

ASPECTOS MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A PIRAZINAMIDA EN *M. TUBERCULOSIS*: IMPLICANCIAS PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO Y TERAPÉUTICA.

Autores:

Patricia Sheen¹, Cesar Lopez², Melissa Mendez¹, Jaeson Calla¹, Lizeth Peña¹ y Mirko Zimic^{1,2}

Grados académicos y afiliación institucional:

Patricia Sheen¹, BSc. Biología, MSc. Bioquímica, PhD(c) Salud Pública en Control y Prevención de Enfermedades. Cesar Lopez², BSc. Biología. Melissa Mendez¹, BSc. Farmacia y Bioquímica. Jaeson Calla¹, BSc. Biología. Lizeth Peña¹, BSc. Biología. Mirko Zimic^{1,2}, BSc. Física, MSc. Bioquímica, MHS Bioestadística, MHS(c) Epidemiología Genética, PhD(c) Salud Pública en Control y Prevención de Enfermedades.

Nombre del Departamento o departamentos y la institución o instituciones en la que se realizó el trabajo

- (1) Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- (2) Unidad de Bioinformática, Facultad de Ciencias, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Origen del apoyo recibido en forma de subvenciones.

El proyecto se realizó gracias al apoyo del grant NIH-Fogarty TB

Equipo o medicamentos

Ninguno

Nombre y Dirección del autor al que se dirigirá la correspondencia.

Mirko Zimic.

Unidad de Bioinformática, Facultad de Ciencias
Universidad Peruana Cayetano Heredia

Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres.

Resumen

Objetivo: Deseamos entender el polimorfismo del gen pirazinamidasa de *M. tuberculosis* en la población peruana, y su correlación con las características «estructura-función» de la enzima que codifica, para establecer los fundamentos moleculares del uso de técnicas de ADN para el diagnóstico de resistencia a PZA. Asimismo deseamos estudiar el efecto de altas concentraciones de Fe y Zn en la actividad enzimática de pncA como potenciadores de la terapia antituberculosa.

Material y métodos: Hemos empleado la prueba MABA como la prueba referencia para comparar la técnica SSCP en la medición de la susceptibilidad a PZA. Adicionalmente hemos secuenciado el gen de pirazinamidasa de 20 cepas de *M. tuberculosis* y hemos determinado la actividad enzimática pirazinamidasa utilizando la prueba de Wayne. Para

medir el efecto de los iones en la actividad enzimática, utilizamos la prueba de Wayne cuantitativa.

Resultados: Hemos estudiado el polimorfismo del gen pncA utilizando secuenciamiento y el SSCP. Esta última técnica, sorprendentemente mostró una importante sensibilidad (92.9%) y especificidad (91.5%), y un valor predictivo positivo de 93% para diagnosticar resistencia a PZA.

Diversas mutaciones en el gen fueron detectadas en cepas resistentes a PZA, produciendo cambios de aminoácidos asociados al sitio catalítico pero mayormente al sitio de coordinación del Zn, siendo la mutación D49N aparentemente la más prevalente dentro de la población VIH positivos.

Conclusiones: Las mutaciones más frecuentes asociadas a resistencia a PZA parecen afectar fundamentalmente la coordinación del Zn, frente a lo cual altas concentraciones de este ión, estimula la actividad pirazinamidasa, repotenciando el efecto de la PZA.

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad re-emergente con gran importancia a nivel mundial causando la muerte de 3 millones de personas en cada año, más que cualquier otra enfermedad infecciosa. La prevalencia global de tuberculosis es 1.7 billones, con una incidencia anual de 8 millones (Flogueira et al., 1993; Raviglioni et al., 1995).

Pirazinamida (PZA), junto con la isoniazida (INH) y rifampicina (RIF) forman los pilares de la terapia anti-tuberculosa. Mientras INH y RIF eliminan a los bacilos en estado de crecimiento activo, PZA elimina a los bacilos en estado latente. Debido a esta importante característica la PZA ha permitido reducir la duración del tratamiento de 9 a 6 meses (Steele and Dez Prez, 1988). La emergencia concomitante de cepas resistentes a PZA representa un serio problema de la Salud Pública, debido a que los esquemas de tratamiento primario y estandarizado estaría siendo administrados inapropiadamente basado en el hecho que la PZA efectivamente elimina a los bacilos latentes. En el Perú, el nivel de resistencia a PZA en pacientes que ingresan al esquema estandarizado

tras fracasar a los esquemas primarios está en un alarmante valor de 30% (Informe Unidad Técnica TBMDR-MINSA 2002)

