al final de la cadena β 3, Asp8 (D8) al final de la cadena β 1 y Cys138 (C138) en el extremo N – terminal de la hélice α 3 (Petrella et al., 2015). (Figura 03 y 04)
- **Sitio de unión al metal:** Está conformado por 4 residuos (His51, His57, His71 y Asp49), los cuales están relacionados directamente en la coordinación con el Fe^{2+} , además dejan un montón de espacio en el centro de la cavidad para la unión con el sustrato (PZA). Los residuos H51 y H71 además de ser los límites de la cavidad de unión al metal, son la bisagra del bucle que abarca los residuos 52 a 70 (Petrella, 2015). (Figura 04)

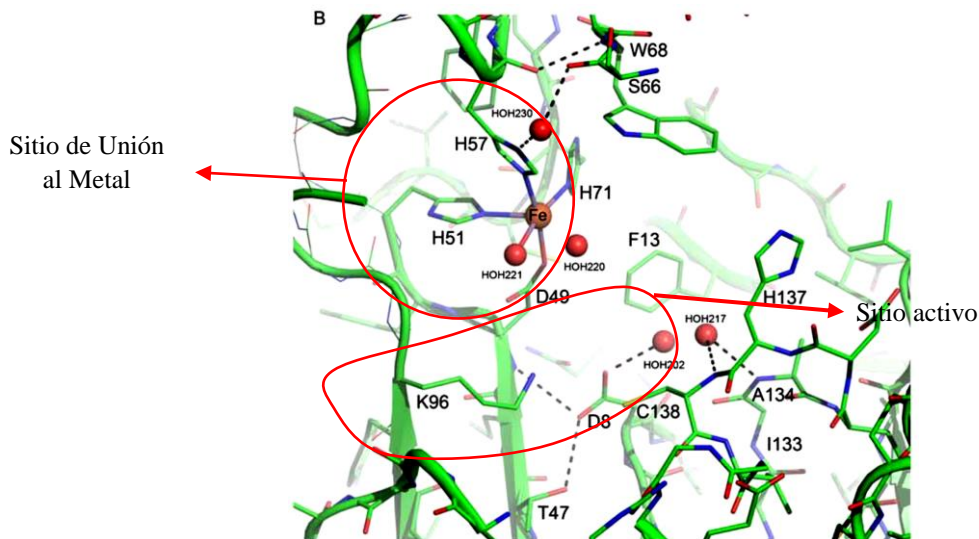


Figura 04. Detalles de los sitios catalíticos de la PZAsa. Sitio de Unión al metal y sitio activo.

Fuente: Petrella et al., 2015

2.3.2. Mecanismo de catálisis

El mecanismo de catálisis de PZAsa de *Pyrococcus horikoshii* propuesto por Du et al. (2001) sugiere que las reacciones de catálisis se dividen en dos fases: (Figura 05)

- **Primera fase:** La enzima es acilada por el residuo C133 a través de un enlace tioéster, involucra los siguientes pasos:
 - (a) Unión de PZA
 - (b) La activación de C133 por D10
 - (c) Ataque del tiolato de C133 sobre el carbono carbonil de PZA.
 - (d) Decaimiento del intermediario tetraédrico para la liberación del amonio y generación de la **enzima acilada**.
- **Segunda fase:**
 - (e) Ataque del zinc activado por agua sobre el carbono carbonyl del enlace tioéster.
 - (f) Unión de la molécula de agua, la cual
 - (g) Llena se ubica en el núcleo y protona D10
 - (h) Decaimiento del intermediario tetraédrico para liberar POA.

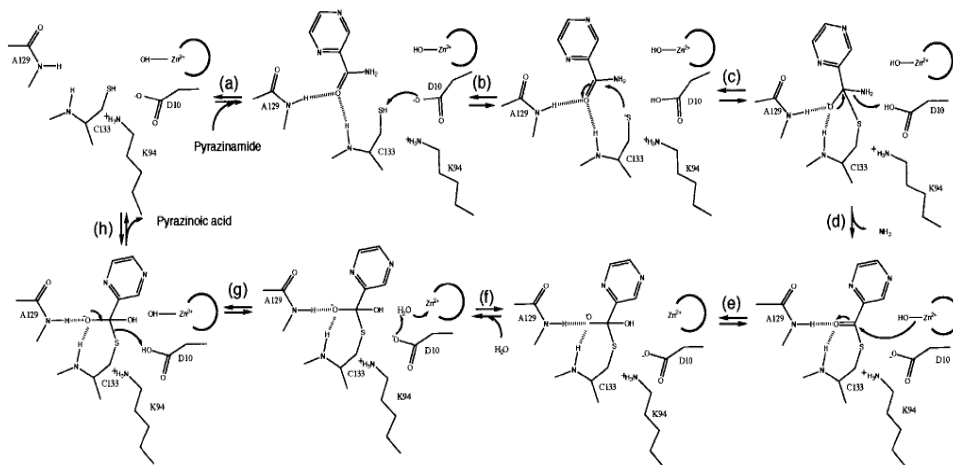


Figura 05. Mecanismo de reacción de PZAsa.

Fuente: Du et al., 2001

2.3.3. Características fisicoquímicas

A) **Peso molecular de PZAsa:** Teóricamente el peso molecular es de 20,69 KDa (Zhang et al., 2008).

B) **Temperatura y pH óptimo:** La PZAsa posee un máximo de actividad enzimática a un pH 7 y a 40 °C (Zhang et al., 2008).

2.3.4. Características bioquímicas:

A) Actividad enzimática

Con un exceso de concentración de PZA a un pH de 7,5 y a 37 °C Zhang et al. (2008) determinaron la actividad de la PZAsa en 81,9 U. mg⁻¹.

Lemaitre et al. (2001) a partir de la fracción soluble de la cepa H37Rv y un aislamiento clínico susceptible, determinaron valores de actividad enzimática de 1,33 y 4,43 U/mg, respectivamente mientras que Sheen *et al.* (2009) emplearon una **PZasa purificada** y determinaron 38,40 μmol POA. min⁻¹ mg⁻¹ PZAsa de actividad enzimática.

B) Parámetros cinéticos

Boshoff et al. (1998) a partir de un extracto celular de Mtb H37Rv encontraron una baja actividad celular ($0,02 \text{ U.mg}^{-1}$), el valor del K_m encontrado fue de $300 \mu\text{M}$ para PZA.

Sheen et al. (2009) empleando una PZAsa purificada de Mtb H37Rv determinaron valores de $1,24 \text{ mM}$ para el K_m y $1005,41 \text{ min}^{-1}$ para el K_{cat} .

Doustdar et al. (2015) a partir de 3 PZAsas purificadas determinaron valores de $0,431$ a $0,79 \text{ mM}$ de K_m ; $43,51$ a 120 min^{-1} de K_{cat} y $100,95$ a $151,89 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$.

2.4. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Las mediciones cinéticas permiten elucidar el mecanismo catalítico de las enzimas (Sheen et al., 2007).

Cuando en una reacción química como $A \rightarrow P$, cierta población de moléculas de A posee la suficiente energía como para alcanzar un estado activado (**estado de transición**) en donde es muy elevada la probabilidad de que se establezca o se rompa un enlace químico para formar un producto P. La velocidad de una reacción química es proporcional a la concentración de estas especies características del estado de transición. La **energía libre de activación** $\Delta G \neq$ es la cantidad de energía necesaria para llevar todas las moléculas de 1 mol de sustancia a una temperatura determinada, al estado de transición en la cima de la barrera de activación (Nelson et al., 2005).

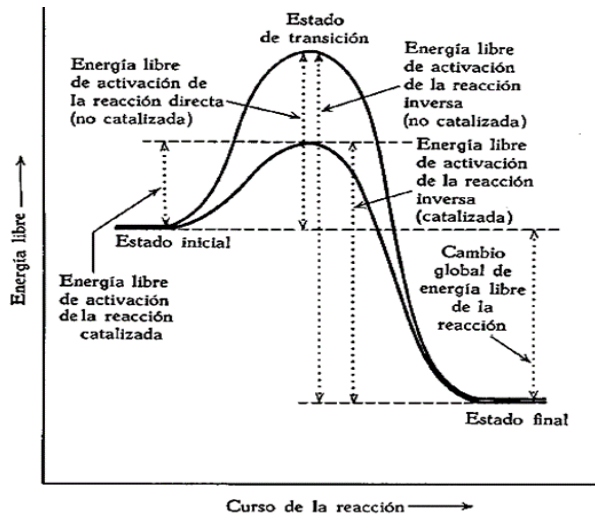


Figura 06. Diagrama de energía para una reacción química, no catalizada y catalizada.
Fuente: Nelson, 2005.

2.4.1. Ecuación de Michaelis – Menten

Los principios generales de la cinética de las reacciones enzimáticas se caracterizan por la **saturación del sustrato** (Nelson et al., 2005).

En la Figura 07 se observa que a una concentración de sustrato baja, la velocidad inicial de la reacción V_0 es proporcional a la concentración del sustrato, pero a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad inicial de la reacción disminuye, deja de ser proporcional a la concentración del sustrato (Nelson et al., 2005).

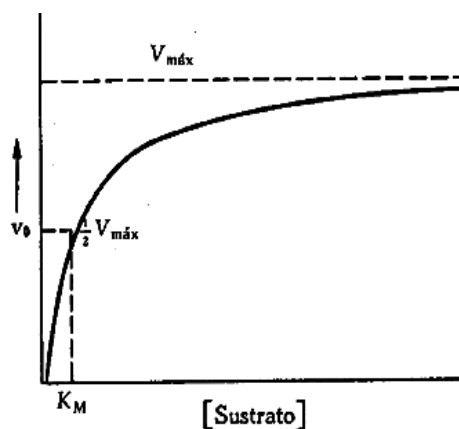


Figura 07. Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente.

Fuente: Nelson et al., 2005.

Con un aumento posterior de la concentración del sustrato, la velocidad de la reacción llega a ser esencialmente independiente de la concentración del sustrato y se aproxima asintóticamente a una velocidad constante. Se dice entonces que la enzima se halla **saturada** con su sustrato (Nelson et al., 2005).

La teoría de Michaelis – Menten supone que la enzima libre [E] se combina en primer lugar con el sustrato [S] para formar el complejo enzima – sustrato [ES]; a continuación, este último se escinde, para formar enzima libre y producto P:



Estas reacciones son reversibles, la ecuación de Michaelis – Menten es la ecuación de la velocidad para las reacciones catalizadas por enzimas que solo actúan sobre un sustrato, modela los efectos de la concentración del sustrato. La **velocidad inicial** es igual a la velocidad de ruptura del complejo ES, de acuerdo con la ecuación (2); se escribe la ecuación de velocidad de primer orden: (Nelson et al., 2005)

$$V_0 = K_{+2}[ES] \quad (3)$$

Pero, K_{+2} y [ES] no pueden medirse directamente por ello otra expresión para V_0 en función de otras variables en primer lugar es la ecuación de segundo orden para la formación de ES a partir de E y S (reacción 1) (Nelson et al., 2005):

$$\frac{d [ES]}{dt} = K_{+1}([E_T] - [ES])[S] \quad (4)$$

K_{+1} = Constante de velocidad de segundo orden.

La ecuación de velocidad para la descomposición de ES por suma de dos reacciones da lugar a dos situaciones, la primera origina el producto (reacción directa) y la segunda produce E + S (la inversa de la ecuación 1) (Nelson et al., 2005). Por ello:

$$\frac{-d[ES]}{dt} = K_{-1}[ES] + k_{+2}[ES] \quad (5)$$

Cuando la velocidad de formación de ES es igual a la velocidad de desaparición, el sistema ha alcanzado el **estado estacionario**, que se define como aquel en que la concentración de ES permanece constante (figura 08), entonces:

$$k_{+1}([E_T] - [ES])[S] = K_{-1}[ES] + k_{+2} [ES] \quad (6)$$

Reordenando la ecuacion (6) se tiene:

$$\frac{[S]([E_T] - [ES])}{[ES]} = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} = K_m \quad (7)$$

La constante K_m es lo que se conoce como **constante de Michaelis – Menten**.

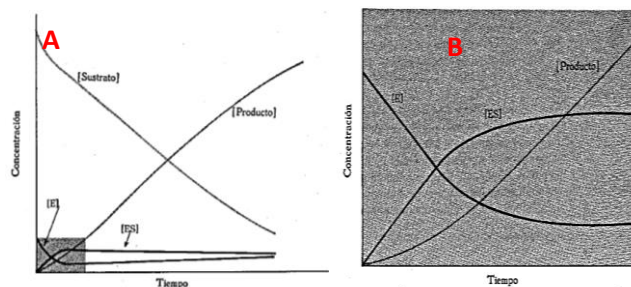


Figura 08. Transcurso de la formación de un complejo enzima – sustrato en función del tiempo e iniciación del estado estacionario, B es la ampliación de la porcion sombreada en A.

Fuente: Nelson et al., 2005.

Si se reemplaza el [ES] por su valor de la ecuación (3), se obtiene:

$$V_0 = K_{+2} \frac{[E_T][S]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

Cuando la concentración del sustrato es tan elevada que toda la enzima está bajo la forma de ES, esta se halla **saturada**, por ende se alcanza la velocidad inicial máxima, V_{max} :

$$V_{max} = K_{+2}[E_T] \quad (10)$$

Sustituyendo $K_{+2} [E_T]$ por su valor deducido en la ecuación (10) se obtiene:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (11)$$

Esta es la ecuación de Michaelis – Menten; ecuación de velocidad para una reacción de un solo sustrato, catalizada enzimáticamente.

De la ecuación mencionada se deriva una relación numérica importante en el caso especial en que la velocidad inicial de la reacción sea exactamente la mitad de la velocidad máxima; es decir, cuando $V_0 = \frac{1}{2} V_{max}$ (Nelson et al., 2005).

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Al dividir por V_{max} , se obtienen:

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Reordenando se transforma en:

$$K_m + [S] = 2[S]$$

$$K_m = [S]$$

Vemos así que la constante de Michaelis – Menten K_m es igual a la concentración de sustrato en la que la velocidad inicial de la reacción es la mitad de la velocidad máxima. Las dimensiones de K_m para una reacción de un solo sustrato son moles por litro, y la constante es independiente de la concentración de la enzima. (Nelson et al., 2005) El valor aproximado del K_m se obtiene gráficamente al representar la velocidad inicial frente a la concentración inicial del sustrato (Nelson et al., 2005).

2.4.2. Una forma lineal de la ecuación de Michaelis – Menten se usa para determinar K_m y V_{max}

La medición directa del valor numérico del V_{max} y, por consiguiente, el cálculo de K_m , a menudo requiere de concentraciones altas poco prácticas de sustrato para alcanzar condiciones de saturación, sin embargo, una forma lineal que permite extrapolar valores, empieza con la siguiente ecuación (Murray et al., 2010):

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (11)$$

Se invierte

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{max}[S]} \quad (12)$$

Se factoriza

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]} \quad (13)$$

Y se simplifica

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_M}{V_{max}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (14)$$

La ecuación 14 es para una línea recta $y = ax + b$, donde:

$$y = 1/v \text{ y } x = 1/[S].$$

Un gráfico de $1/v_0$ en el eje y , expresado como una función de $1/[S]$ en el eje x , da una línea recta cuya intersección en el eje y se define como $1/V_{max}$ y la pendiente se define como K_m/V_{max} . Este gráfico se conoce como de **Lineweaver – Buerk**. Establecer el término y de la ecuación 15 igual a cero para resolver x , revela que la intersección es $-1/K_m$ (Murray et al., 2010).

De este modo, K_m se calcula con mayor facilidad a partir de la intersección negativa. (figura 09; ecuación 15)

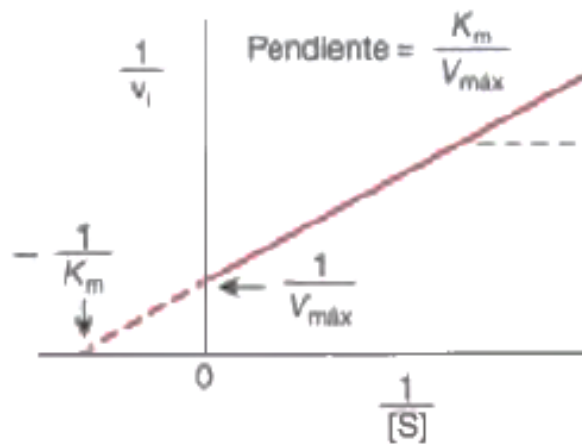


Figura 09. Gráfico de Lineweaver – Burk para evaluar K_m y V_{max} .

Fuente: Murray et al., 2010.

$$0 = ax + b; \text{ por tanto, } x = \frac{-b}{a} = \frac{-1}{K_m} \quad (15)$$

2.4.3. Importancia de la constante de Michaelis, K_m

El K_m representa una constante que evalúa la relación de la velocidad de una reacción catalizada por una enzima con la concentración del sustrato (Segel, 1975).

