



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**EFFECTO DE LA PIRAZINAMIDA SOBRE LA RUTA
BIOSINTÉTICA DE COENZIMA A EN *MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS* BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE
BACHILLER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA**

AUTOR:

RENATO ISAIAS FERNANDEZ CORNEJO

ASESORA:

DRA. PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA

LIMA, PERÚ

2022

Efecto de la pirazinamida sobre la ruta biosintética de coenzima A en Mycobacterium tuberculosis bajo condiciones de estrés

ORIGINALITY REPORT

9%

SIMILARITY INDEX

4%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

5%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Student Paper	4%
2	hdl.handle.net Internet Source	1%
3	www.grafiati.com Internet Source	<1%
4	www.preinvestigo.biblioteca.uvigo.es Internet Source	<1%
5	journalofbusiness.org Internet Source	<1%
6	Katherine Vallejos-Sánchez, Juan M. Lopez, Ricardo Antiparra, Emily Toscano et al. "Mycobacterium tuberculosis ribosomal protein S1 (RpsA) and variants with truncated C-terminal end show absence of interaction with pyrazinoic acid", Scientific Reports, 2020 Publication	<1%

Contenido

Resumen	1
Abstract	2
I. Estado del Arte	3
1. Pirazinamida, prodroga contra los bacilos latentes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
1.1. Infección latente de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
1.2. La pirazinamida es efectiva contra los bacilos latentes de MTB	4
2. Mecanismos de acción propuestos para PZA en MTB	4
2.1. La PZA se convierte en ácido pirazinoico, droga activa	4
2.2. POA inhibe la síntesis de Coenzima A estimulando la degradación de la enzima L-aspartato descarboxilasa por la proteasa caseinolítica ClpC1-ClpP	5
2.3. Factores de estrés presentes en el estado de latencia de MTB y el mecanismo de acción de PZA	6
3. Metabolómica aplicada al estudio de mecanismos de acción de drogas	7
3.1. Bases de la metabolómica	7
3.2. Antecedentes del uso de metabolómica en la investigación de mecanismos de acción de fármacos contra TB	8
3.3. Predicción del mecanismo de acción <i>in vivo</i> de potenciales fármacos mediante metabolómica	8
II. Problema de investigación	9
III. Estrategia de investigación	11
Referencias bibliográficas	12

Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), que puede permanecer en estado de infección latente. La pirazinamida (PZA), prodroga, elimina eficientemente los bacilos en estado latente, evitando el relapso de la TB. Sin embargo, el mecanismo de acción de la droga activa: ácido pirazinoico (POA), sigue siendo desconocido.

Recientemente ha tomado relevancia una propuesta de mecanismo de acción para PZA: POA inhibiría la biosíntesis de Coenzima A, mediante la degradación de la enzima L-aspartato descarboxilasa (PanD). La unión de POA a PanD tendría un débil efecto inhibitorio, pero propiciaría la degradación de esta enzima por la proteasa caseinolítica ClpC1-ClpP. Así lo demuestra el hecho de que POA reduce los niveles endógenos de PanD, enzima que cataliza la reacción de conversión de L-aspartato a β -alanina, uno de los pasos iniciales en la biosíntesis de CoA. Además, un análisis metabolómico en *M. bovis* BCG, evaluó el efecto de POA en los intermediarios de la ruta biosintética de CoA, observándose una reducción de los niveles de β -alanina y de los demás metabolitos posteriores a la reacción catalizada por PanD.

In vivo, los bacilos latentes de MTB están expuestos a condiciones de estrés, siendo las más representativas: pH ácido, inanición e hipoxia. Curiosamente, se ha propuesto que los factores estresantes conducen un cambio de fenotipo en MTB, hacia un estado en el que la diana de POA sea esencial para su supervivencia. Sin embargo, aún no hay estudios que consideren los principales factores estresantes presentes en el estado de latencia de MTB, en el mecanismo de acción de PZA.

Es por esto que, el presente proyecto plantea realizar un análisis metabolómico para evaluar el efecto de la PZA en los intermediarios de la ruta biosintética de CoA en MTB, sometida a los principales factores de estrés relacionados con el estado de latencia: pH ácido, inanición e hipoxia. Integrando así, la influencia de las condiciones de estrés presentes en el estado de latencia de MTB y el mecanismo de acción propuesto de la PZA

Abstract

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), which can remain in a latent state of infection. Pyrazinamide (PZA), a prodrug, efficiently eliminates the bacilli in a latent state, preventing the relapse of TB. However, the mechanism of action of the active drug, pyrazinoic acid (POA), remains unknown.

Recently, a proposed mechanism of action for PZA has become relevant: POA would inhibit the biosynthesis of Coenzyme A, through the degradation of the enzyme L-aspartate decarboxylase (PanD). The binding of POA to PanD would have a weak inhibitory effect, but would promote the degradation of this enzyme by the caseinolytic protease ClpC1-ClpP. This is demonstrated by the fact that POA reduces endogenous levels of PanD, an enzyme that catalyzes the conversion reaction of L-aspartate to β -alanine, one of the initial steps in CoA biosynthesis. In addition, a metabolomic analysis in *M. bovis* BCG, evaluated the effect of POA on the intermediates of the CoA biosynthetic pathway, observing a reduction in the levels of β -alanine and the other metabolites downstream of the PanD-catalyzed reaction.