El mecanismo de acción y el mecanismo de resistencia a PZA en *M. tuberculosis* no es conocido completamente. La PZA más que una droga es lo que se denomina una prodroga. La PZA atraviesa la membrana celular del mycobacterium a través de difusión pasiva, y es hidrolizada en el citosol por la enzima pirazinamidasa (pncA), liberándose un grupo amonio y produciendo como resultado el ácido pirazinoico. El ácido pirazinoico abandona el mycobacterium por difusión pasiva luego de lo cual es protonado extracelularmente, para finalmente reingresar al mycobacterium a través de un canal impulsado por diferencia de potencial. Una vez dentro de la micobacteria, el protón es liberado y el ácido pirazinoico vuelve a salir y a repetir el ciclo descrito. El resultado es una translocación de protones hacia el interior de la micobacteria con una reducción significativa y letal del pH intracelular (Wade and Zhang, 2004).

Es necesario desarrollar nuevos métodos de determinación de la susceptibilidad a PZA que no dependan del crecimiento de *M. tuberculosis*. Los métodos basados en el análisis del ADN son una alternativa que necesita ser explorada no solo porque sería más eficaz sino porque son obtenidos en menor tiempo. Para garantizar el éxito de los métodos basados en ADN, es necesario conocer el polimorfismo genético del gen pncA en la población peruana y su asociación con las características de estructura-función de la enzima pirazinamidasa.

Es importante además estudiar el efecto estimulador de la actividad pncA de ciertos iones como el Zn y el Fe, (Du, 2001; Wade and Zhang, 2004), en las cepas características de la población peruana, como un paso previo al desarrollo de estrategias para potenciar las terapias antituberculosas.

Materiales y métodos

Prueba de susceptibilidad a PZA: MABA

La resistencia a PZA fue determinada mediante el Ensayo en Microplacas con Azul de Alamar (MABA) (Franzblau et al, 1998). Este método se basa en la detección de crecimiento a través del uso de un indicador de óxido-reducción denominado resazurin (azul de alamar). El crecimiento bacteriano se evidencia mediante el cambio de color del medio líquido 7H9 (pH 6.0). Se calificó como resistente a PZA a las cepas con crecimiento en la concentración de 800mg/ml y sensibles a las cepas con crecimiento hasta la concentración de 200mg/ml. Los resultados son obtenidos en un promedio de 7 a 9 días.

Prueba de actividad de la pirazinamidasa (pncA): Wayne
Se llevó a cabo según Wayne (Wayne, L.G, 1974). Una asada de cultivo de *M. tuberculosis* es sembrada en 2 tubos conteniendo 5ml de agar Dubos suplementado

con PZA. Los medios inoculados son incubados a 37°C. El primer tubo es leído el cuarto día y el segundo el séptimo día, después de la adición de 1ml de sulfato ferroso de amonio (1%) y dejado en reposo por 30 minutos. La aparición de un anillo marrón o rosado en la interfase del tubo indicará actividad positiva de pncA. La cepa control pncA positivo fue *M. tuberculosis* H37Rv y el control negativo *M. bovis* ATCC 27289. El control de color contiene ácido pirazinoico en el medio en lugar de PZA.

Prueba de Wayne cuantitativa

Para el estudio del efecto de iones en la actividad de pncA, empleamos la prueba de Wayne cuantitativa (Konno et al., 1967), y estudiamos a las cepas mutantes D49N y H51R, por tratarse de mutaciones que comprometen el sitio de coordinación con los iones. El extracto bacteriano de las cepas resistentes a PZA es extraído para observar el efecto de los iones sobre la pirazinamidasa. Los cultivos de *M. tuberculosis* son cosechados en tubos buffer de reacción (50mM TRIS-HCl (pH 7.0), 1mM EDTA). Después de homogenizar por 2 min, 6ml de buffer de reacción es agregado. Las suspensiones bacterianas son sonicadas a 20 KHz por 1min, 12 veces en hielo, separados por 1min con una amplitud de 3u. 30ml de leupetin y 30ml de pepstatin son agregados y centrifugados en frío a 13000rpm por 20 min. El sobrenadante es recuperado y se mide la concentración de proteínas mediante la prueba Bradford, haciéndose las correcciones luego para igualar la concentración de proteínas. 250ml de extracto crudo es alicuotado en cada tubo. PZA (121 mM), agua y la solución de iones Zn y Fe (0.05, 0.1, 1, 2 mM) son agregados. Se incuba 64 horas, luego de lo cual se adiciona 60ml de sulfato ferroso de amonio 1% luego de lo cual se transfiere a una placa de 96 pozos y se lee en un espectrofotómetro a 450nm.