La constante de Michaelis es un parámetro cinético de gran importancia por razones como:

- Su valor da una idea de la **afinidad de la enzima por el sustrato**: A menor K_m , mayor afinidad de la enzima por el sustrato, y viceversa (Ehu, 2018).
- El K_m establece un valor aproximado del nivel intracelular del sustrato (Segel, 1975).
- Los valores de K_m de muchas enzimas son próximos a los de la concentración fisiológica de sus sustratos, de forma que pequeñas variaciones en la concentración del sustrato pueden suponer grandes cambios en la velocidad de la ruta metabólica (Ehu, 2018).

2.4.4. La constante catalítica. K_{cat}

El K_{cat} es la velocidad constante para la conversión del complejo [ES] al complejo [EP]. (Segel., 1975) Es la medida directa de la producción catalítica en condiciones óptimas (enzima saturada), es el tiempo necesario para cambiar el sustrato en producto y expresa el número de moléculas de sustrato transformadas por segundo, **es la constante de velocidad general** (Murray et al., 2010).

Para una enzima homogénea es posible calcular su número de recambio (V_{max} dividida entre los moles de enzima presente) en una reacción michaeliana:

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{E_t} \quad (16)$$

Sin embargo, si se conoce el número de sitios activos presentes, la actividad catalítica de una enzima homogénea se expresa mejor como su **constante catalítica**, K_{cat} (V_{max} dividida entre el número de sitios activos, S_t) (Murray et al., 2010):

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{S_t} \quad (17)$$

Dado que las unidades de concentración se anulan, las unidades de K_{cat} son tiempo recíproco.

Con la finalidad de consolidar el cálculo del K_m y K_{cat} en algunos programas informáticos se suelen hacer reemplazos a partir de las formulas 14 y 16, de forma que resulta lo siguiente:

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{E_t} \rightarrow V_{max} = K_{cat} * E_t \quad (18)$$

A partir de la ecuación 16 se reemplaza los valores de V_{max} acorde a la ecuación 18:

$$\begin{aligned} \frac{1}{V_o} &= \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \\ \frac{1}{V_o} &= \left(\frac{K_m}{K_{cat} * E_t}\right) \frac{1}{S} + \frac{1}{K_{cat} * E_t} \\ \frac{1}{V} &= \frac{1}{E_t} \left[\left(\frac{K_m}{K_{cat}}\right) \left(\frac{1}{S}\right) + \left(\frac{1}{K_{cat}}\right) \right] \\ \frac{E_t}{V} &= \left(\frac{K_m}{K_{cat}}\right) \left(\frac{1}{S}\right) + \left(\frac{1}{K_{cat}}\right) \end{aligned} \quad (19)$$

2.4.5. Eficiencia catalítica, K_{cat}/K_m

La importancia de K_{cat}/K_m es que relaciona la velocidad de la reacción con la concentración de la enzima libre en lugar de la enzima total, dado que a bajas concentraciones de sustrato la mayor parte de la enzima es libre. La K_{cat}/K_M también determina la especificidad por competencia de sustratos, por ello también es llamada “constante de especificidad”. En resumen la K_{cat}/K_M es la constante que se refiere a las propiedades y las reacciones de la enzima libre y el sustrato libre (Sheen et al., 2007).

2.4.6. La actividad enzimática

Es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto. (Ehu, 2018) Se puede expresar en términos de unidades de enzima o **unidades internacionales (UI)**, la cual según la Unión internacional de Bioquímica es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de sustrato en un minuto ($\mu\text{mol}/\text{min}$).

2.5. CLONAMIENTO DE GENES Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

2.5.1. Clonamiento de genes

A) CLONACIÓN:

La clonación de ADN es la introducción de un fragmento de ADN (inserto) dentro de un **vector**, que puede replicarse de manera autónoma e independiente de la célula hospedera. El resultado es la obtención de millones de copias de una **molécula recombinante o clona molecular** compuesta por ADN proveniente del inserto y del vector (Sandoval et al., 2012).

B) VECTORES DE CLONACIÓN:

Un vector se define como una molécula de ADN de doble cadena (DNAs), con capacidad de albergar un ADN exógeno (de otro origen) (Sandoval et al., 2012).

Clasificación de vectores:

- **Vectores de clonación:**

Son aquellos que almacenan secuencias y la obtienen grandes cantidades de la molécula recombinante (Sandoval et al., 2012).

Elementos que conforman un vector de clonación:

Origen de replicación: Secuencia en el ADN del vector que provee un sitio único de reconocimiento a las proteínas que identifican el sitio de inicio de replicación (ORI). Los plásmidos se caracterizan por tener un solo sitio ORI en su genoma y realizar una replicación unidireccional (Sandoval et al., 2012).

Marcador de selección: Gen que confiere resistencia a un antibiótico, entre los más comunes se encuentran los de resistencia a ampicilina y kanamicina (Sandoval et al., 2012).

Sitio de clonación múltiple: Es un fragmento de ADN que contiene una serie de sitios únicos de reconocimiento de enzimas de restricción, muy cercanos entre sí, con una amplia gama de posibilidades de insertar cualquier fragmento de ADN. Los más comunes son *EcoRI*, *HindIII*, *BamH*, *XhoI* y *KpnI* (Sandoval et al., 2012).

Los vectores de clonación pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos y cromosomas artificiales (Sandoval et al., 2012).

Plásmidos: Son pequeñas moléculas circulares de ADN que se replican y se transmiten con independencia del cromosoma bacteriano, constituyen el material genético móvil de las bacterias, donde funcionan como medio de transporte de genes a otras bacterias, como la resistencia a antibióticos. (Sandoval et al., 2012) Ejemplo: Plásmido pET28a (+), es un vector de clonación y expresión bacteriana con el promotor T7lac, posee una etiqueta His N – terminal, un sitio de escisión de trombina, etiqueta interna del epitopo T7, etiqueta His C – terminal; resistencia a Kanamicina y sitio de clonación para las enzimas de restricción (Harvard, 2018).

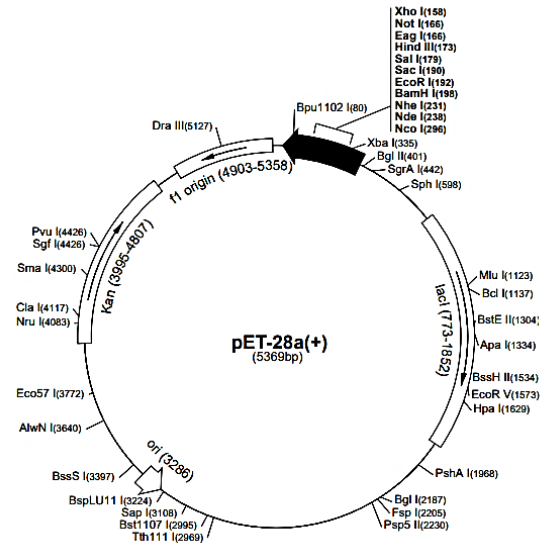


Figura 10. Plásmido pET28a

Fuente: Novagen, 2018.

- **Vectores de expresión:**

Son aquellos cuyo objetivo es producir un transcrito (ARN) o la proteína producto de ese transcrito. Son plásmidos o bien bacteriófagos (Sandoval et al., 2012).

Componentes de los vectores de expresión:

En su estructura molecular poseen, además de los elementos básicos presentes en los vectores de clonación; un *promotor fuerte*. Se caracterizan por constituir un sistema de expresión simple y efectivo, tener una baja expresión basal y ser fácilmente transferible a otras cepas. También incluyen secuencias de terminación de la transcripción y de adición de cola de poliadenilación. Otro factor importante es el sitio de unión al ribosoma (*internal ribosome entry site, IRES*), que es la secuencia Shine – Dalgarno que precede el codón de inicio AUG de la traducción en los ARNm procariotes. Ejemplo: pET28A, pÉT161, etc. (Sandoval et al., 2012).

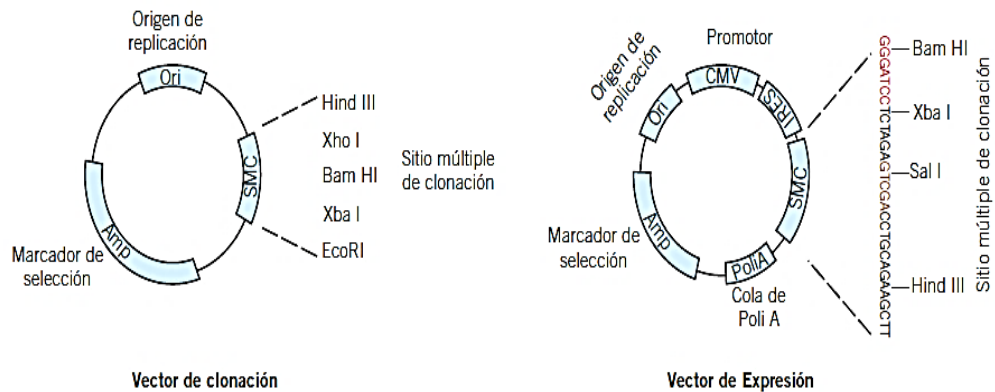


Figura 11. Vectores de clonación y expresión.
Fuente: Sandoval et al., 2012

- **Células hospederas para el clonamiento y expresión de proteínas recombinantes:**

Usualmente la célula del vector es una bacteria (*E. coli*), pero también puede ser una célula eucariota. (Sandoval et al., 2012) Usualmente para clonamiento se emplea como huésped a *E. coli* Novablue y para expresión *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21, *E. coli* Lemo 21 (DE3), *E. coli* Rosseta.

***E. coli* Novablue:**

Es una cepa ideal como huésped inicial del clonamiento debido a su alta eficiencia de transformación, capacidad de selección (resistencia a tetraciclina) y mutaciones *recA endA*, que da como resultado altos rendimientos además de una excelente calidad de DNA plasmídico (Novagen, 2004).

***E. coli* Lemo 21 (DE3):**

En la mayoría de las cepas de *E. coli* productoras de proteínas, la sobreexpresión está conducida por la polimerasa T7 de RNA. Lemo 21(DE3) es una cepa T7 diseñada para la expresión de proteínas recombinantes, la actividad de su polimerasa del RNA T7 puede ser modulada precisamente por su inhibidor natural la lisozima T7, que es expresada desde el extremadamente bien titulable promotor de ramnosa. La versatilidad de esta cepa hace posible la identificación de óptimas condiciones para la sobreexpresión de las proteínas usando solo una cepa y un limitado número de cultivos y/o condiciones para la sobreexpresión ahorran tiempo y son efectivos en costo (Biolabs, 2018).

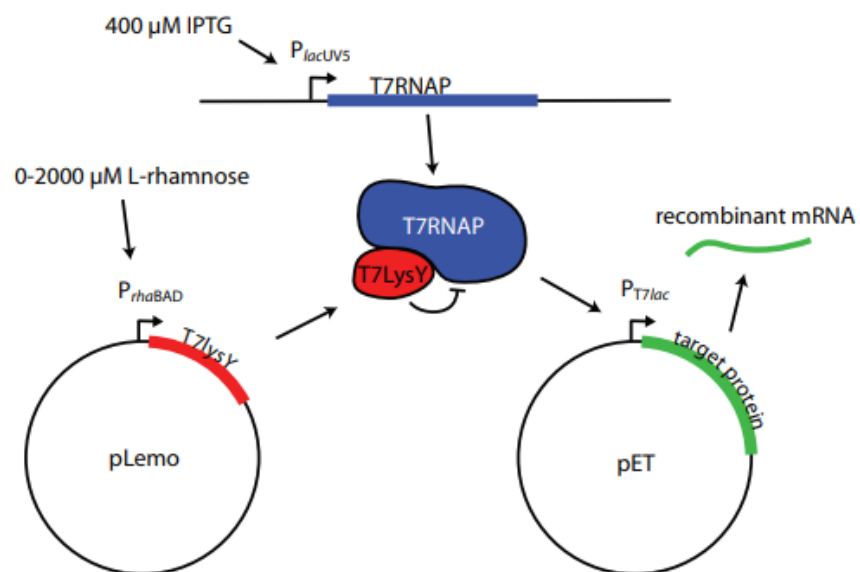


Figura 12. Fundamento de la expresión de proteínas en Lemo 21(DE3)

Fuente: Biolabs, 2018.

C) ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Son enzimas de origen bacteriano con actividad de endonucleasas, capaces de cortar enlaces fosfodiéster en nucleótidos localizados dentro de la cadena del ADN (Secuencia diana).

Las empleadas en la metodología del ADN recombinante suelen reconocer una secuencia única de **4 a 8 nucleótidos**, donde realizan el corte.

En la naturaleza, las enzimas de restricción forman parte de la maquinaria con la que cuenta la bacteria para defenderse de infecciones virales (Gonzales et al., 2012).

Clasificación de tipos de enzimas:

- Tipo I: Reconocen una secuencia específica de nucleótidos y hacen un corte aleatorio en la doble cadena, a una distancia aproximada de 1000 pb del sitio de corte; además tienen la función de metilar su propio genoma (Gonzales et al., 2012).
- Tipo II: Reconocen secuencias específicas y hacen el corte de la doble cadena de ADN en el mismo sitio de reconocimiento, estas enzimas solo tienen actividad de restricción, no de metilación. Las secuencias de reconocimiento de estas enzimas son palindrómicas (Gonzales et al., 2012).
- Tipo III: Estas enzimas reconocen una secuencia específica y cortan el ADN de doble cadena fuera de la secuencia diana (aproximadamente de 25 a 27 pares de base corriendo abajo del sitio de reconocimiento) (Gonzales et al., 2012).

Tipos de cortes producidos por las enzimas de restricción:

Los cortes que realizan las enzimas de restricción sobre la cadena de ADN pueden generar dos estructuras o formas:

- Cortes cohesivos: También llamados pegajosos, se generan porque la enzima corta en cada cadena de ADN entre nucleótidos localizados en posiciones diferentes respecto al eje de simetría de la secuencia diana. Estos cortes generan extremos monocatenarios en un segmento de 3 a 5 bases de longitud, por lo que en esta fracción la falta de cadena complementaria facilita su interacción con otro fragmento en monocadena con secuencia complementaria (Figura 13), los extremos así generados propician la unión específica entre segmentos diferentes de ADN, pero cortados con la misma enzima (Gonzales et al., 2012).
- Los extremos romos: Se generan porque la enzima corta en ambas cadenas de ADN sobre un mismo eje, por lo que dichos extremos son de doble cadena, la unión entre fragmentos de ADN con extremos romos es más inespecífica (Gonzales et al., 2012).

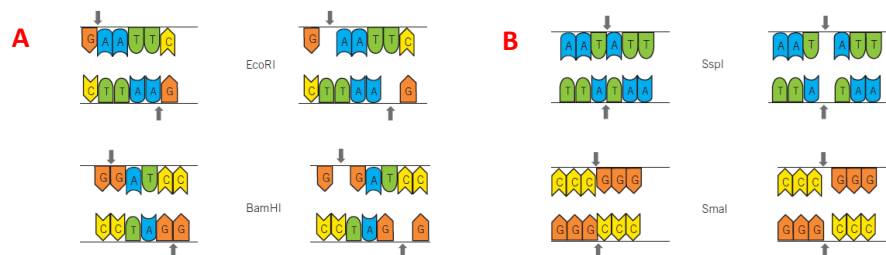


Figura 13. Tipos de cortes de enzimas de restricción (A) Cortes cohesivos o pegajosos. (B) Cortes romos

Fuente: Gonzales et al., 2012.

D) PROCESO DE CLONACIÓN MOLECULAR

La clonación de cualquier fragmento de ADN involucra los siguientes pasos:

- a) *Preparación del inserto de ADN que se va a clonar:* Involucra la digestión con enzimas de restricción para liberar el fragmento de interés de la molécula de ADN completo, el inserto resultante de la digestión se purifica y separa de la molécula de ADN de donde proviene (amplificación de PCR), mediante una electroforesis en gel de agarosa. La banda correspondiente al inserto se escinde del gel y se extrae y purifica mediante técnicas convencionales (Sandoval et al., 2012).

- b) *Preparación del vector para la clonación:* Implica corte con las mismas enzimas de restricción con las que se dirigió el inserto, para obtener un ADN lineal (debe poseer extremos complementarios a los extremos del inserto a clonar).

Desfosforilación del vector con la finalidad de impedir la autoligación del vector (Sandoval et al., 2012).

Purificación del vector. Consiste en eliminar las partículas de agarosa, los restos de enzimas inactivadas y las sales provenientes de la reacción de digestión, se realiza empleando columnas de resina con alta afinidad de ADN en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas (Sandoval et al., 2012).