In vivo, latent MTB bacilli are exposed to stress conditions, the most representative being: acidic pH, starvation and hypoxia. Interestingly, it has been proposed that stressors drive a phenotype shift in MTB, towards a state in which POA targeting is essential for their survival. However, there are still no studies that consider the main stressors present in the MTB latency state in the mechanism of action of PZA.

For this reason, the present project proposes to perform a metabolomic analysis to evaluate the effect of PZA on the intermediates of the CoA biosynthetic pathway in MTB, subjected to the main stress factors related to the latency state: acid pH, starvation and hypoxia. Thus, integrating the influence of the stress conditions present in the MTB dormancy state and the proposed mechanism of action of PZA.

I. Estado del Arte

1. Pirazinamida, prodroga contra los bacilos latentes de *Mycobacterium tuberculosis*

1.1. Infección latente de *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis (TB), es una enfermedad infecciosa respiratoria causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y es considerada la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso (1). Sin embargo, no todas las personas infectadas desarrollan la enfermedad activa y pueden permanecer toda su vida con infección de tuberculosis latente (ITBL) (1, 2). Esta se define como un estado asintomático, no transmisible, de TB, causado por la respuesta inmune persistente ante la estimulación de los antígenos de MTB (3). En el cual, los bacilos permanecen en estado no replicante, reduciendo reversiblemente su actividad metabólica (4). Permitiéndoles evadir el sistema inmune y sobrevivir en el huésped a largo plazo (4).

La infección se inicia con el ingreso de MTB por las vías respiratorias hasta llegar a los pulmones, en donde es fagocitado por los macrófagos alveolares pulmonares o también, por las células dendríticas (4). Intracelularmente, los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de estas células, reconocen los antígenos de MTB desencadenando la secreción de quimioquinas y citoquinas que reclutan otros tipos de células inmunes. En este punto, las células T, B, los macrófagos alveolares cargados de lípidos y otras células, forman una estructura inmunológica denominada granuloma que permite contener a las bacterias (5). En los seres humanos, se distinguen tres tipos de granulomas: los granulomas sólidos, característicos de la ITBL; los granulomas necróticos, típicos de la TB activa y los granulomas caseosos, presentes en la TB grave (6).

Aunque se sugiere que los granulomas restringen la propagación bacteriana, también promueven la persistencia de MTB dentro del huésped, representando un potencial riesgo de reactivación de la enfermedad (5). Esto depende de la correlación positiva entre la estructura del granuloma y el grado de progresión de la TB (5). Mientras que los granulomas sólidos, pueden contener eficazmente a MTB, los granulomas caseosos permiten el crecimiento y la diseminación de las bacterias. Lo que sugiere que cualquier factor debilitante del hospedador, como la inmunodeficiencia (Infección por VIH) o trastornos metabólicos (Diabetes), puedan afectar la integridad estructural del granuloma y, en caso de ITBL, causar el relapso de la TB. (5).

1.2. La pirazinamida es efectiva contra los bacilos latentes de MTB

La mayoría de los antibióticos interfiere con procesos vitales para la célula, como: la replicación y traducción del ADN o la formación de la pared celular (4). De tal forma que, al causar cualquier interrupción o desequilibrio en estos procesos, se produzca un efecto bacteriostático o bactericida. Debido a que los bacilos latentes de MTB presentan una reducción en su tasa metabólica, entrarán en un estado de no crecimiento, por lo que disminuirán sus actividades vitales. Esto ocasiona una reducción de la eficacia de los fármacos antituberculosos (4).

Ante esto, la pirazinamida (PZA) es una prodroga que presenta especial actividad esterilizante contra los bacilos latentes de MTB, evitando el relapso de la TB (4, 7). Lo cual, también, permite reducir de 12 a 6 meses la duración del tratamiento (7). Esta eficacia clínica de la PZA puede ser explicada bajo dos puntos: (I) la capacidad del fármaco para acceder a los bacilos en los diferentes tipos de lesiones y (II) su efecto esterilizante contra los bacilos latentes (7). En primer lugar, la PZA se distribuye rápida y homogéneamente entre los diferentes tipos de lesiones pulmonares de TB, incluyendo los granulomas caseosos. A comparación de otros fármacos que, debido a su gran peso molecular e hidrofobicidad, se distribuyen con menor eficacia (7). En segundo lugar, se pudo comprobar que la PZA reduce la carga bacteriana, esterilizando lesiones celulares como necróticas (7).

A pesar de todo esto, el mecanismo de acción de la PZA sigue siendo desconocido (8).