Polimorfismos en el gen pncA mediante el SSCP

La técnica de SSCP se basa en la propiedad del ADN en cadena simple de plegarse en una estructura tridimensional que es característica de la secuencia de bases. En ese sentido, una mutación puntual en el ADN puede dar un plegamiento distinto. El ADN previamente amplificado por PCR, se denatura por calentamiento y se enfría rápidamente, consiguiéndose que las cadenas simples se plieguen sobre sí mismas en lugar de dimerizar. Este producto se resuelve en una electroforesis de poliacrilamida con lo cual se genera un patrón de bandas característico de la secuencia de ADN (Hayashi K., 1992). Para realizar el SSCP sobre el gen pncA de *M. tuberculosis* se diseñaron los primers más adecuados, 5' GATCGTCGCGGCGTCATGGA3', y 5' CCGCCGCCAACAGTTCATCC3', los cuales amplifican el exón incluyendo la región promotora. Para el análisis de SSCP se analizaron 103 muestras, de las cuales 56 eran MABA resistentes y 47 MABA sensibles.

Polimorfismo en el gen pncA mediante secuenciamiento

El ADN se extrajo de las cepas de *M. tuberculosis* mediante el método de digestión enzimática y purificación con fenol. La concentración del ADN genómico se midió mediante comparación con marcadores de ADN de concentración conocida (ADN del Fago Lambda, 50ng/μl) (Sambrook et al., 1989).

3ml de suspensión de ADN (5-10 ng/ml) es amplificado con los primers P1 y P6 (Scorpio et al., 1997). La purificación del producto de amplificación se realiza directamente del gel de agarosa mediante el Kit de purificación de ADN de gel (QIAEX II). El secuenciamiento se realizó en el equipo ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer de Applied Biosystem. Este secuenciador es un equipo automático de última generación de 4 capilares, con capacidad de análisis de hasta 800 bases.

Para el secuenciamiento se seleccionaron 20 cepas de *M.tuberculosis* que mostraron resistencia a PZA según la prueba de MABA. 10 cepas provinieron de pacientes VIH positivos atendidos en el hospital 2 de Mayo, y 10 cepas de pacientes VIH negativos, de los cuales 5 provienen de Lima-norte (Ventanilla) y 5 de Lima-sur (hospital María Auxiliadora).

Análisis de las secuencias del gen pncA

El análisis de homología de las secuencias de ADN obtenidas será efectuado mediante el software Clustal usando como molde de la secuencia del gen de pncA de *M. tuberculosis* estándar, H37Rv, el cual es susceptible a PZA. Cualquier cambio en la secuencia de ADN será considerado como mutación siempre y cuando la calidad del secuenciamiento de dicho nucleótido sea mayor de 75%. De igual manera se realizará el análisis de la secuencia proteica.

Modelamiento estructural

La estructura tridimensional de la enzima pncA de H37Rv y las mutantes fue estimada utilizando el método de modelamiento por homología (Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch MC, 2003). Para el efecto se utilizó como molde a la estructura cristalina de la nicotinamidasas de *pyrococcus horikoshii* (código de acceso 1ILW en el Protein Data Bank), la cual mantiene una homología de 37% con pncA de *M.tuberculosis*. El modelo obtenido fue luego refinado empleando algoritmos de optimización geométrica. Para esto se efectuó una minimización de energía con el algoritmo de 'descenso máximo' (Kini RM, Evans HJ, 1991), ajustado a un parámetro de gradiente de 0.1 Kcal/mol. Posteriormente un segundo refinamiento de 100ps utilizando dinámica molecular con el campo de fuerza AMBER (Hsieh MJ, Luo R, 2004) fue aplicado. El anclaje de la PZA en el sitio catalítico de la pncA fue igualmente modelado por medio de dinámica molecular en las mismas condiciones descritas. Para este propósito se emplearon los programas de modelamiento molecular, Gaussian03 e Hyperchem7.5.