- c) *Ligación del inserto y del vector*: Involucra la formación de enlaces fosfodiéster entre los residuos fosfato que se localizan en los extremos 5' de las cadenas de ADN y los residuos hidroxilo 3'. Esta unión está catalizada por la *ligasa* (Sandoval et al., 2012).
- d) *Preparación de células competentes*: Uno de los mecanismos más utilizados consiste en tratar las bacterias con una solución de $CaCl_2$. Se cree que la membrana bacteriana es permeable a los iones de cloro, pero no a los iones de calcio, de manera que los iones de calcio se rodean de moléculas de agua para entrar a la célula, lo que provoca que la célula se abulte, lo que facilita la formación de poros y la entrada del ADN (Sandoval et al., 2012).
- e) *Transformación celular*: Consiste en la adquisición de un ADN exógeno, que le confiere un nuevo fenotipo a la célula huésped (Sandoval et al., 2012).
- f) *Identificación de colonias celulares con vector recombinante*: Para ello se emplean marcadores de selección proporcionados por los vectores, los más usados son los genes de resistencia a antibióticos (Sandoval et al., 2012).

Para comprobar la presencia del ADN recombinante se procede con la extracción de plásmidos mediante lisis alcalina la cual tiene su fundamento en las diferencias de tamaño y en las propiedades de desnaturalización y renaturalización que existen entre el ADN plasmídico y el ADN genómico (UPCH, 2017).

2.5.2. Expresión de proteínas recombinantes:

Para ello se emplean promotores fuertes que aseguren la expresión por arriba de 10 % de las proteínas celulares (Sandoval et al., 2012).

Las proteínas recombinantes son producidas a partir de secuencias de ADN insertados en un determinado vector de expresión, los cuales además esta última, producen una pequeña proteína para facilitar su purificación (UPCH, 2017).

La mayoría de los sistemas de expresión procariota emplean el operon lactosa (operon lac), el cual ha sido modificado genéticamente, conservando su secuencia promotora, y el gen β – galactosidasa, por esta razón se emplea el IPTG como inductor artificial, ya que es capaz de unirse al represor LacI, mas no es un sustrato para β – galactosidasa por lo que no puede ser metabolizado por la bacteria. Además, el IPTG es transportado eficientemente al interior de la bacteria en ausencia de la permeasa con lo que su entrada es independiente de la expresión del gen *lacY*. La expresión se realiza en un Huésped en el que se expresará la proteína (*E. coli* Lemo 21(DE3)) (UPCH, 2017).

2.6. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES:

Usualmente se emplea:

La cromatografía: Técnica de separación física de una sustancia desde una mezcla. La sustancia que se encuentra disuelta en un medio fluido, **la fase móvil**, se desplaza a través de una **fase estacionaria**.

Las diferentes sustancias de la fase móvil tienen distinta afinidad por las sustancias que constituyen la fase estacionaria, por lo que cada sustancia se desplaza a distinta velocidad y causa su separación del resto de sustancias presentes en la mezcla.

2.6.1. Cromatografía de afinidad

Se basa en la alta especificidad de las interacciones biológicas entre dos moléculas, típicamente son reversibles (Urh et al., 2009).

Columna de afinidad de níquel.

Al crearse una proteína de fusión, se crea una que no solo contiene la secuencia de oligonucleótidos que forman la proteína, sino que, además, contiene algunos residuos adicionales en los extremos N – terminal o C – terminal. En este caso, el vector de expresión contiene un promotor para la T7 polimerasa seguido de una secuencia de inicio ATG. Una secuencia His – tag que la sigue codifica seis residuos de histidina que van unidos al extremo C – terminal de nuestra enzima (PZAsa). Por último se encuentra el dominio MCS (Multiple Cloning Site), donde se introduce la secuencia del gen que codifica la proteína.

Después de clonar el gen, se introduce el vector en *E. coli* Lemo21 (DE3); el mecanismo de transcripción y traducción permitirá la expresión de la PZAsa la cual además de esta, tendrá una metionina inicial (ATG) y seis histidinas. Al inyectar la muestra a la columna con resina de níquel (HisTrap), todas las proteínas pasan a través de esta y no quedan retenidas, excepto la PZAsa que queda fuertemente enganchada a la columna por las colas de histidinas. Una vez realizados los lavados de columna para asegurar la eliminación de todos los componentes no específicos, se procede a eluir las fracciones de proteína que quedaron en la columna, para lo cual el empleo de un gradiente ascendente de imidazol (sustancia análoga de la histidina) desplaza de forma progresiva la proteína, a medida que se aumenta el gradiente de concentración el imidazol se pega a la columna de afinidad de níquel y las colas de histidina se desprenden.

2.7. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES:

Generalmente se proceden con técnicas de filtración siendo las más empleadas: la Ultrafiltración perpendicular y tangencial.

Ultrafiltración: Es un método de separar macromoléculas y sustancias coloidales, donde la membrana actúa como barrera selectiva, separa partículas que se encuentran entre 5 y 100 nm equivalente a pesos moleculares de 0,5 y 500 KDa, aproximadamente.

- *Ultrafiltración tangencial:* La alimentación fluye de forma paralela a la membrana de celulosa.
- *Ultrafiltración perpendicular:* La alimentación fluye de forma perpendicular a la membrana de celulosa.

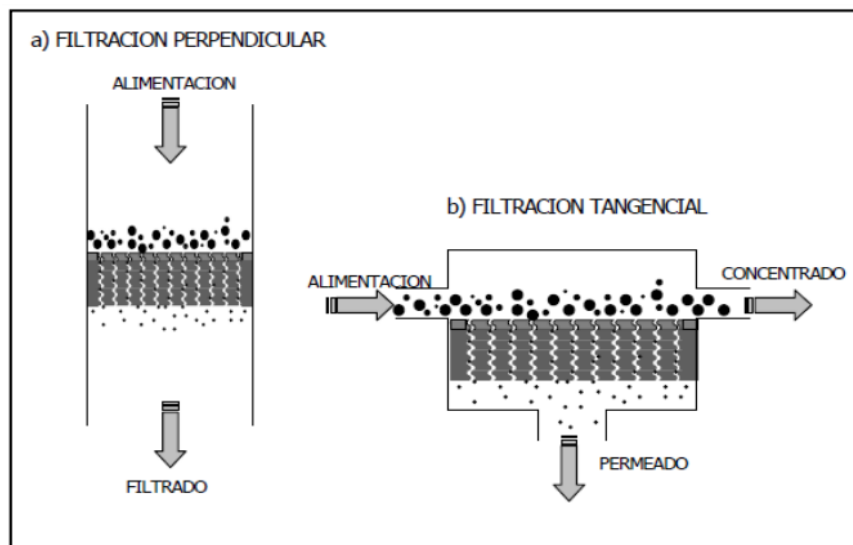


Figura 14. Tipos de filtración. Filtración convencional o perpendicular (A) y Filtración tangencial o paralela (B)

Fuente: Saavedra & Romero, 1999.

2.8. MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

2.8.1. Método de Bradford:

Se basa en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del Azul Brillante de Coomasie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte a azul cuando el colorante se une a la proteína. Experimentalmente se mide la absorbancia a 595 nm (Bradford, 1976).

2.8.2. Método de Wayne:

Es un método que determina la actividad de la PZAsa, las cepas de Mtb que son sensibles a PZA metabolizan esta última a POA, las cepas resistentes no metabolizan la PZA debido a que han perdido actividad de la PZAsa. El método pone en manifiesto la presencia de POA por la formación de una sal ferrosa de color rosa (Troche, 2010).

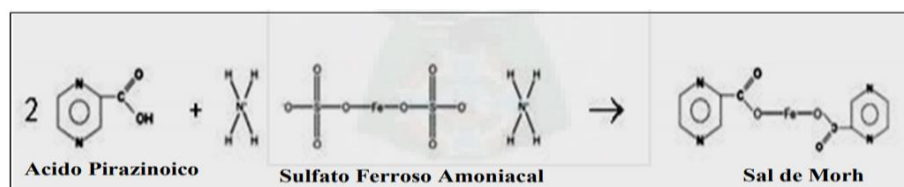


Figura 15. Reacción de Wayne

Fuente: Troche, 2010.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Población y Muestra

La población estuvo conformada por el banco de ADN de Mtb de la genoteca de los laboratorios de Investigación y desarrollo de la UPCH.

La muestra se halló compuesta por el ADN de 4 cepas de Mtb MDR con mutaciones no silenciosas en el gen *pncA* y cuya traducción generó cambios de aminoácidos alejados de los residuos catalíticos, estos se muestran en la Tabla 01, además de un ADN de la cepa referencial, H37Rv, la cual es susceptible a PZA. Las distancias entre estas últimas y los residuos del sitio de unión al metal y el sitio activo de la PZAsa se muestran en la Tabla 02 y para evidenciar la ubicación espacial de estos en la estructura tridimensional de la proteína se muestran las figuras 23, 24, 25 y 26.

Tabla 01. Mutaciones en el gen *pncA* de los ADN de Mtb y sus respectivos cambios de aminoácidos en la traducción.

CEPA	MUTACIÓN GEN <i>pncA</i>	CAMBIO DE AMINOÁCIDO
TB CON 560	G373T	V125F
LS 846	T515C	L172P
TB CON 1173	G511A	A171T
CSV12308	G185A	P62L
WT	NO	NO

Fuente: Elaboración propia. (AA: Aminoácidos)

Tabla 02. Distancia entre los aminoácidos afectados y los aminoácidos de los sitios catalíticos de la enzima.

MUTACIÓN		SITIO ACTIVO (Å)			SITIO DE UNIÓN AL METAL (Å)			
gen <i>pncA</i>	Cambio de aa	AA 8	AA 96	AA138	AA 49	AA51	AA 57	AA 71
G373T	V125F	>19			>22			
T515C	L172P	>18		12.978	>23			
G511A	A171T	>17		10.717	>21			
G185A	P62L	>18			>16	9.29	12.22	

Fuente: Elaboración propia. (AA: Aminoácidos; Å: Amstrong)

La localización de estos cambios de los aminoácidos afectados en la estructura molecular de la PZAsa junto a los residuos del sitio activo y de unión al metal se muestra en el Anexo 01 (figuras 23 al 26).

3.2. Diseño de la investigación

En la presente investigación se empleó un diseño descriptivo, donde la elección de los ADN de las cepas con las que se trabajó fue dirigida. Para cada ensayo de medición de parámetros cinéticos y actividad enzimática se hizo cinco repeticiones.

3.3. Materiales y equipos:

3.3.1. Medio de cultivo, reactivos y otros

Agarosa
Buffer TAE 1X
Caldo Luria Bertani
Agar Luria Bertani
Buffer 5X
Fago Lambda
Primers NcoI y XhoI
DMSO
Enzima fussion (HF)
1 KB plus
Kit "Roche"
Sulfato de amonio ferroso
Enzimas (Ligasa, NcoI y XhoI)
Vector (Pet28a)
Buffer CutSmart
Sybersafe
Antibióticos (Kanamicina, Cloranfenicol, pirazinamida y Tetraciclina)
IPTG, TEMED y APS

3.3.2. Material de vidrio y otros

Microtubos de 0.1
Micortubos de 0.2
Falcons
Micropipetas
Pipetas pasteur
Papel craft
Bisturí
Columna de Histrap
Guantes de Latex talla S
Mascarilla con filtro HEPA #96

3.3.3. Material biológico

ADN de *Mycobacterium tuberculosis* MDR
E. coli Novablue
E. coli LEMO21 (DE3)

3.3.4. Equipos

Equipo de electroforesis horizontal
Equipo de electroforesis vertical
Congeladora (-70°C)
Refrigeradora -20°C
Refrigeradora (4°C)
Transiluminador
Termociclador
Nanodrop
Centrífuga refrigerada
pH – metro
Shaker
Microspin
Columna de purificación
Espectrofotómetro baño maría
Hot play
Cabina de seguridad biológica
Vortex
Balanza analítica
Incubadora
Agitador termomagnético
Computadora o laptop
Cámara fotográfica
Sistema de Ultrafiltración
Ultracel Amicon

3.4. Técnica de trabajo

3.4.1. Selección de ADN de Mtb MDR, plásmidos y cepas bacterianas

Se seleccionó cuatro ADN de cepas de Mtb MDR con mutaciones en el gen *pncA* como también el correspondiente al WT H37Rv. Las mutaciones y sus respectivos cambios de aminoácidos están referenciados en la Tabla 01.

Se emplearon las células competentes *E. coli* Novablue y *E. coli* LEMO21 (DE3) como huéspedes para la transformación del plásmido pET28a y expresión de la proteína marcada con la cola de histidina respectivamente.

3.4.2. Clonamiento del gen *pncA* de Mtb en *E. coli* Novablue

Los métodos de clonamiento y transformación usados fueron adoptados de Green and Sambrook (2012). Se amplificó el gen *pncA* por PCR convencional, para lo cual se empleó primers con sitios de restricción para NcoI (Forward) y XhoI (Reverse) (5'CCC CCA TGG GCC GGG GGT TGA TCA TC 3' y 5' CCC CTC GAG GGA GCT GCA AAC CAA CTC 3'). Se purificaron los amplicones (579 pb) con el Kit "Roche" y posteriormente fueron cuantificados en nanodrop.

Al igual que el vector de clonación, los amplicones fueron doblemente digeridos con ayuda de las enzimas de restricción NcoI y XhoI (New Engands BioLabs Inc.).

Luego, se purificó los productos de amplificación doblemente digeridos en gel de agarosa 0.6 % con Sybersafe mediante el uso del Kit QIAEX II, y los vectores doblemente digeridos se desfosforilaron con fosfatasa alcalina rSAP (Shrimp Alkaline phosphatase, 1000 U/ml) para posteriormente ser purificados por columna mediante el uso del Kit Roche.

Los amplicones fueron ligados al vector (ambos doblemente digeridos y purificados) con una T4 DNA ligase (New Engands BioLabs Inc.) por 16 horas a 16 °C.

Se prepararon células competentes de *E. coli* Novablue de acuerdo a lo indicado por Sambrock y Col (1989) con algunas modificaciones y se transformó conforme al protocolo de Shock térmico (Simonian et al. 1999) con la reacción de ligación. A partir de las clonas resultantes en Agar Luria Bertani (LB) con Kanamicina (K) y tetraciclina (T) se seleccionó colonias para la extracción de plásmidos recombinantes mediante lisis alcalina (Checa et al., 2017).

Con la finalidad de evidenciar la presencia del inserto (gen *pncA*) en el vector se hizo una digestión doble junto a la electroforesis horizontal.

Se envió a secuenciar los plásmidos recombinantes a MacroGen y con los resultados emitidos se identificaron las mutaciones presentes en el gen *pncA* clonado empleando herramientas bioinformáticas como ClustalOmega y Expasy tools.

3.4.3. Expresión y purificación de PZAsas recombinantes

Se prepararon células competentes de *E. coli* Lemo21 (DE3) de acuerdo a lo indicado por Sambrock et al. (1989) con algunas modificaciones y se transformaron conforme al protocolo de Shock térmico (Simonian et al. 1999) con los plásmidos recombinantes previamente aislados.

Se inoculó una colonia transformada a 50 ml de caldo LB con K y Cl y se incubó toda la noche a 37 °C con agitación constante. Se trasvasó 25 ml de este cultivo a 500 ml de caldo LB con K y Cl y se incubó a 37 °C hasta que se alcanzó un OD de 0,6 – 0,8 a 600 nm, a ello se le agregó 500 µl de IPTG (isopropyl β-D-thiogalactoside) a 0,5 mM y se incubó por 4 horas a 37 °C.

Al final, las células se concentraron por centrifugación a 5000 rpm por 15 min. a 4 °C para luego resuspender el pellet en 20 ml de Binding Buffer (Imidazol 20 mM, NaCl 0,5 M y tampón fosfato pH 7,4). Se obtuvo un extracto crudo mediante lisis del pellet, para ello se hizo 3 ciclos de shock térmico repetidos seguido de sonicación a 4 °C usando un sonicador S3000 (Misonix, Farmingdale, NY). Se centrifugó el producto de sonicación a 12 500 rpm por 15 min. a 4 °C obteniéndose así un sobrenadante (Fracción soluble) y un pellet (Fracción insoluble). Se tomaron alícuotas de 100 µL de extracto crudo, fracción soluble e insoluble y se les hizo un test de Wayne (Wayne, 1974) con la finalidad de evidenciar la actividad enzimática de forma cualitativa.

La fracción soluble se filtró con una membrana cuyo poro fue de 0,45 µm. Luego, esta última se purificó por cromatografía de afinidad iónica para lo cual se la cargó en una columna de níquel (Histrap™ HP de 5 ml) y se lavó con

Buffer fosfato imidazol de 40 mM, 60 mM, 100 mM, 300 Mm y 500 mM. Tomando como referencia las gráficas del LD PAGE, se analizó las alícuotas de las fracciones obtenidas en SDS – PAGE. (Doustdar et al. 2015) (Anexo 02) Paralelo a ello, con la finalidad de obtener más evidencias de la presencia de proteína en las alícuotas se hizo un Test de Wayne (Wayne, 1974) y Bradford (Simonian et al. 1999) en microplacas de ELISA. (Figura 32 y 33)

De acuerdo a los resultados en conjunto de las pruebas anteriormente mencionadas y con las alícuotas que tuvieron la proteína purificada, se concentró a esta 10 veces y se lavó con Buffer fosfato 1X, pH 6,4 de 0,1 M mediante ultrafiltración perpendicular con membranas de celulosa cuyo poro permite la retención de proteínas de hasta 10 KDa, para ello se trabajó en un sistema de Ultrafiltración Ultracel Amicon (Millipore Billerica) a 4 °C.

La concentración de la proteína se estimó por el método de Bradford (Simonian et al. 1999), para ello se le hicieron diluciones de 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 y 1:200, las cuales fueron comparadas con una curva estándar de BSA (Seroalbúmina de Bobino) y posteriormente fueron leídas en microplacas de ELISA a 595 nm. Cada ensayo de Bradford se desarrolló por duplicado.

3.4.4. Medición de la actividad de la PZAsa de forma cuantitativa para la determinación de la cinética de las enzimas recombinantes.

Se calculó los parámetros cinéticos empleando la reacción de hidrólisis de la PZA con algunas modificaciones (Du et al. 2001). Para cada mutante junto al WT se realizó 5 repeticiones y en cada repetición se preparó un mix cuya concentración final de la enzima fue de aproximadamente 1 μM . Para ello en primer lugar se hicieron escalas de diluciones a partir del stock calculado hasta llegar a una concentración de 2 μM en 0,1 M Buffer fosfato pH 6,4. El mix estuvo conformado por Buffer fosfato y la enzima PZAsa.

Tabla 03. Mix de cinética enzimática

	[] final	Volumen	Volumen para 12 tubos
2 μM Enzima + 0.1 M Buffer fosfato	1 μM Enzima + 50 mM Buffer fosfato	50 μL	600 μL
Agua	-	25 μl	300 μL

Fuente. Protocolo de rutina de laboratorio

Se preparó el mix para 12 microtubos de reacción debido a que se procesaron la actividad de las enzimas con 11 concentraciones distintas de PZA, el último mix se empleó para determinar la concentración final de la enzima en la reacción mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Durante el tiempo de espera del ensayo el mix permaneció en hielo (4 °C aproximadamente).

El mix se alicuotó en volúmenes de 75 μL en 12 microtubos a los cuales se los incubó a 37 °C por un minuto con la finalidad de que se atemperen. A cada tubo se agregó 25 μL de diferentes concentraciones de PZA (Tabla 04), la reacción se incubó por 1 minuto y luego se le agregó 10 μL de solución de

sulfato de amonio ferroso (SAF) al 20 % y finalmente se agregó 445 μL de 0,2 M de Glicina – HCl pH 3,4; para detener la reacción, y se centrifugó a 11 000 rpm por 10 minutos. Por duplicado de cada reacción, se tomó del sobrenadante 200 μL y se leyó la absorbancia a 450 nm de longitud de onda en un lector de microplacas de ELISA.

Al último tubo además de los 75 μL de mix se le agregó 25 μL de agua miliQ y se le midió la concentración mediante el método de Bradford comparándolo con una curva estándar de BSA.

Tabla 04. Estándares de PZA para medición de actividad enzimática

PZA diluida (mM)	Vol. De PZA (μL) 50 mM	Vol. Agua (μL)	Vol. Para cada reacción (μL)	Conc. Final de PZA (mM)
20	200	300	25	5
16	160	340	25	4
14	140	360	25	3,5
12	120	380	25	3
10	100	400	25	2,5
8	80	420	25	2
6	60	440	25	1,5
4	40	460	25	1
2	20	480	25	0,5
1	10	490	25	0,25
0	-	-	25	0

Fuente: Protocolo de rutina de laboratorio

Para la medición de la afinidad de la PZAsa con la PZA, se estimó la constante de Michaelis (K_m). Para determinar el número de moléculas de PZA convertidas en POA, por 1 mol de PZAsa durante 1 minuto se estimó la constante catalítica (K_{cat}).

Para determinar qué tan eficientemente la PZA es convertida a POA se calculó la eficiencia enzimática (E_{ff}) como K_{cat}/K_m .

La actividad enzimática se estimó como la cantidad de POA producida por 1 mg de enzima durante 1 minuto (Sheen et al. 2009). Todas estas constantes fueron halladas con ayuda del Software Origin Pro 9.0 los cuales se ajustaron a un gráfico de Lineweaver – Burk el cual tuvo como base la fórmula N°19.

3.4.5. Análisis estadístico

Para el análisis de las relaciones entre las mutaciones del gen *pncA* con los parámetros cinéticos y actividad enzimática se empleó un diseño completamente aleatorio (DCA) con su respectivo ANOVA además de un posterior análisis Post – Hoc; Tukey, empleando el software SPSS Versión 25.0.

IV. RESULTADOS

4.1. Clonamiento, expresión y purificación de PZAsa de Mtb

Se seleccionaron los ADN de cepas de Mtb MDR con mutaciones en el gen *pncA*, los cambios de aminoácidos que estas generaron se hallaron alejados de los sitios catalíticos (Tabla 02), las características de todo ello se detalla en la Tabla 05.

Tabla 05. Características de cepas de Mtb MDR y de las mutaciones que estas albergan.

CEPA	CARACT. DE CEPA		CARACTERÍSTICAS DE MUTACIÓN		
	Wayne	RESISTENCIA	MUTACIÓN EN GEN <i>pncA</i>	CAMBIO DE AA	Región de la mutación*
TB CON 560	0	MDR**	G373T	V125F	L6
LS 846	1	MDR**	T515C	L172P	α 4
TB CON 1173	0	MDR**	G511A	A171T	α 4
CSV12308	1	MDR, PZA	G185A	P62L	L4

AA, Aminoácido; ** No se conoce su resistencia a PZA; * Ubicación de cambio de aminoácido en la estructura de PZAsa de acuerdo a Zimic et al. (2010); 0, Sensible; 1, Resistente; MDR, Multidrogoresistencia (Resistente a Isoniazida, Rifampicina y/o etambutol); PZA, Pirazinamida; L, G, T, C, A, Bases nitrogenadas; V, F, L, P, A, T, Aminoácidos; L, Loop; α , alfa hélice.

Las PZAsas fueron clonadas (Figura 16), expresadas y purificadas a concentraciones finales de 13,741 μ M, 29,79 μ M, 195,05 μ M y 202,6129 μ M para las cepas TBCON560, LS846, TBCON1163 y CSV12308 respectivamente. También se clonó la PZAsa de la cepa de referencia, sensible a PZA, H37Rv (WT).

La purificación de las PZAsas recombinantes (Figura 17) fueron confirmadas con una banda única en un SDS – PAGE 12 % (Figura 18) (Anexo 02) (Figura 28, 30, 34 y 36).

- Leyenda:
 1: pET28a Sin digerir
 2: pET28a simple digerido NcoI
 3: pET28a doble digerido NcoI/XhoI
 4: Marcador 1 Kb plus

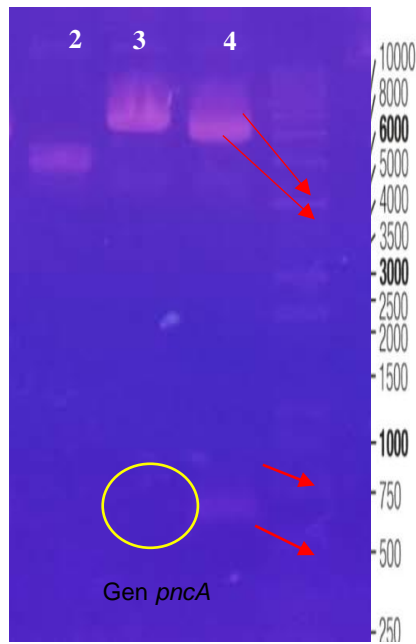


Figura 16. Verificación de clonamiento de gen *pncA* de cepa WT H37Rv de Mtb.
 Fuente. Resultados Obtenidos.

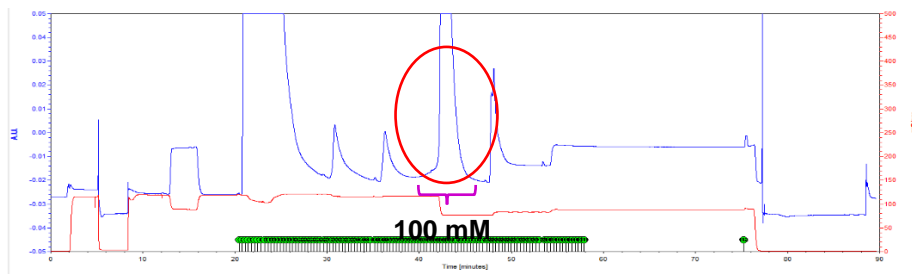


Figura 17. Curva de purificación de PZAsa recombinante de cepa WT H37Rv. Pico máximo en 100 mM de Imidazol del Buffer fosfato.
 Fuente: Resultados obtenidos.

- LEYENDA:
 1: Marcador molecular BROAD RANGE
 2: PZAsa concentrada de WT
 3: PZAsa recombinante purificada de WT

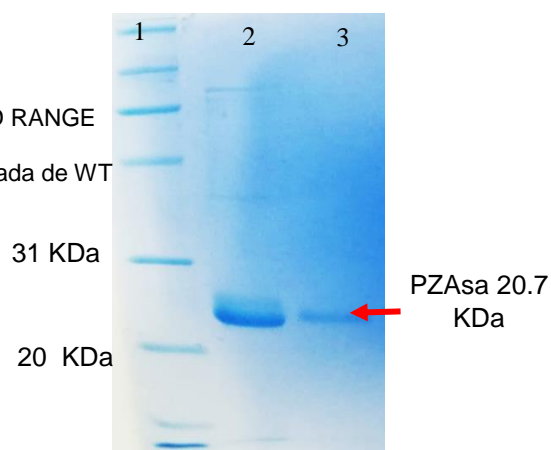


Figura 18. Análisis de PZAsa recombinante de Mtb cepa WT H37Rv por SDS – PAGE 12 %.
 Fuente: Resultados obtenidos.

4.2. Parámetros cinéticos de PZAsas recombinantes

Mediante el ensayo de Wayne cuantitativo y el Software OriginPro 9.0 se determinaron los parámetros cinéticos de las PZAsas mutantes y WT H37Rv. Los parámetros cinéticos de las PZAsas recombinantes (K_{cat} y K_m) y la eficiencia enzimática (E_{ff}) cada enzima se muestran en la Tabla 06 y los datos completos de todas las mediciones se muestran en el Anexo 03.

Entre las 4 enzimas mutantes el K_m y K_{cat} varió de 1,7 y 62,3 veces respectivamente. La PZAsa del WT H37Rv mostró valores de 1,2 Mm para el K_m y $740,02 \text{ min}^{-1}$ para el K_{cat} .

En comparación al K_{cat} del WT, la mutación T515C que generó el cambio de aminoácido L172P, el cual se halló más **alejado de uno de los residuos del sitio activo (C138)** (Figura 24 del anexo 01) mostró un valor extremadamente bajo ($11,0 \text{ min}^{-1}$) y el de la mutación G185A que generó el cambio de aminoácido P62L, la cual se halla en el loop de la región de unión al metal (Tabla 02) (Figura 22 del anexo 01) mostró un valor menor ($351,28 \text{ min}^{-1}$). Las mutantes G373T y G511A que originaron los cambios de aminoácidos V125F y A171T, mostraron valores de $564,76$ y $401,18 \text{ min}^{-1}$ respectivamente.

La eficiencia enzimática (E_{ff}) de las PZAsas mutantes fue variada entre sí y en general, todas mostraron valores menores a lo encontrado para la PZAsa WT H37Rv ($624,11 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$), tres de ellas (G373T, G511A y G185A que en la proteína dieron lugar a los cambios de aminoácidos V125F, A171T y P62L respectivamente) mostraron niveles regularmente menores ($440,6 - 213,49 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) mas una de ellas (T515C

que originó el cambio de aminoácido L172P) mostró un muy bajo nivel de eficiencia ($8,24 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$). La más alta eficiencia enzimática la mostró la PZAsa que albergó la mutación G373T.

La variación de la eficiencia enzimática (K_{cat}/K_m) fue principalmente debida a los diferencias significativas en los valores del K_{cat} , por ende, no se afectó la afinidad de la enzima mutante (PZAsa) por el sustrato (PZA).

4.3. Actividad enzimática de PZAsas recombinantes

La actividad enzimática de las PZAsas recombinantes se muestra en la Tabla 06 y los datos completos de todas las mediciones se muestran en el anexo 03.

A diferencia de la actividad enzimática de la PZAsa WT H37Rv; donde 1 *mg PZAsa* produjo 27,70 $\mu\text{mol POA}$ durante 1 minuto, todas las enzimas mutantes mostraron valores menores a esta, una de ellas (Cambio de aminoácido: L172P) mostró una pérdida total de actividad enzimática; 1 *mg PZAsa* produjo 0,51 $\mu\text{mol POA}$ durante 1 minuto, y las tres restantes (Cambios de aminoácidos: P62L, V125F y A171T), bajos niveles (12,94, 20,45 y 15,91 respectivamente).

Tabla 06. Parámetros cinéticos y actividad enzimática de PZAsas recombinantes de Mtb.

Cambio de AA	<i>K_m</i> mM		<i>K_{cat}</i> <i>min</i> ⁻¹		<i>Eff</i> <i>mM</i> ⁻¹ <i>min</i> ⁻¹		Actividad enzimática $\mu\text{mol POA} * \text{min}^{-1}$ $* \text{mg}^{-1} \text{PZAsa}$	
	Media	95% CI (+/-)	Media	95% CI (+/-)	Media	95% CI (+/-)	Media	95% CI (+/-)
V125F	1,33	0,29	564,76	56,26	440,6	78,7	20,45	1,96
L172P	1,05	0,38	11,00	1,73	8,24	2,34	0,51	0,06
A171T	1,32	0,21	401,18	79,67	303,82	44,08	15,91	3,05
P62L	1,79	0,62	351,28	37,44	213,49	50,29	12,94	1,39
Wild type	1,20	0,13	740,016	78,32	624,11	106,56	27,7	3,93

AA, aminoácido; 95 % CI (+/-), Intervalo de confianza al 95 %.

4.4. Influencia de las mutaciones del gen *pncA* sobre los parámetros cinéticos y actividad enzimática de PZAsas recombinantes

4.4.1. Influencia de las mutaciones del gen *pncA* sobre el K_m de PZAsas recombinantes

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confiabilidad del 95 %, **estadísticamente, no se evidencian diferencias significativas ($p > 0,05$)** entre los valores de K_m obtenidos de las distintas PZAsas recombinantes incluso respecto al WT H37Rv. Por ello no fue necesario el desarrollo de una prueba Post – hoc de comparación (Análisis de Tukey). (Tabla 07) (Figura 19)

En general, los cambios de aminoácidos producidos por las mutaciones en el gen *pncA* dentro de las PZAsas recombinantes estadísticamente, no afectaron la afinidad de ésta por el sustrato (PZA). Es decir, no hubo influencia alguna de las mutaciones sobre los K_m , a pesar de que una de ellas (G185A que dió lugar al cambio de aminoácido P62L) se halla menos alejada a un aminoácido del sitio de unión al metal (H57). (Figura 26 del anexo 01)

En la figura 19 se presenta un gráfico de cajas en el cual se comparan cinco categorías de una variable (Cambio de aminoácido producido por la mutación en el gen *pncA*); de acuerdo a ello se muestra la distribución de valores correspondientes al parámetro cinético K_m de las PZAsas recombinantes. Se observa aquí que a la misma altura del límite superior (1,30 mM) e inferior (1,02 mM) de la PZAsa WT H37Rv se hallan todos los demás intervalos de datos (Cajas y/o límites superiores e inferiores) de las PZAsas mutantes (A171T,

L172P, P62L y V125F), ello da razón a la ausencia de diferencias significativas ($p>0,05$) entre todos los valores de K_m de PZAsas recombinantes.