Resultados

Polimorfismo del gen pncA y su asociación con la resistencia a PZA.

Polimorfismo por SSCP: El patrón de bandas del SSCP utilizando los primers mencionados, claramente permite diferenciar las cepas sensibles de las resistentes. La figura 1 muestra un ejemplo del patrón SSCP de algunas cepas sensibles (S) y resistentes (R) a PZA confirmados con la prueba MABA. El patrón de sensibilidad está dado por la cepa H37Rv. De las 56 muestras positivas confirmadas por MABA (resistentes a PZA), 52 resultaron positivas a la prueba SSCP, con lo cual estimamos la sensibilidad del SSCP en 92.9%, (95% IC: [0.83, 0.98]). De las 47 muestras negativas confirmadas por MABA (sensibles a PZA), 43 resultaron negativas a la prueba SSCP, por lo que la especificidad del SSCP se estima en 91.5%, (95% IC: [0.80, 0.98]). El valor predictivo positivo para el SSCP en este caso es de 93%.

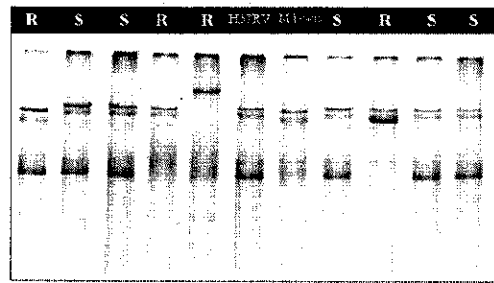


Figura 1: R=cepa resistente a PZA, S=cepa sensible a PZA, H37Rv=patrón sensible, M.bovis=patrón resistente. La ausencia o desplazamiento de bandas con respecto a H37Rv indican mutaciones y sugiere resistencia a PZA.

Polimorfismos por secuenciamiento: Las 20 cepas secuenciadas mostraron un MIC mayor de 800 en todos los casos para la prueba MABA. El tipo de mutaciones, la localización en el ADN y en la proteína, la frecuencia y el resultado de la prueba Wayne se muestran en la tabla 1. La mutación D49N se ha reportado únicamente en pacientes VIH positivos del hospital 2 de Mayo de manera mayoritaria. Salvo la mutación H57D, la prueba de Wayne concuerda con la prueba MABA en todos los demás casos.

Mutación ADN	Mutación proteína	frecuencia	WAYNE
G146A	D49N	8/20	R
A153G	H51R	2/20	R
C170G	H57D	2/20	S
T281C	F94L	1/20	PR
T20G	V7G	1/20	R
C310G	Y103stop*	1/20	R
A35G	D12G	2/20	R
162T	P54L	3/20	R

Tabla 1.- Distribución y frecuencia de mutaciones en cepas MABA resistente a PZA.
R=resistente, S=sensible, PR=parcialmente resistente.
* Esta mutación reemplaza a la tirosina por un codon stop, con lo cual se trunca la proteína y anula su función.

Cabe resaltar que en todos los casos, el secuenciamiento ha mostrado que la región promotora es 100% conservada.

Modelamiento estructural.

La estructura tridimensional de la enzima pncA de *M.tuberculosis* H37RV refleja un alto grado de similitud con su homóloga de *Phorikoshii*. Esto nos permite realizar un alineamiento estructural entre ambas enzimas, e identificar los residuos del sitio catalítico y del sitio de coordinación del cofactor Zn, a partir de lo identificado previamente en *Phorikoshii*, en donde el sitio catalítico esta formado por los residuos Cys133, Lys94, Asp10, y el sitio de coordinación con Zn por los residuos D52, H54 and H71 (Du X. et.al.). En *M.tuberculosis* los residuos equivalentes al sitio catalítico identificados son D8, A134, C138 tal como lo describe Du, pero adicionalmente hemos encontrado que F94 muestra una interacción importante con la PZA cuando ésta ingresa al bolsillo hidrofóbico. El sitio de coordinación del Zn en *M.tuberculosis* esta formado por la H51, H57 y H71, pero D49 muestra una importante cercanía como para participar en la coordinación. La figura 2 muestra la estructura tridimensional modelada para pncA de *M.tuberculosis* H37RV, en donde se ha simulado el anclaje de la PZA (en amarillo) en el sitio activo. La esfera blanca representa el Zn, y ha sido colocada por traslapamiento del Zn incluido en el cristal de *Phorikoshii*.