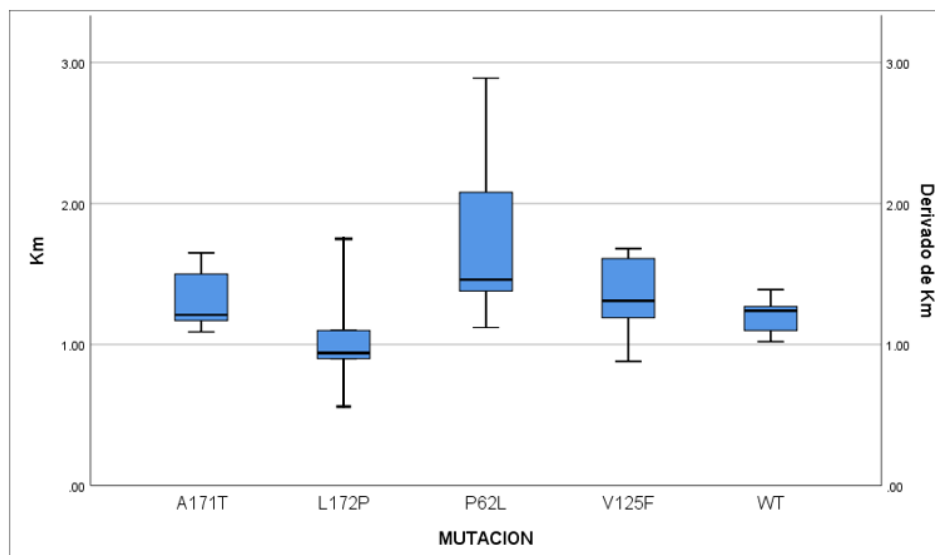


Figura 19. Gráfico de cajas de valores de K_m de PZAsas recombinantes de acuerdo a los cambios de aminoácidos producidos por las mutaciones en el gen *pncA*.

Fuente: Resultados obtenidos.

4.4.2. Influencia de las mutaciones del gen *pncA* sobre el K_{cat} de PZAsas recombinantes

Mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de confiabilidad del 95 %, estadísticamente **se evidenciaron diferencias significativas** ($p<0,05$) entre los valores de K_{cat} de todas las PZAsas recombinantes. (Tabla 07)

Al desarrollarse el análisis post – hoc de comparación, Tukey; se vio que todos los K_{cat} de las PZAsas mutantes son significativamente diferentes al K_{cat} de la PZAsa WT H37Rv (**$p<0.05$**), y mediante la agrupación de subconjuntos se mostró que todas las PZAsas mutantes poseen valores de K_{cat} inferiores a la PZAsa WT H37Rv, razón por la cual se hallan en grupos distintos a esta

(Tabla 07), por lo tanto se infiere que todos los cambios de aminoácidos producidos por las mutaciones en el gen *pncA* afectaron negativamente los K_{cat} de las PZAsas mutantes. (Tabla 07)

En la figura 20 se muestra un gráfico de cajas en el que se ve claramente la gran diferencia de valores entre todos los K_{cat} de las PZAsas recombinantes (mutantes y WT H37Rv), ello explica las diferencias significativas halladas en el ANOVA de los K_{cat} . Además, se evidencia que a la altura del límite superior ($826,29 \text{ min}^{-1}$) e inferior ($671,59 \text{ min}^{-1}$) de los valores de K_{cat} de la PZAsa WT H37Rv no se halla ningún valor de K_{cat} de alguna PZAsa mutante, esto da razón a las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las PZAsas mutantes y la PZAsa WT H37Rv según el análisis de Tukey y la diferencia de valores, su respectiva agrupación de subconjuntos. (Tabla 07)

Una de las mutaciones en el gen *pncA* (T515C) cuya traducción generó el cambio de aminoácido L172P, afectó perjudicialmente el K_{cat} de la enzima ya que 1 mol de ésta metabolizó 11 moléculas de PZA en comparación de las 740,016 moléculas de PZA metabolizadas por 1 mol de la PZAsa WT H37Rv durante 1 minuto (enzima saturada con el sustrato), en la figura 20 se evidencia de forma dinámica esta gran diferencia. (Tabla 06)

Estadísticamente los K_{cat} de dos PZAsas mutantes (Con cambios de aminoácidos A171T y P62L) fueron afectados de forma similar entre sí, ya que el límite superior ($401,09 \text{ min}^{-1}$) e inferior ($298,08 \text{ min}^{-1}$) de la PZAsa con el cambio de aminoácido P62L se halla a una altura un poco inferior a la mediana ($432,91 \text{ min}^{-1}$) y similar al límite inferior ($282,69 \text{ min}^{-1}$) de la PZAsa con el

cambio de aminoácido A171T, es decir, los valores del K_{cat} de la PZAsa con el cambio de aminoácido P62L son similares al 50 % de los valores de K_{cat} de la PZAsa con el cambio de aminoácido A171T.

Solo la mutación G373T (V125F) afectó de forma moderada el K_{cat} de la enzima, los valores de la misma se hallan un poco cercanos al límite inferior de la PZAsa WT H37Rv. (Figura 20)

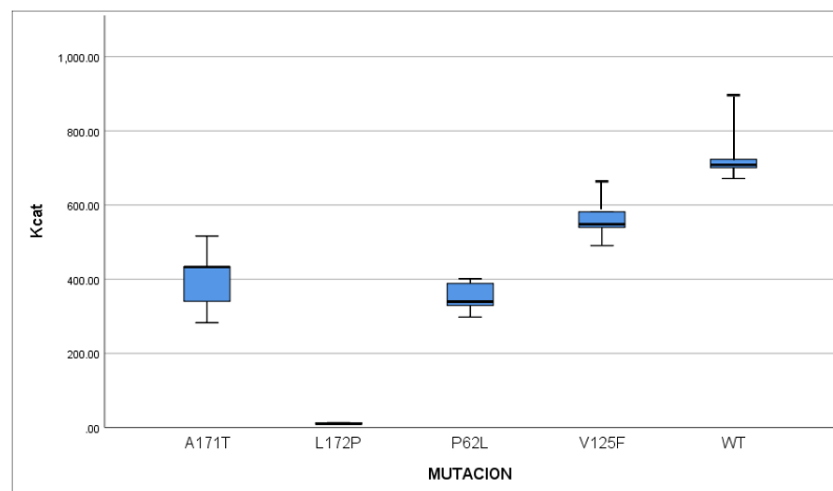


Figura 20. Gráfico de cajas de valores de K_{cat} de PZAsas recombinantes de acuerdo a los cambios de aminoácidos producidos por las mutaciones en el gen *pncA*.

Fuente: Resultados obtenidos.

4.4.3. Influencia de las mutaciones del gen *pncA* sobre el E_{ff} de PZAsas recombinantes

Al igual que los valores de K_{cat} , el Análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95 %, **mostró diferencias significativas** ($p < 0,05$) entre todos los valores de E_{ff} , definiéndose así que todos los cambios de aminoácidos producidos por las mutaciones en el gen *pncA* influenciaron sobre los valores E_{ff} de todas las PZAsas recombinantes. (Tabla 07)

Al desarrollarse el análisis de comparación de Tukey se evidenció que todos los E_{ff} de las PZAsas mutantes son significativamente diferentes e inferiores al E_{ff} de la PZAsa WT H37Rv ($p < 0,05$). (Tabla 07)

La figura 21 evidencia la diferencia de todos los valores de E_{ff} de todas las PZAsas recombinantes, ello congruencia con lo hallado en el ANOVA. También se muestra que la mayor parte de los valores de E_{ff} de las PZAsas mutantes son inferiores al de la PZAsa WT H37Rv, solo el límite superior ($560,03 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) de la PZAsa con el cambio de aminoácido V125F se halla a la altura del 25 % de los valores de E_{ff} de la PZAsa WT H37Rv, los demás poseen valores mucho más distantes a ello, esto se correlaciona con la significancia de los del análisis de Tukey de las PZAsas mutantes respecto a la PZAsa WT H37Rv ($p < 0,05$) y su respectiva agrupación de subconjuntos. (Tabla 07)

De acuerdo a lo hallado en la Tabla 07, la PZAsa recombinante que albergó en su estructura el cambio de aminoácido V125F fue mucho más eficiente a las demás. En resumen, la agrupación de subconjuntos, en términos de eficiencia enzimática de las PZAsas mutantes muestra esta orientación: V125F > A171T > P62L > L172P.

El cambio del aminoácido (P62L) que se halla menos alejado a uno de los aminoácidos de la región de unión al metal (H57) afectó moderadamente el E_{ff} de la enzima. (Tabla 07)

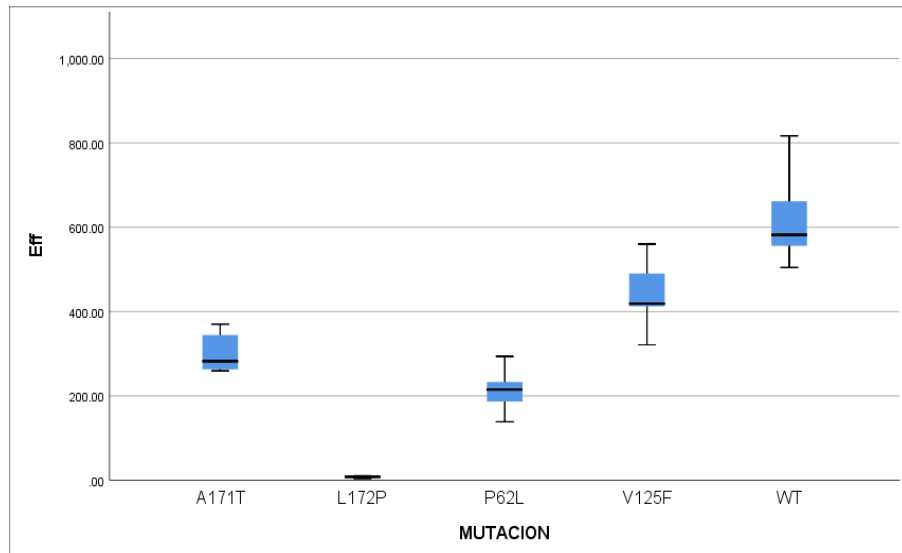


Figura 21. Gráfico de cajas de valores de E_{ff} de PZAsas recombinantes de acuerdo a los cambios de aminoácidos producidos por las mutaciones en el gen *pncA*.

Fuente: Resultados Obtenidos.

4.5. Influencia de las mutaciones del gen *pncA* sobre la actividad enzimática de PZAsas recombinantes

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) y con un nivel de significancia del 95 % se evidenció diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todos los valores de actividad enzimática de las PZAsas recombinantes. Las mutaciones del gen *pncA* sí influenciaron sobre los valores de actividad enzimática. (Tabla 07) El gráfico de cajas de la figura 22 muestra de forma dinámica estos resultados, en el mismo se ve la diferencia de datos en los valores de actividad enzimática de las distintas PZAsas recombinantes (mutantes y WT H37Rv).

El análisis de comparación de Tukey mostró estadísticamente las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todos los valores de actividad enzimática de las PZAsas mutantes respecto a la PZAsa WT H37Rv. La diferencia de subconjuntos de las mutantes respecto al WT H37Rv muestra que las primeras poseen valores estadísticamente inferiores a este último, por ellos fueron categorizadas en grupos inferiores. (Figura 22 y Tabla 07)

Tabla 07. Análisis estadístico de Tukey y agrupación de subconjuntos de la influencia de las mutaciones en el gen *pncA* sobre los parámetros cinéticos y actividad enzimática de PZAsas recombinantes.

Cambio de AA	<i>K_m</i> mM	<i>K_{cat}</i> <i>min</i> ⁻¹		<i>Eff</i> <i>mM</i> ⁻¹ <i>min</i> ⁻¹		Actividad enzimática $\mu\text{mol POA} * \text{min}^{-1} *$ $\text{mg}^{-1} \text{PZAsa}$	
	Media	Media	Subagr.	Media	Subagr.	Media	Subagr.
V125F	1,33 ^{NS}	564,76*	b	440,6*	b	20,45*	b
L172P	1,05 ^{NS}	11*	d	8,24*	d	0,51*	d
A171T	1,32 ^{NS}	401,18*	c	303,82*	b,c	15,91*	b,c
P62L	1,79 ^{NS}	351,28*	c	213,49*	c	12,94*	c
Wild type	1,2	740,016	a	624,11	a	27,7	a

AA, Aminoácidos; Subagr., Subagrupación homogénea; * ($p < 0,05$) Estadísticamente la PZAsa mutante es diferente a la PZAsa wild type.

El gráfico de cajas de la figura 22 muestra de forma dinámica la distribución espacial de los valores de actividad enzimática de las PZAsas recombinantes y evidencia claramente la gran diferencia de valores entre las PZAsas mutantes y la PZAsa WT H37Rv, esto explica las diferencias significativas halladas en el ANOVA y en el análisis de comparación de Tukey.

La actividad enzimática de una de las mutantes (L172P) cuyo cambio de aminoácido estuvo más alejado de los residuos del sitio catalítico fue extremadamente inferior al hallado para la PZAsa WT H37Rv, ya que 1 mg de la PZAsa mutante (L172P) produjo **0,51 $\mu\text{mol de POA}$** en 1 minuto en comparación a los **27,70 $\mu\text{mol de POA}$** que produjo la PZAsa WT H37Rv durante 1 minuto. Este cambio de aminoácido afectó de forma considerable la actividad de la enzima.

Una de las mutantes (P62L) menos alejada a uno de los residuos del sitio de unión al metal (H57) mostró una actividad inferior al de la PZAsa WT H37Rv, ya que 1 mg de ésta metabolizó 12,94 $\mu\text{mol de POA}$ en 1 minuto. (Tabla 07)

Las PZAsas mutantes (A171T y V125F) que albergaron cambios de aminoácidos distantes de las regiones catalíticas mostraron actividades enzimáticas menores al del wild type. (Tabla 07)

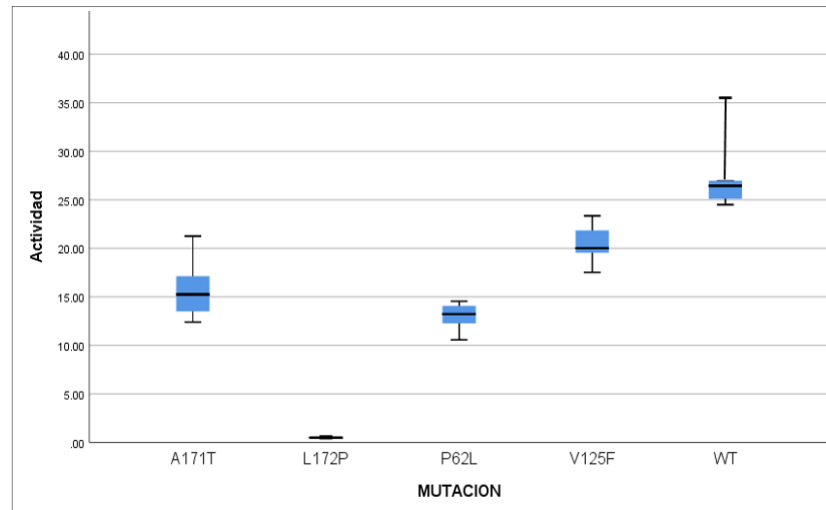


Figura 22. Gráfico de cajas de valores de actividad enzimática de PZAsas recombinantes de acuerdo a los cambios de aminoácidos producidos por las mutaciones en el gen *pncA*.

Fuente: Resultados Obtenidos

V. DISCUSIONES

En los últimos años, más de un estudio ha demostrado que las mutaciones en el gen *pncA*, producen la disminución y pérdida de la actividad enzimática de la PZAsa, debido a sus modificaciones estructurales y dinámicas. Las mutaciones que generan cambios de aminoácidos más cercanos o en las posiciones de los residuos del sitio activo (D8, K96 y C138) y de unión al metal (D49, H51, H57 y H71) alteran de forma perjudicial la actividad enzimática. Mucho depende de la relación de estas con los residuos catalíticos. (Zhang et al., 2008; Suzuki et al., 2002; Lemaitre et al., 2001; Doustdar et al., 2015; Sheen et al., 2007; Sheen et al., 2009; Yoon et al., 2014)

En este estudio se investigó la influencia de las mutaciones del gen *pncA* sobre los parámetros cinéticos (K_m , K_{cat} y E_{ff}) y actividad enzimática de PZAsas recombinantes de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogoresistentes (MDR). Las mutaciones con las que se trabajó se caracterizaron principalmente por generar cambios de aminoácidos que se hallaron alejados de los sitios catalíticos de la enzima.

A diferencia de algunos pocos estudios que reportaron actividades enzimáticas de PZAsas; con mutaciones en el gen *pncA*, al mismo nivel de la PZAsa WT H37Rv (Lemaitre et al., 2001; Yoon et al., 2014), todas las mutaciones con las que se trabajó (G373T, G511A, T515C y G185A) generaron cambios de aminoácidos (V125F, A171T, L172P y P62L respectivamente) que influyeron de forma negativa y a diferentes niveles sobre la actividad enzimática y algunos parámetros cinéticos (K_{cat} y E_{ff}) de la PZAsa mas no sobre la afinidad de la enzima (PZAsa) por el sustrato (PZA) (K_m).

El análisis estadístico de los valores de K_{cat} , E_{ff} y actividad enzimática de las PZAsas con cambios de aminoácidos mostró este orden: WT H37Rv > V125F > A171T > P62L > L172P.

Se afirma que cuando los cambios de aminoácido en la PZAsa no afectan directamente el sitio activo (D8, K96 y C138), influyen sobre el K_{cat} pero no notablemente sobre el K_m . La alta variabilidad del K_{cat} comparado con el K_m es congruente con la ubicación de los cambios de aminoácidos generados por las mutaciones con las que se trabajó, por ello no se esperó que este último fuese altamente afectado. (Sheen et al., 2007; Sheen et al., 2009)

En resumen, esta podría ser la razón los resultados hallados ya que ninguna de las mutaciones con las que se trabajó se halló cercana a alguno de estos residuos.

Fenotípicamente, de todas las cepas de *M. tuberculosis* con mutaciones en el gen *pncA*, además de ser MDR, se conoció que solo una (con la mutación G185A en el gen *pncA*, produjo el cambio de aminoácido P62L) era también altamente resistente a PZA.

Las mutaciones en el gen *pncA* influyen sobre los parámetros cinéticos y actividad enzimática de la PZAsa, por el efecto que produce el cambio de aminoácido sobre la estructura – función de la enzima. (Yoon, 2014; Sheen, 2009; Lemaitre, 2001; Doustdar, 2015) Pueden desde producir una potencial perturbación del sitio activo o disrupción del embalaje del núcleo proteico hasta un polipéptido truncado. (Du et al., 2001; Scorpio et al., 1996)

Al compararse con la PZAsa WT H37Rv se evidenció que la mutación T515C, que produjo el cambio de aminoácido L172P, (Tabla 06) fue la que más perjudicó la funcionalidad de la enzima (K_{cat} y E_{ff} y actividad de la PZAsa), ya que mientras que 1 mg de esta, durante 1 minuto produjo 0,51 μmol de POA, bajo la misma condición la PZAsa WT H37Rv produjo 27,70 μmol de POA. Esta podría ser la razón por la cual fenotípicamente la cepa, al no liberar suficiente cantidad de POA, es negativa en el test de Wayne.

Acorde a la estructura resuelta por Petrella et al. (2011) esta mutación genera un cambio de aminoácido que se halla en la $\alpha 4$ – hélice y a más de 10 Å del sitio activo y 20 Å del MBS (Tabla 02 y 05), más de acuerdo a la figura 20 del anexo 01, ésta se halla paralela a la cadena que contiene el residuo C138, cuya función es crucial en la actividad de la enzima. (Petrella et al., 2011; Du et al., 2001)

Además la naturaleza de la mutación L172P implica el reemplazo de una leucina por una prolina, ambos aminoácidos son apolares, sin embargo, sus grupos R son distintos, en la leucina es una cadena ramificada y en la prolina es una cadena lateral cíclica que además de ser muy rígida contiene al grupo amino, por ende, es probable que al darse este cambio en una cadena α se esté originando distorsiones, quiebre e irregularidades en el ángulo de torsión de la hélice, y con ello la desestabilización y alteración de la estructura de la proteína, la cual se traduce en la pérdida funcionalidad observada (Sreevatsan et al., 1997; Yoon et al., 2014). (Figura 20, 21, 22 y Tabla 07)

Respecto a este cambio de aminoácido (L172P) además de ser reportado en varios países y a la vez, estar asociado a resistencia a PZA (Barco et al., 2006; Denkin et al., 2005; Hirano et al., 1998; Jureen et al., 2008) nuestros resultados confirman los hallazgos reportados por varios estudios donde se ha evidenciado la pérdida de la actividad de la PZAsa cuando un determinado aminoácido es reemplazado por prolina (Lemaitre et al., 2001; Sheen et al., 2007; Sheen et al., 2009; Yoon et al., 2014).

Otra mutación que mostró un notorio efecto sobre los parámetros cinéticos (K_{cat} y E_{ff}) y actividad enzimática de la PZAsa, fue G185A el cual dió origen al cambio de aminoácido P62L en el loop 4 de la PZAsa (Figura 26 del anexo 01) (Zimic et al., 2010); esta mutación y su respectivo cambio de aminoácido en esta posición, al igual que previos reportes (Miyagi et al., 2004; Tracevska et al., 2004) proviene de una cepa altamente resistente a PZA y con actividad Wayne negativa, la cual es ocasionada por la baja actividad de la enzima, debido a que 1 mg de esta y durante 1 minuto produce 12,94 μmol de POA lo cual es menos de la mitad del valor de actividad enzimática de la PZAsa WT H37Rv (Tabla 06).

Este cambio de aminoácido (P62L) de acuerdo a la figura 26 del anexo 01 y según los reportes de Zimic et al. (2010) y Petrella et al. (2011) se halla dentro del mismo loop de los residuos del sitio de unión al metal y del Triptófano 68 el cual además de ser muy conservado en todas las PZAsas bacterianas participa junto a la Fenilalanina 13 en la unión al sustrato (PZA) (Lemaitre et al., 2001; Petrella et al., 2011; Doustdar et al., 2015), también su naturaleza implica un reemplazo de una prolina por una leucina, ambos a pesar de ser apolares generan distintos efectos debido a sus distintas cadenas R, mientras la prolina debido a su rigidez produce curvas en estructuras secundarias regulares, la leucina por su cadena R ramificada no confiere la misma rigidez, por lo tanto, al igual que un previo estudio (Lemaitre et al., 2001) que implicó cambios de aminoácidos con prolina en posiciones cercanas, se puede suponer que la disminución de los valores de actividad enzimática y parámetros cinéticos resulta de un cambio más global en la conformación de la estructura de la PZAsa. En este caso, es muy probable que la resistencia a PZA por parte de la cepa que albergó la mutación G185A en el gen *pncA*, la cual dió lugar al cambio de aminoácido P62L, sea ocasionada principalmente por descenso de la actividad enzimática y algunos parámetros cinéticos (K_{cat} y E_{ff}).

El cambio de aminoácido A171T producido por la mutación G511A, se halla en la $\alpha 4$ – hélice (Figura 25 del anexo 01) (Zimic et al., 2010); esta mutación a diferencia de algunos estudios que también la reportaron (Mestdagh et al., 1999; Portugal et al., 2003) proviene de una cepa Wayne positiva. En esta situación a comparación de la PZAsa WT H37Rv (Tabla 06) el cambio de aminoácido no afectó perjudicialmente la funcionalidad de la enzima (K_{cat} : $401,18 \text{ min}^{-1}$, E_{ff} : $303,82 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ y actividad enzimática $15,91 \text{ } \mu\text{mol POA} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1}\text{PZAsa}$) como en los casos anteriores. Sin embargo, ambos aminoácidos poseen cadenas R ramificadas que estructuralmente no alterarían mucho la estructura de la hélice como lo implicaría un reemplazo por prolina (Scorpio et al., 1997) sin embargo, su distinta naturaleza química (alanina un residuo apolar y la treonina un residuo polar sin carga) hace que se den ciertos cambios que podrían estar influyendo en la actividad enzimática lo cual fue reflejado en el moderado efecto sobre los valores de los parámetros cinéticos (K_{cat} y E_{ff}) y actividad enzimática en comparación de la PZAsa WT H37Rv. En la misma posición, un cambio de alanina por ácido glutámico, un aminoácido que al igual que treonina es polar sin carga, la actividad Wayne es negativa; similar es el caso reportado por Scorpio et al. (1997) en el cual se señala un cambio de aminoácido en esta posición de una alanina por una prolina (Rodrigues et al., 2005; Scorpio et al., 1997).

La mutación G373T que dio lugar al cambio de aminoácido V125F en el Loop 6 de la PZAsa (Figura 23) (Anexo 01) (Zimic et al., 2010) fue la que menos influyó sobre los parámetros cinéticos (K_{cat} : $564,76 \text{ min}^{-1}$ y E_{ff} : $440,60 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$) y actividad enzimática ($20,45 \text{ } \mu\text{mol POA} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1}\text{PZAsa}$) en comparación a la PZAsa WT H37Rv, pero sus valores en general, fueron la mitad de esta última (Tabla 02). Esta mutación a diferencia de algunos estudios que también la reportaron (Jureen et al., 2008; McCammon et al., 2005) provino de una cepa con actividad Wayne positiva.

El resultado hallado podría explicarse debido a que, a diferencia de las demás mutaciones; el cambio de aminoácido V125F que fue originado por la mutación G373T, de acuerdo a la figura 23 del anexo 01, Zimic et al. (2010) y la Tabla 02 se ubica en una posición (Loop 6) demasiado alejada de los sitios catalíticos y de las cadenas en las que estos se posicionan; además de ello, la naturaleza química y el grupo R de la valina y fenilalanina es similar, debido a que ambos son aminoácidos neutros apolares y poseen grupos R de hidrocarburos.

Una caracterización computacional permitiría dilucidar mucho mejor la influencia de las mutaciones en el gen *pncA* sobre la PZAsa, ya que además de todo lo mencionado con anterioridad, podría estar dándose una alteración de forma global sobre los sitios catalíticos como lo reportado por Doustdar et al. (2015) en donde además de la mutación, el volumen del pocket de la PZAsa con diferentes cambios de aminoácido (A143T, L151S, A143T/T168A/E173K), fueron mucho más pequeñas al de la PZAsa WT H37Rv y a la vez la estructura del sitio activo y de unión al metal, mostraron mucho más flexibilidad; en el primer caso se dificultó la conversión de la PZA en POA, lo cual dio lugar al característico descenso de los valores K_m y K_{cat} .

El test de Wayne es un método cualitativo que pone en manifiesto la presencia de POA en el medio extracelular (OPS, 1986). Sus resultados e interpretación dependen del tamaño de inóculo y de la experiencia del operador respectivamente. Este método permite determinar la funcionalidad de la PZAsa en cuanto a la producción de POA y con ello determinar de manera cualitativa si una cepa es resistente o sensible a PZA. Actualmente la OMS sugiere el empleo de ensayos de Bactec MGIT 960.

Se ha considerado a la actividad enzimática como un predictor proximal de la resistencia a PZA, debido a que varios estudios han demostrado correlación entre la pérdida de la actividad de la PZAsa y la resistencia a PZA en Mtb, (Konno, 1966; Sheen, 2009; McClatchy, 1981; Butler, 1983) y al igual que ello, la eficiencia enzimática (E_{ff}) ha sido asociado con el nivel de resistencia a PZA (MIC – PZA, porcentaje de crecimiento en Bactec y actividad de wayne), ya que la articulación de la velocidad de formación del producto depende de la habilidad de la enzima para unirse al sustrato ($1/K_m$) y de la velocidad con la cual el complejo enzima – sustrato forma el producto (K_{cat}) (Sheen et al., 2009).

El E_{ff} es el parámetro que mejor se asemeja a todas las velocidades de producción de POA.

En otro estudio donde se midió la actividad enzimática de la PZAsa de *P. horikoshii* se reportó una actividad enzimática de $17,3 \mu\text{mol POA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ que es similar a lo encontrado en nuestro estudio para la PZAsa WT H37Rv (Mtb H37Rv) (Tabla 07); la diferencia de valores probablemente es debida a la similaridad de la secuencia de aminoácidos (37 % idéntica).

Sheen et al. (2009) reportó la actividad enzimática de la PZAsa de Mtb H37Rv se muestra una actividad enzimática de $38,4 \mu\text{mol POA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{proteína}$, un K_m de 1,24 mM, un K_{cat} de $1005,41 \text{ min}^{-1}$ y una E_{ff} de 806,6 que son similares a lo hallado por en la presente investigación y similar es el caso de la investigación reportada por Petrella et al. (2011). (Tabla 07) En contraste a ello otro estudio (Lemaitre et al., 2001) estimó los valores de actividad enzimática de la PZAsa WT H37Rv mucho más baja ($0,022 \mu\text{mol POA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{proteína}$) que lo hallado en el presente estudio, ello pudo deberse al uso de enzima parcialmente purificada como también al largo tiempo de incubación (4 horas), en la medición de la actividad enzimática, en comparación a lo usado en el presente estudio (1 minuto). La velocidad de formación del producto decae con el tiempo, un tiempo de

incubación más largo que el periodo de linealidad (3 minutos cuando se usa 3 μ M de enzima pura) subestima la actividad enzimática (Sheen et al., 2009).

VI. CONCLUSIONES

- A) Los parámetros cinéticos de las PZAsas recombinantes poseen valores que, para el K_m oscilan entre 1,05 – 1,79 mM, para el K_{cat} oscilan entre 11 – 740,016 min^{-1} , para el E_{ff} oscilan entre 8,24 – 624,11 $mM^{-1}min^{-1}$ y los de actividad enzimática oscilan entre 0,51 – 27,70 $\mu mol POA \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1} prote\u00edna$; siendo los m\u00e1s altos para los correspondientes a la PZAsa WT H37Rv (*M. tuberculosis* H37Rv).
- B) Las mutaciones en el gen *pncA* (G373T, T515C, G511A y G185A) se asociaron ($p < 0,05$) a los bajos valores de K_{cat} (564,76 – 11 min^{-1}) y E_{ff} (8,24 – 440,6 $mM^{-1}min^{-1}$) de las PZAsas mutantes a comparaci\u00f3n de la PZAsa WT H37Rv (740,016 min^{-1} y 624,11 $mM^{-1}min^{-1}$).
- C) Las mutaciones en el gen *pncA* (G373T, T515C, G511A y G185A) se asociaron ($p < 0,05$) a los bajos valores de actividad enzim\u00e1tica (20,45 a 0,51 $\mu mol POA * min^{-1} * mg^{-1} PZAsa$) de las PZAsas mutantes a comparaci\u00f3n de la actividad enzim\u00e1tica de la PZAsa WT H37Rv (27,70 $\mu mol POA * min^{-1} * mg^{-1} PZAsa$).

VII. RECOMENDACIONES

- A) De forma complementaria se sugiere el desarrollo de una caracterización computacional que permita la evaluación de los efectos fisicoquímicos de los cambios de aminoácidos producidos por las mutaciones en el gen *pncA*.
- B) Medir la actividad enzimática de la PZAsa recombinantes durante la misma semana en la que fue producida, asimismo, evitar el constante descongelamiento de la misma.
- C) Verificar la solubilidad e insolubilidad de la proteína en la variedad de *E. coli* mediante SDS – PAGE por comparación de alícuotas no inducidas, inducidas, fracciones solubles e insolubles de las PZAsas mutantes y PZAsa WT H37Rv.
- D) Durante el proceso de clonamiento molecular, y para la digestión enzimática emplear las dos enzimas de restricción bajo una misma concentración en términos de unidades.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barco P., Cardoso R., Hirata R., Leite C., Paandolgi J., Sato D. & Hirata M. (2006). *pncA* mutations in pyrazinamide – resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the southeast region of Brazil. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 50, 930 – 935.
- BD. (2012). BD Middlebrook 7H10 Agar. *Instrucciones de uso – medios en placa listos para usar*. PA – 254520.07.
- Biolabs Inc. (2018). *E. coli* Lemo21(DE3). A T7 RNA Polymerase – based protein overexpression platform for routine and difficult targets. *Application Note*.
- Boshoff H., y Mizrahi V. (1998). Purification, gene cloning, targeted Knochout, Overexpression and Biochemical Characterization of the major Pirazinamidase from *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 180 (22), 5809 – 5814.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248 – 254.
- Butler W. y Kilburn J. (1983). Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide and its relationship to pyrazinamidase activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 24 (4), 600 – 601.
- Checa A., et al. (2017). Método: Extracción de ADN plasmídico (Lisis Alcalina modificada). *Conogasi*. Recuperado de: <http://conogasi.org/articulos/metodo-extraccion-de-adn-plasmidico-lisis-alcalina-modificado/print/>

Cheng S., Thibert L., Sanchez T., Heifets L., & Zhang Y. (2000). *pncA* mutations as major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Spread of a monoresistant strain in Quebec, Canadá. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44 (3), 528 – 532.

DB. (2012). *Mycobacterium tuberculosis*. Instituto nacional de seguridad e higiene de trabajo. Volumen 12.

Denkin S., Volokhov D., Chizhikov V. & Zhang Y. (2005). Microarray – based *pncA* genotyping of pyrazinamide resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 1127 – 1131.

Doustdar F., Pazhang M., Mehrnejad F., Safarzadeh M., Rabiei D., Chaparzadeh N., & Mir – Derikvand M. (2015). Biochemical Characterization and computational Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Pirazinamidase in some Pyrazinamide – Resistant isolates of Iran. *Protein J*.

Du X., Wang W., Kim R., Yakota H., Nguyen H. & Kim S. (2001). Crystal structure and mechanism of catalysis of a pirazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry*, 40, 14166 – 14172.