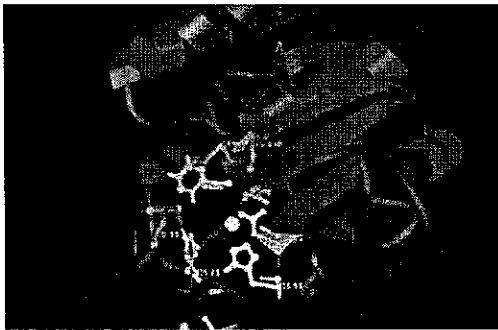


Figura 2. La molécula en amarillo representa a la PZA, los residuos celestes el sitio catalítico, los residuos blancos el sitio de coordinación del cofactor, y la esfera blanca representa el Zn.

Una mutación muy interesante es H57D, la cual está asociada a resistencia a PZA. La sustitución de la histidina 57 por ácido aspártico es lo que hace la diferencia entre pncA de *M.tuberculosis* y *M.bovis*, el cual es naturalmente resistente a PZA. La figura 3 muestra las estructuras tridimensionales modeladas para H37RV y la mutante H57D.

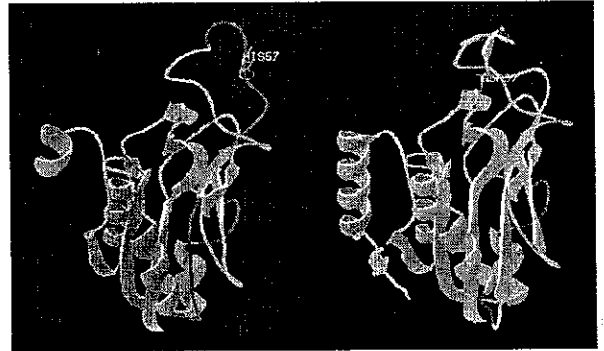


Figura 3. A la izquierda el modelo tridimensional de pncA de *M.tuberculosis*, y a la derecha el modelo de la mutante H57D cuya secuencia es idéntica a la pncA de *M.bovis*

Claramente puede verse una distorsión del loop adyacente a la entrada del sitio activo, el cual queda parcialmente bloqueado en el caso de *M.bovis*.

Efecto de los iones sobre la actividad de pncA.

La prueba de Wayne cuantitativa fue utilizada para medir la actividad catalítica de las mutantes D49N y H51R a partir de extracto crudo de los cultivos bacterianos. Encontramos que en consenso, concentraciones de Zn (0.05mM – 0.1mM) tienden a mejorar notablemente la actividad enzimática de pncA en las dos mutantes. Sin embargo, el Fe no muestra ningún efecto significativo (Figura 4).

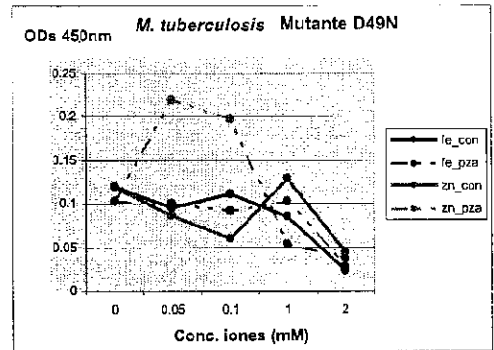


Figura 4. Efecto de los iones Fe y Zn en la actividad de la pirazinamidasasa. Mutación en la proteína en el aminoácido D49N.

Fe_con: control con Fe.

Fe_pza: PZA presente con Fe.

Zn_con: control con Zn.

Zn_pza: PZA presente con Zn.

Discusión

El presente estudio ha mostrado una relativamente alta sensibilidad (92.9%) y especificidad (91.5%) para diagnosticar resistencia a PZA con la prueba SSCP que hemos estandarizado. Esto abre prometedoras posibilidades de implementar variantes más rápidas del SSCP, tales como variantes realizadas directamente sobre muestras de esputo, ya que el principio de esta técnica se basa en el PCR el cual es una técnica conocida por su capacidad de detectar cantidades mínimas de ADN.