EHU. (2018). Cinética enzimática. recuperado de:
<http://www.ehu.eus/biomoleculas/enzimas/enz3.htm#e>

Gonzales J. & Bueno R. (2012). Enzimas de restricción. En A. Salazar, A. Sandoval & J. Armendariz. (Editor), *Biología Molecular, Fundamentos y aplicaciones en Ciencias de la Salud* (pp. 120 – 126). Guadalajara, México: Editorial McGrawHill

- Gonzales J. (2014). Microbiología de la tuberculosis. *Seminario de la fundación española de reumatología*, 15 (1), 25 – 33.
- Green M. y Sambroock J. (2012). *Molecular Cloning*. Texas, Estados Unidos. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Harvard Medical School. (2018). Plasmid: Vector pET28a. Recuperado de: <https://plasmid.med.harvard.edu/PLASMID/GetVectorDetail.do?vectorid=319>
- Hirano K., Takahashi M., Kazumi Y. & Abe C. (1998). Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and lung disease*, 78 (2), 117 – 122.
- Junaid M., Tahir M., Iqbal S. & Wei D. (2018). Insights into the mechanism of pyrazinamide resistance of three pyrazinamidase mutants N11K, P69T and D126N. *Journal of chemical information and modeling*, pp. 2 – 35.
- Jureen P., Werngren J., Toro J. & Hoffner S. (2008). Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 52 (5), 1852 – 1854.
- Kaufmann SHE. (2002). Immune response to tuberculosis: Learning from natural infection for rational vaccine design. *WHO*; 4th World Congress on TB 2002. Washington, DC; USA; June 3-5: 10
- Knechel NA. (2009). Tuberculosis: Pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Revista Crit Care Nurse*, 29 (2), 34-43.

- Konno K., Feldmann F. & McDermott W. (1966). Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *American Rev. Respiratory disease*, 95, 461 – 469.
- Lemaitre N., Sougakoff W., Truffot – Pernot C. & Jarlier V. (1999). Characterization of new mutations in pyrazinamide – resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of pyrazinamidase *pncA*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43 (7), 1761 – 1763.
- Lemaitre N., Callebaut I., Frenois F., Jaarlier V. & Sougakoff W. (2001). Study of the structure – activity relationship for the Pyrazinamidase (*PncA*) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J*, 353, 453 – 458.
- McCammon M., Gillette J., Thomas D., Ramaswamy S., Rosas I., Graviss A. & Quitugua T. (2005). Detection by denaturing gradient gen electrophoresis of *pncA* mutations associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United States – Mexico border región. *Antimicrobial agents and chomotherapy*, 49 (6), 2210 – 2217.
- McClatchy J., Tsang A. & Cernich M. (1981). Use of pyrazinamidase activity in *Mycobacterium tuberculosis* as a rapid method for determination of pyrazinamide susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 20 (4), 556 – 557.
- McCune, R. Tompsett R. & McDermott W. (1956). The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique: II. The conversion of tuberculous infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug. *J. Exp. Med*, 104, 763 – 802.

- Mestdagh, M., Fonteyne L., Realini L., Rossau R., Jannes G., Mijs W. & Eeckhout E. (1999) Relationship between pyrazinamide resistance, loss of pyrazinamidase activity, and mutations in the *pncA* locus in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 43 (9), 2317 – 2319.
- Miyagi C., Yamane N., Yogesh B., Ano H. & Takashima T. (2004). Genetic and phenotypic characterization of pyrazinamide – resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Japan. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 48, 111 – 116.
- Murray R., Bender D., Botham K., Kenelly P., Rodwell V. & Weil P. (2010). *HARPER, Bioquímica ilustrada*. Mexico. Editorial McGraw – Hill Interamericana Editores.
- Nelson D. L. & Cox M. (2005). *Lenhinger. Principles of biochemistry*. Cuarta edición. Barcelona, España. Editorial Omega.
- Njire M., Tan Y., Mugweru J., Wang C., Guo J., Yew W. & Zhang T. (2016). Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Review and update. *Review Adv Med Sci*, 61, 63-71. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.advms.2015.09.007> 25
- OMS. (2018). Global tuberculosis report. Geneva: World Health Organization. License: CC BY – NC – SA 3.0 IGO. Recuperado de: <http://apps.who.int/iris>.
- Organización panamericana de la Salud. (1986). Manual de normas y procedimientos técnicos para la bacteriología de la tuberculosis. Parte III. Sensibilidad del *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas: Identificación de mycobacterias. *OPS/OMS*.

- Padilla E., González V., Manterola J., Perez A., Quesada M., Gordillo S. & Ausina V. (2004). Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA Mycobacteria in genotype Mycobacterium assays for identification of Mycobacterium species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains. *J Clin Microbiol*, 42 (7), 3083 – 3088.
- Petrella S., Gelus 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), 1 – 6.
- Portugal I., Barreiro L., Moniz – Pereira J. & Brum L. (2004). *pncA* mutations in pyrazinamide – resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (7), 2736 – 2738.
- Ramirez S. & Valafar F. (2015). Systematic Review of mutations in pyrazinamidase associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *AAC Journals ASM Org*, 59 (9), 5267 – 5277.
- Rasool N., Iftikhar S. & Hussain W. (2017). Structural and Quantum Mechanical Computations to elucidate the altered binding mechanism of metal and drug with pyrazinamidase from *Mycobacterium tuberculosis* due to mutagenicity. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2017.12.011>
- Ritchie C. (2012). Purificación de proteínas: Revisión exhaustiva sobre cromatografía en columna para la purificación de proteínas. Recuperado de: <http://www.labome.es/method/Protein-Purification.html>

- Rodrigues V., Telles M., Osorio M., Izquierdo P., Rosetti M. & Zaha A. (2005). Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49 (1), 444 – 446.
- Saavedra A. & Romero J. (1999). Aspectos generales sobre procesos y tecnologías de membrana (Documento 1). *Grupo de procesos de membrana*.
- Saguy M., Gillet R., Skorski P., Hermann – Le S. & Felden B. (2007). Ribosomal protein S1 influencias trans – traducción *in vitro* e *in vivo*. *Nucleic Acids Research*, 35 (7), 2368 – 2376.
- Said S., Becerril P., Molina G., Barrios H. & Vargas J. (2005). Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes. *Enfermedades emergentes*, 7 (1), 13 – 19.
- Sambrook J. & Col (1989). Cloning and transformation with plasmid vectors. En Green M. & Sambrook J. (Editores), *Molecular Cloning* (157 – 161). New York, EE. UU: Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook J, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2ed. Book1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU.; pp. 1,82-1,84.
- Sandoval A., Mena M. & Marquez A. (2012). Vectores de clonación y expresión. En Salazar A., Sandoval A. & Armendariz J. (Editores), *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en ciencias de la salud* (127 – 138). México: Editorial McGrawHill Education.

Scorpio A. & Zhang Y. (1996). Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med.*, 2, 662–667. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640557>

Scorpio A., Lindholm P., Heifets L., Gilman R., Siddiqi S., Cynamon M. & Zhang Y. (1997). Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41 (3), 540 – 543.

Skiguchi J., Nakamura T., Miyoshi – Akiyama T., Kirikae F., Kobayashi I. & Kirikae T. (2007). Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of *pncA* mutations in pyrazinamide – resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clon Microbiol*, 45, 2802 – 2907.

Segel I. H. (1975). Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. *J. Wiley & Sons*.

Sheen P. (2007). Molecular diagnosis of pyrazinamide resistance and molecular understanding of the pyrazinamide functionality in *Mycobacterium tuberculosis* (Tesis doctoral inédita). Universidad John Hopkins, Baltimore – Maryland, Estados Unidos.

Sheen P., Ferrer P., Gilman R., Lopez J., Fuentes P., Valencia E. & Zimic M. (2009). Effect of pirazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. PMC*, 89 (2),109 – 113.

- Sheen P., Lozano K., Gilman R., Valencia H., Loli S., Fuentes P., Grandjean L. & Zimic M. (2013). *PncA* gene expression and prediction factors on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 93 (5), 515 – 22.
- Sheen P., Requena D., Gushiken E., Gilman R., Antiparra R., Lucero B. & Zimic M. (2017). A multiple genome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* reveals specific novel genes and mutations associated with pyrazinamide resistance. *BMC genomics*, 18 (769).
- Shi W., Zhang X., Jiang X., Ruan H., Barry C. & Zhang Y. (2011). Pyrazinamide inhibits translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 333 (6049), 1630 – 1632.
- Simonian M., *et al.* (1999). *Short Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons
- Sreevatsan S., Pan X., Zhang Y., Kreiswirth B. & Musser J. (1997). Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41 (3), 636 – 640.
- Sun Z. & Zhang Y. (1999). Reduced pyrazinamidase and the natural resistance of *Mycobacterium kansasii* to the antituberculosis drug pyrazinamide. *Antimicrob. Agents Chemother*, 43 (3), 537 – 542.
- Suzuki Y., Suzuki A., Katsukawa C. & Oda H. (2002). Rapid detection of pyrazinamide – resistant *Mycobacterium tuberculosis* by a PCR – based in vitro system. *Journal of clinical microbiology*, 40 (2), 501 – 507.
- Tracevska T., Jansone I., Baumanis V., Nodieva A., Marga O. & Skenders G. (2004). Spectrum of *pncA* mutations in multidrug – resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Latvia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48 (8), 3209 – 3210.

- Troche R. (2010). Determinación de perfil de resistencia a la pirazinamida mediante el método de Wayne de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de pacientes con antecedentes de tratamiento previo aisladas en el laboratorio de referencia nacional de tuberculosis del INLASA en la gestión 2008 y primer semestre de la gestión 2009 (Tesis de licenciatura inédita). Universidad mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.
- UPCH. (2017). Guía de prácticas de Clonamiento de genes y expresión de proteínas por técnicas de ADN recombinante. *Facultad de ciencias y filosofía*.
- Van Cravel R., Ottenhoff T. & Van der Meer. (2002). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista Clin Microbiol*, 15 (2), 294-309.
- Vandal O., Natham C. & Ehrt S. (2009). Acid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 191 (15), 4714 – 4721.
- Wayne L. (1974). Simple Pirazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*, 109, 147 – 151.
- Whitfield M., Soeters H., Warren R., York T., Sampson S., Streicher E. & Vanrie A. (2015). A global perspective on Pyrazinamide resistance: Systematic review and metaanalysis. *PLOS one*, 1 – 16. Recuperado de: DOI:10.1371/journal.pone.0133869.
- WHO. (2013). Global Tuberculosis report. Francia. Recuperado de: who.int/tb/publications/global-report/en.

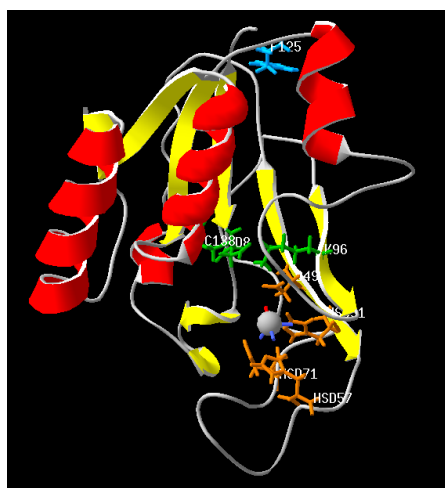
- Yoon J., Nam J., Kim K. & Ro Y. (2014). Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide – resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea and analysis of the correlation between the mutations and pyrazinamidase activity. *World J. Microbiol Biotechnol*, 30, 2821 – 2828.
- Zhang Y., Scorpio A., Nikaido H. & Sun Z. (1999). Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol*, 181, 2044–2049.
- Zhang Y., y Mitchison D. (2003). The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*, 7, 6 – 21.
- Zhang H., Deng J., Bi L., Zhou Y., Zhang Z., Zhang C. & Zhang X. (2008). Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* nicotinamidase/pyrazinamidase. *The FEBS journal*, 275, 753 – 762.
- Zhang S., Chen J., Shi W., Liu W., Zhang W. & Zhang Y. (2013). Mutations in *panD* encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg. Microbes Infect*, 2.
- Zhang, Y. Shi W., Zhang W. & Mitchison D. (2014). Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol. Spectr*, 2 (4), 1 -12.
- Zimhony O., Vilcheze C., Arai M., Welch J., William R. & Jacobs R. (2007). Pyrazinoic Acid and Its n-Propyl Ester Inhibit Fatty Acid Synthase Type I in Replicating Tubercle Bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother*, 51, 752–754.

Zimic M., Sheen P., Quiliano M., Gutierrez A. & Gilman R. (2010). Peruvian and globally reported Amino acid substitutions on the *mycobacterium tuberculosis* Pyrazinamidase suggest a Conserved pattern of mutations associated to Pyrazinamidase resistance. *Infect. Gent. Evol*, 10, 346 – 349.

Zimic M., Loli S., Gilman R., Gutierrez A., Fuentes P., Cotrina M. & Sheen P. (2012). A new approach for pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Drug Resist*, 18, 372 – 375.

IX. ANEXOS

Anexo 01: Localización de los cambios de aminoácidos en la estructura molecular de la PZAsa junto a los residuos catalíticos.



Leyenda:

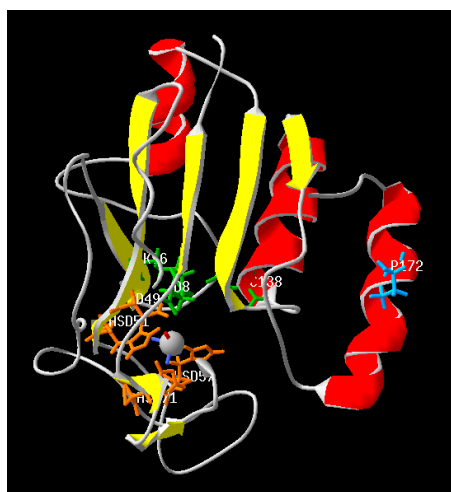
Verde: Aminoácidos del sitio activo

Anaranjado: Aminoácidos del sitio de unión al metal.

Celeste: Aminoácido V125F.

Figura 23. Modelamiento de PZAsa con cambio de aminoácido V125F.

Fuente: Información de laboratorio



Leyenda:

Verde: Aminoácidos del sitio activo

Anaranjado: Aminoácidos del sitio de unión al metal.

Celeste: Aminoácido L172P.

Figura 24. Modelamiento de PZAsa con cambio de aminoácido L172P.

Fuente: Información de laboratorio

Leyenda:

Verde: Aminoácidos del sitio activo

Anaranjado: Aminoácidos del sitio de unión al metal.

Celeste: Aminoácido A171T.

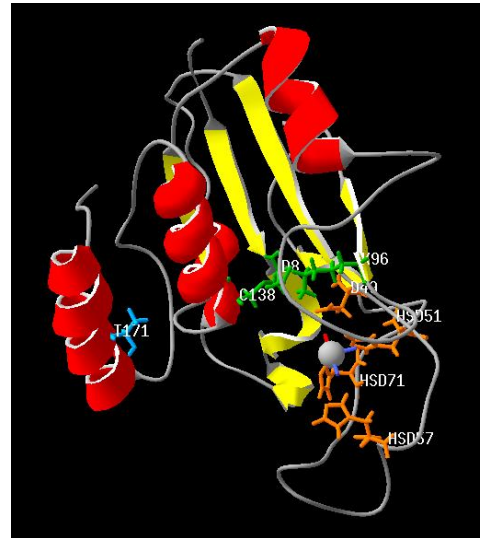


Figura 25. Modelamiento de PZAsa con cambio de aminoácido A171T.

Fuente: Información de laboratorio

Leyenda:

Verde: Aminoácidos del sitio activo

Anaranjado: Aminoácidos del sitio de unión al metal.

Celeste: Aminoácido P62L.

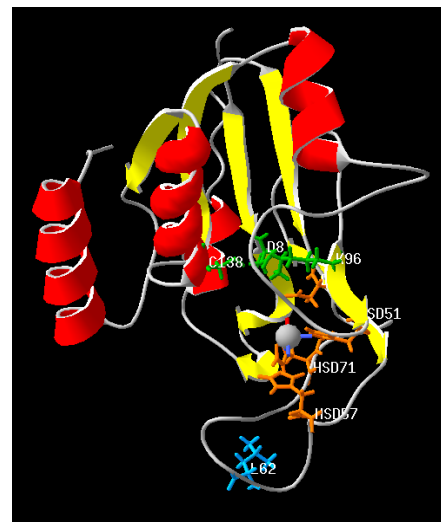


Figura 26. Modelamiento de PZAsa con cambio de aminoácido P62L.