El secuenciamiento del gen *pncA* de las 20 cepas resistentes mostraron 8 mutaciones únicas, una de las cuales trunca la proteína por la introducción de una señal stop (Y103stop). Sorprendentemente, 15 de estas cepas revelan 4 mutaciones únicas, (D49N, H51R, H57D y P54L), que están asociadas al sitio de coordinación del cofactor, (mutaciones que comprometen residuos 'cercaños' al sitio de coordinación), mientras que sólo 4 cepas revelan 3 mutaciones únicas asociadas al sitio catalítico (F94L, V7G y D12G).

Por otra parte, el secuenciamiento de la región promotora de las 20 cepas mostró un 100% de conservación de las mismas, lo cual sugiere que la resistencia a PZA difícilmente se debería a problemas de expresión del gen *pncA*, sino más bien a cambios en la actividad enzimática misma.

Esta evidencia sugiere que el mecanismo más frecuente para introducir resistencia en la población de *M. tuberculosis* es a través de alteraciones de la coordinación con el cofactor antes que alteraciones mismas del sitio catalítico. Y en menor proporción, estarían los eventos de truncamiento de la enzima. Este hecho deja abierta la posibilidad de aplicar concentraciones más altas de iones cofactores (Zn y Fe) y eventualmente potenciar la actividad en las cepas sensibles y recuperar la actividad en algunas cepas resistentes, dependiendo de la mutación y del grado de variación del sitio de coordinación.

Interesantemente se aprecia que entre los pacientes VIH positivos atendidos en el hospital 2 de Mayo, prevalece fuertemente la cepa MDR con la mutación D49N la que es resistente a PZA y la cual no se ha observado en el grupo VIH negativo.

Adicionalmente debemos remarcar que la mutación D49N no ha sido reportada previamente en ninguna parte del mundo, por lo que probablemente ha sido seleccionada y amplificada en nuestro país.

Considerando que este es un estudio piloto, creemos que es importante analizar una población mayor y verificar si es que existe alguna agrupación de cepas MDR en el grupo VIH positivos. De confirmarse esto, estaríamos ante una probable transmisión intra hospitalaria de tuberculosis MDR.

La aplicación de las herramientas bioinformáticas y modelamiento computacional, nos permiten visualizar la estructura de las proteínas y a partir de ello entender el mecanismo funcional de las mismas. En el caso de la *pncA* de *M. tuberculosis*, ahora

podemos visualizar como es que los residuos aminoácidos del sitio catalítico interactúan con la PZA, y como los residuos de coordinación lo hacen con el Zn. Con el concepto estructura-función visualizado tridimensionalmente, podemos entender la razón por la cual ciertas mutaciones reducen o anulan la actividad enzimática.

La mutante F94L, muestra un resultado 'parcialmente resistente' en Wayne, lo cual sugiere que la enzima no tiene la actividad necesaria para hidrolizar la PZA en la concentración suficiente. Al analizar esta mutante hemos verificado que la leucina que reemplaza a la fenilalanina se encuentra más cerca al anillo catalítico comparado con H37RV. Si bien no hay una variación significativa de la geometría inmediata del anillo catalítico (D8, A134 y C138), las pruebas de dinámica molecular que efectuamos para simular el la dinámica y el anclaje de la PZA en el sitio activo, revelaron que en la mutante F94L, la PZA permanece un tiempo mucho más corto en el sitio activo antes de salir rechazada por la L94. Esta reducida permanencia en el sitio activo, probablemente sea la razón por la cual la PZA no llega a ser hidrolizada completamente en todas las ocasiones en que esta ingresa al sitio activo. En el caso de la mutante H57D, esta cepa es MABA resistente pero Wayne sensible, lo cual sugiere que la causa de la resistencia se deba probablemente a fallas a nivel de las bombas que retiran y reincorporan el ácido pirazinoico protonado hacia la micobacteria. Una segunda posibilidad es que la actividad de la mutante H57D, si bien existe, no alcanza un nivel mínimo necesario para que la tasa de hidrólisis de PZA sea letal a la micobacteria.