Fuente: Información de laboratorio

Anexo 02: Test de Wayne, curvas de purificación de PZAsas recombinantes y verificación de pureza por SDS – PAGE 12%

A) PZAsa con cambio de aminoácido **V125F**

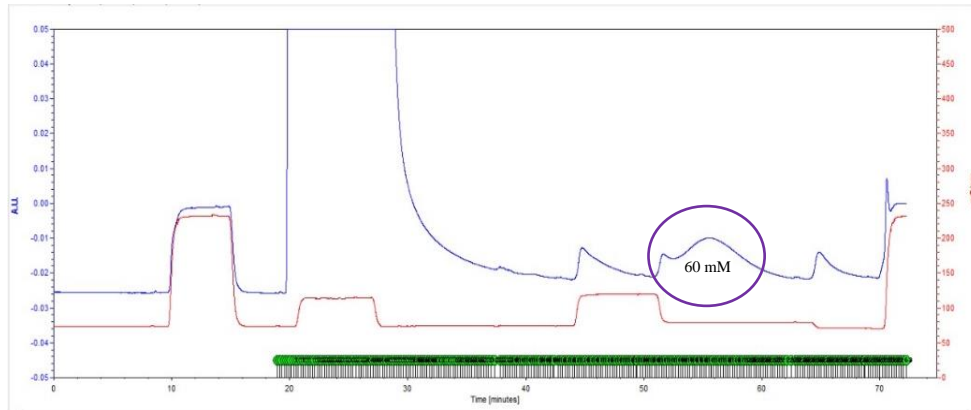
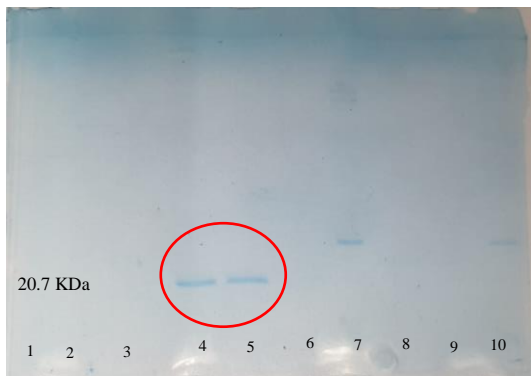


Figura 27. Curva de Purificación por cromatografía de afinidad de PZAsa recombinante de cepa de *Mycobacterium tuberculosis* con mutación G373T en el gen *pncA*. Pico máximo en 60 mM de Imidazol del Buffer fosfato.

Fuente: Resultados obtenidos.



Leyenda:

- 1: Alícuota 10
 - 2: Alícuota 20
 - 3: Alícuota 26
 - 4: Alícuota 28
 - 5: Alícuota 30
 - 6: Alícuota 32
 - 7: Marcador Broad Range
 - 8: Alícuota 37
 - 9: Alícuota 41
 - 10: WT H37Rv
- } 60 mM

Figura 28. Análisis de PZAsa recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* con mutación G373T en el gen *pncA* por SDS – PAGE 12%. Presencia de proteína en carriles 4 – 5.

Fuente: Resultados obtenidos.

B) PZAsa con cambio de aminoácido **A171T**

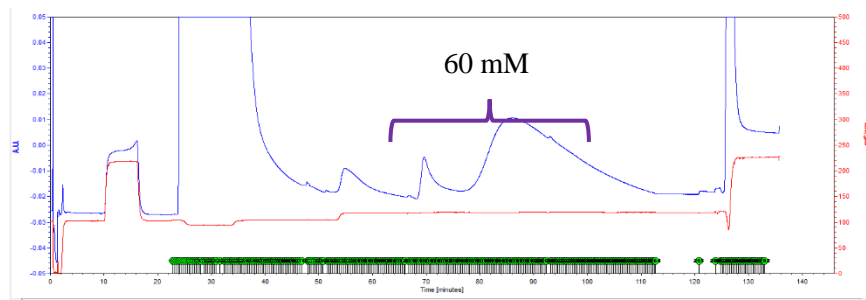


Figura 29. Curva de Purificación por cromatografía de afinidad de PZAsa recombinante de cepa de *Mycobacterium tuberculosis* con mutación G511A en el gen *pncA*. Pico máximo en 60 mM de Imidazol del Buffer fosfato.

Fuente: Resultados obtenidos.

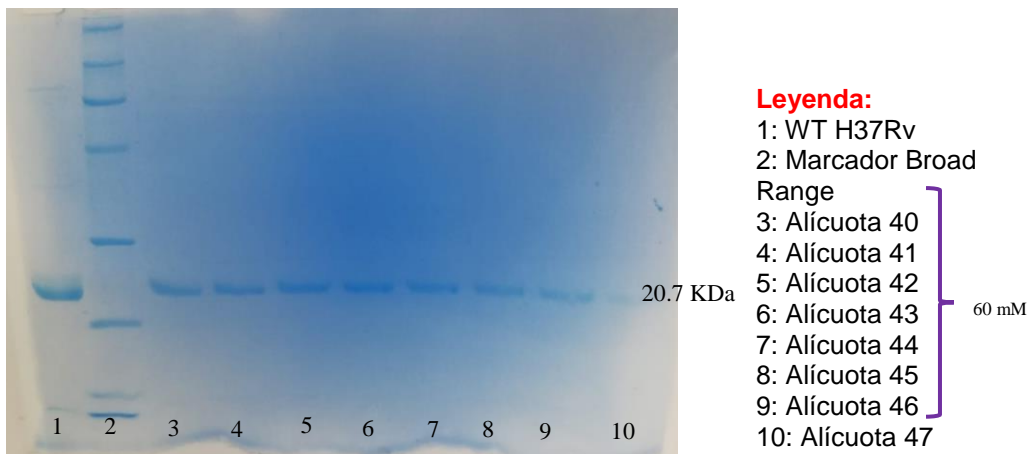


Figura 30. Análisis de PZAsa recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* con mutación G511A en el gen *pncA* por SDS – PAGE 12%. Presencia de proteína en carriles 3 – 10.

Fuente: Resultados obtenidos.

C) PZAsa con cambio de aminoácido **L172P**

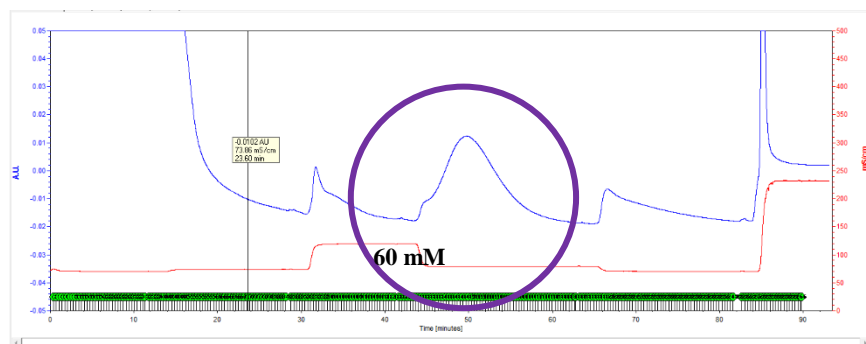


Figura 31. Curva de Purificación por cromatografía de afinidad de PZAsa recombinante de cepa de *Mycobacterium tuberculosis* con mutación T515C en el gen *pncA*. Pico máximo en 60 mM de Imidazol del Buffer fosfato.

Fuente: Resultados obtenidos.

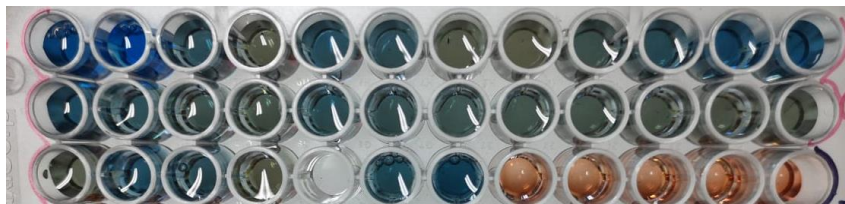


Figura 32. Resultados de la prueba de Bradford para demostración de la presencia de proteínas en las alícuotas obtenidas de la purificación por cromatografía de afinidad.

Fuente: Resultados obtenidos.

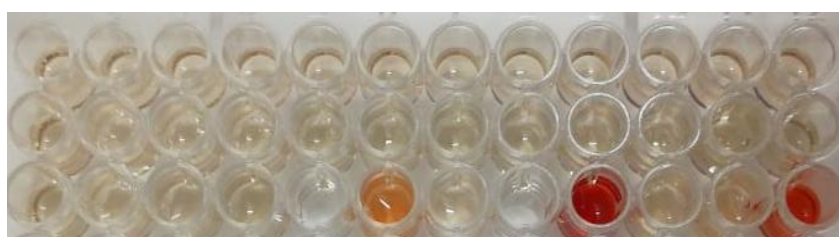
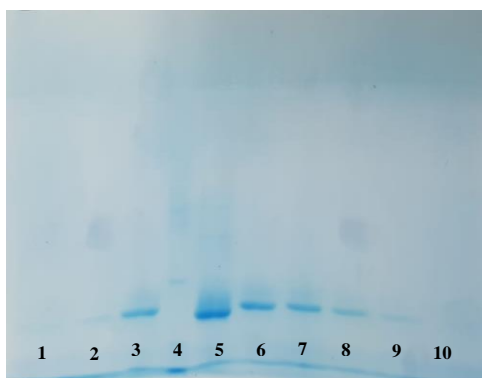


Figura 33. Resultados del test de Wayne para demostración de actividad de PZAse a partir de alícuotas obtenidas de purificación por cromatografía de afinidad.

Fuente: Resultados obtenidos



Leyenda:

- 1: Alícuota 26
- 2: Alícuota 27
- 3: Alícuota 28
- 4: Vacío
- 5: WT H37Rv
- 6: Alícuota 29
- 7: Alícuota 30
- 8: Alícuota 31
- 9: Alícuota 32
- 10: Alícuota 32

} 60 mM

} 60 mM

20.7 kDa

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Figura 34. Análisis de PZAse recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* con mutación T515C en el gen *pncA* por SDS – PAGE 12%. Presencia de proteína en carriles 2 – 9.

Fuente: Resultados obtenidos.

D) PZAsa con cambio de aminoácido **P62L**

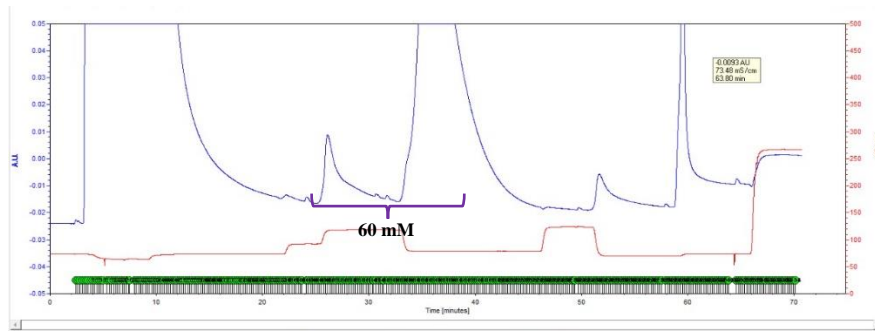


Figura 35. Curva de Purificación por cromatografía de afinidad de PZAsa recombinante de cepa de *Mycobacterium tuberculosis* con mutación G185A en el gen *pncA*. Pico máximo en 60 mM de Imidazol del Buffer fosfato.

Fuente: Resultados obtenidos.

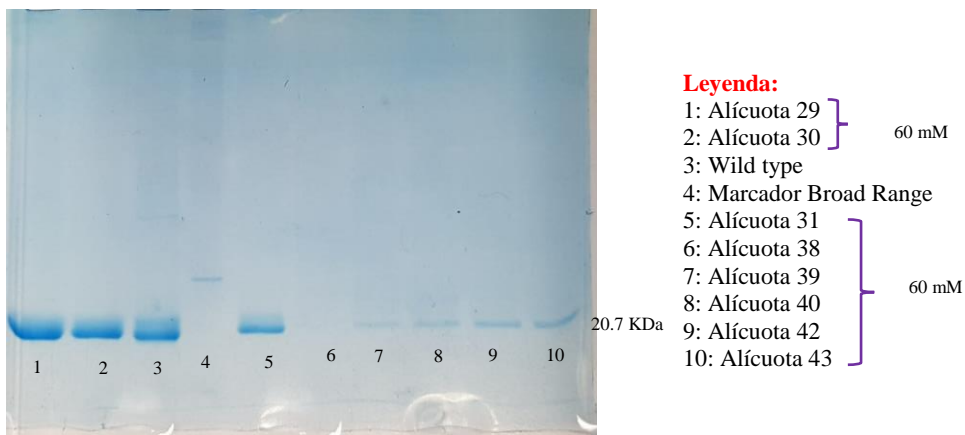


Figura 36. Análisis de PZAsa recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* con mutación G185A en el gen *pncA* por SDS – PAGE 12%. Presencia de proteína en todas las alícuotas.

Fuente: Resultados obtenidos.

E) Test de Wayne de PZAsas recombinantes



Figura 37. Test de Wayne de PZAsa WT H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.

Fuente: Resultados obtenidos.

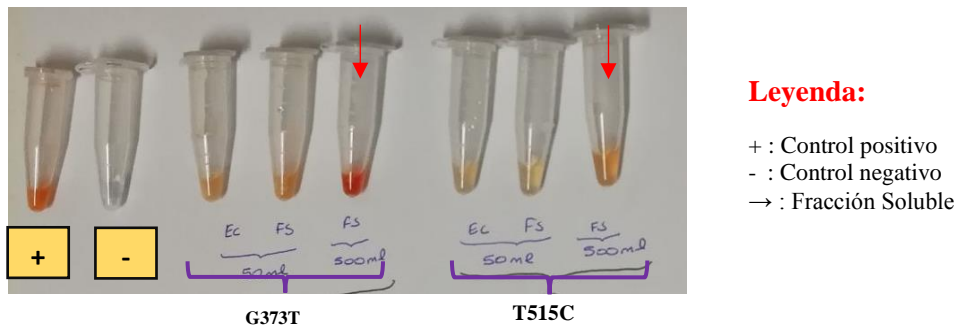


Figura 38. Test de Wayne de PZAs recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis* con mutaciones G373T y T515C en el gen *pncA*.

Fuente: Resultados obtenidos.

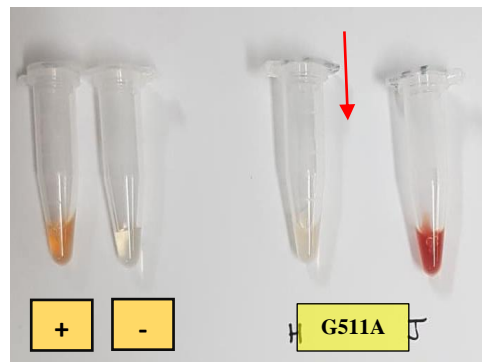


Figura 39. Test de Wayne de PZAs recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis* con mutación G511A en el gen *pncA*.

Fuente: Resultados obtenidos.

Anexo 03: Parámetros cinéticos y actividad enzimática de PZAsas recombinantes

Tabla 08. K_m de PZAsas recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis*

ENSAYO	WT	V125F	L172P	A171T	P62L
1	1.02	1.31	1.10	1.09	2.08
2	1.27	0.88	1.75	1.50	1.46
3	1.24	1.68	0.56	1.65	1.12
4	1.10	1.19	0.90	1.17	2.89
5	1.39	1.61	0.94	1.21	1.38

K_m . Constantes de Michaelis; WT. PZAsa Wild type H37Rv.

Tabla 09. K_{cat} de PZAsas recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis*

ENSAYO	WT	V125F	L172P	A171T	P62L
1	671.59	490.69	9.04	282.69	298.08
2	700.82	539.67	9.83	340.38	329.34
3	708.2	548.06	9.93	432.91	339.59
4	723.18	581.59	12.70	433.65	388.28
5	896.29	663.77	13.52	516.27	401.09

K_{cat} . Constante catalítica; WT: PZAsa Wild type H37Rv.

Tabla 10. E_{ff} de PZAsas recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis*

ENSAYO	WT	V125F	L172P	A171T	P62L
1	504.78	321.19	4.32	259.56	138.66
2	555.83	412.73	7.27	262.98	186.60
3	581.91	418.78	8.20	282.25	215.25
4	661.50	490.30	10.87	344.26	233.14
5	816.54	560.03	10.54	370.06	293.82

E_{ff} . Eficiencia enzimática; WT: PZAsa Wild type H37Rv.

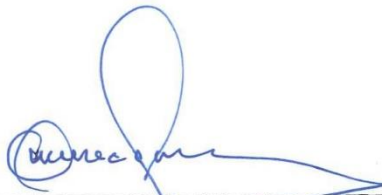
Tabla 11. Actividad enzimática de PZAsas recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis*

ENSAYO	WT	V125F	L172P	A171T	P62L
1	504.78	321.19	4.32	259.56	138.66
2	555.83	412.73	7.27	262.98	186.60
3	581.91	418.78	8.20	282.25	215.25
4	661.50	490.30	10.87	344.26	233.14
5	816.54	560.03	10.54	370.06	293.82

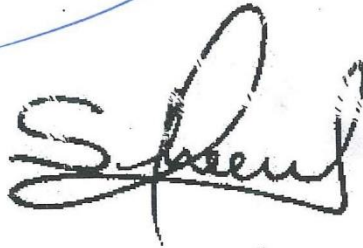
WT: PZAsa Wild type H37Rv.

yaneth

Bach. Yaneth Mariluz Quispe Hualpa
Tesisista



Dr. César Cevallos Columbus
Asesor



Dra. Patricia Sheen Cortavarría
Co - asesor