El análisis estructural mostrado en la figura 3, muestra claramente que el loop inestable de H37RV se convierte en una parcial hoja beta, más estable y ligeramente más próxima a la cavidad de ingreso al sitio activo. Probablemente esta ligera proximidad altera sutilmente el normal ingreso de la PZA pero lo suficiente para que la tasa de hidrólisis no alcance el nivel mínimo necesario. Para confirmar esta hipótesis, nos encontramos trabajando en simulaciones de dinámicas en las que analizamos la trayectoria de la PZA desde cuando se encuentra en las inmediaciones del sitio activo hasta cuando logra ingresar a dicha cavidad. Estas simulaciones lamentablemente con nuestra limitada potencia computacional, pueden tardar varias semanas antes de converger.

Lo que resulta interesante es que *M. bovis* presenta exactamente la misma mutación H57D en el gen *pncA*, siendo esta además una especie naturalmente resistente a PZA. De ser correctas las pruebas Wayne que hemos obtenido para la mutante H57D, esto implica que la resistencia natural de *M. bovis* a PZA podría eventualmente deberse a fallas en alguna de las bombas involucradas o que la actividad enzimática *pncA* no alcanza un nivel mínimo necesario. Esta información es particularmente muy interesante en

vista que el 100% del genoma de *M. tuberculosis* y *M. bovis* están secuenciados y disponibles. Un análisis comparativo de secuencias, podría realizarse para identificar los aun desconocidos genes que codifican a las bombas y canales involucrados en el tráfico de la pirazinamida y el ácido pirazinoico.

Si bien el Zn y el Fe tienen efectos potenciadores en la actividad *pncA* en cepas sensibles a PZA (Dú, et al. 2001), esto no se generaliza en el caso de las cepas resistentes. En el caso de las mutantes resistentes, creemos que el efecto de estos iones dependería del tipo de mutación, y por lo tanto del compromiso estructural del sitio de coordinación, tal como lo hemos comprobado en el análisis de las mutantes estudiadas resistentes a PZA (D49N y H51R), en cuyo caso la actividad *pncA* puede recuperarse bajo condiciones de mayor concentración de Zn. Este hecho abre las puertas a potenciales y prometedoras mejoras en los esquemas de tratamiento anti tuberculoso. El problema no sería tan simple como administrar suplementos de Zn al paciente, ya que altas concentraciones extracelulares de este ión no garantiza su translocación intracelular en *M. tuberculosis* (datos no mostrados), por lo que se debería buscar mecanismos alternativos para que las micobacterias importen estos iones de manera indirecta.

Referencias bibliográficas:

- Du W, Wang W, Kim R, Nguyen H and Kim SH. 2001. Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry*. 10: 14166-14172
- Flogueira L, Delgado R, Palenque and Noriega A. 1993. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in Clinical Samples by Using a Simple Lysis Method and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 1019-1021.
- Franzblau, S., Witzig, R. McLaughlin, J. Torres, P. Madico, G., Hernández A. Degnan M. Cook, M. Quenzer, Ferguson R. Gilman R. 1997. Rapid, Low - Technology MIC Determination with Clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(2):362-6
- Hayashi K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl*. 1992 Jun;9(3):73-9. Review.
- Hsieh MJ, Luo R. Physical scoring function based on AMBER force field and Poisson-Boltzmann implicit solvent for protein structure prediction. *Proteins*. 2004 Aug 15;56(3):475-86.
- Informe Técnico de la Unidad Técnica de Tuberculosis Multidrogo Resistente. Programa Nacional del Control de Tuberculosis. Ministerio de Salud, 2001
- Kini RM, Evans HJ. Molecular modeling of proteins: a strategy for energy minimization by molecular mechanics in the AMBER force field. *J Biomol Struct Dyn*. 1991 Dec;9(3):475-88.
- Konno K, Feldman M and McDermont W. 1967. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of the tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis*. 95: 461-469.
- Raviglioni M, Snider DE, Kochi A. 1995. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 273: 220.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA
- Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31, 3381-3385.
- Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M and Zhang Y. 1997. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 41: 540-543.
- Steele MA and Dez Prez RM. 1988. The role of pyrazinamide in tuberculosis chemotherapy. *Chest*. 94(4):845-50. Review.
- Wade MM and Zhang Y. 2004. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Bioscience*. 9: 975-994.
- Wayne LG. 1974. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*. 109(1):147-51.