2. Mecanismos de acción propuestos para PZA en MTB

2.1. La PZA se convierte en ácido pirazinoico, droga activa

La PZA es una prodroga que fue sintetizada químicamente por Dalmer y Walter en 1936. Su fórmula química de $C_5H_5N_3O$ le confiere un peso molecular de 123.11 g/mol y un punto de fusión de entre 188 a 189°C (9). Y no fue hasta el año 1952, que se descubrió su actividad esterilizante contra MTB, debido a su analogía estructural con la nicotinamida (Vitamina B3). Reportándose que la concentración mínima inhibitoria de la PZA para MTB está en el rango de 6.25 a 50 µg/ml, a un pH de 5.5 (9).

La PZA ingresa a MTB mediante difusión pasiva, atravesando la envoltura celular hasta llegar al citoplasma (pH 7.2) (8). Al ser una prodroga, se debe llevar a cabo una reacción química antes de que la PZA se pueda convertir en un compuesto farmacológicamente activo. Es así como, en el citoplasma de MTB, la PZA se convierte en ácido pirazinoico (POA), un ácido débil (pKa = 2.9), por acción de la enzima pirazinamidasa (PZAsa) (8). La cual es codificada por el gen *pncA*, siendo

aquellas mutaciones que conlleven la pérdida de función de esta enzima, la principal causa de resistencia a la PZA en aislados clínicos (8, 9).

Una vez que la PZA se convierte en POA, droga activa, se proponen diversos mecanismos de acción (8).

2.2. POA inhibe la síntesis de Coenzima A estimulando la degradación de la enzima L-aspartato descarboxilasa por la proteasa caseinolítica ClpC1-ClpP

Con el objetivo de descubrir nuevos mecanismos de resistencia a la PZA en MTB, Zhang & et al aislaron y caracterizaron 174 cepas mutantes resistentes a PZA generadas *in vitro* (10). De las cuales, 169 poseían mutaciones en el gen *pncA*, evitando la conversión de PZA a POA, lo que explicaría la resistencia del fármaco en MTB. Mientras que las 5 cepas restantes, no presentaban mutación alguna en *pncA* (*wild type*), sino que albergaban mutaciones sin sentido en el gen *panD* (10). El cual codifica la enzima L-aspartato descarboxilasa (PanD), implicada en la ruta biosintética de Coenzima A (CoA) de MTB (10).

Basado en la evidencia genética anterior, se propuso como mecanismo de acción de la PZA: la inhibición de la ruta biosintética de CoA por la unión de POA a PanD (7). En esta ruta, la enzima pantotenato sintetasa (PanC) cataliza la reacción entre β -alanina y L-pantoato para la síntesis de novo de pantotenato, metabolito que es posteriormente procesado para producir CoA (8, 11). Asu vez, la β -alanina, precursor del pantotenato, se forma mediante la descarboxilación del L-aspartato, paso limitante catalizado por PanD (11). Las bacterias, plantas y hongos sintetizan pantotenato a partir de aminoácidos intermediarios, a comparación de los humanos, en los que es un requisito nutricional (12). Además, la actividad de la enzima PanD proporciona la principal vía de producción de β -alanina en bacterias (12) y se ha comprobado que la biosíntesis de CoA es esencial en MTB, tanto *in vitro* como *in vivo* (7). Por lo que el bloqueo de esta ruta representa un atractivo mecanismo de acción para PZA (11).

En apoyo a esta propuesta, estudios bioquímicos y biofísicos han demostrado que la enzima PanD de MTB forma un dímero de tetrámeros (11). Además, el extremo N terminal de un monómero interactúa con el extremo C terminal de otro adyacente, permitiendo la oligomerización y la unión de POA (11). Quedando demostrada la interacción entre POA y PanD, Gopal & et al calcularon que la constante de disociación en equilibrio (K_D) entre ambas es de $6.1 \mu\text{M} \pm 0.88 \mu\text{M}$, reflejando una débil afinidad entre POA y PanD (13). Más aún, estudios posteriores analizaron el efecto inhibitorio de POA sobre la función de PanD, es decir, la conversión enzimática de L-aspartato a β -alanina (14). Sorprendentemente, a altas concentraciones de POA (2 mM) la formación del producto, β -alanina, se redujo en solo un 47%, sugiriendo un débil efecto inhibitorio (14).

Entonces, si POA no inhibe eficazmente la actividad catalítica de PanD, ¿cómo bloquea el paso catalizado por esta enzima, en la ruta biosintética de CoA en MTB?

Previamente, se habían aislado cepas de MTB resistentes a PZA, tanto in vivo como in vitro, que presentaban mutaciones en la proteína ClpC1, un componente de la proteasa caseinolítica ClpC1-ClpP (7). En específico, ClpC1 es una proteína que reconoce etiquetas de degradación situadas en el extremo C terminal de otras proteínas, derivándolas hacia la proteasa ClpP para su degradación (7). De tal forma, que el complejo ClpC1-ClpP participa en el mantenimiento y regulación del proteoma. Curiosamente, el nivel de resistencia conferido por mutaciones en ClpC1 es mismo nivel de resistencia provocado por mutaciones en PanD (7). Por lo tanto, se sugiere un vínculo mecánico entre ambas (7).

El cual es evidenciado gracias a que las mutaciones identificadas por Zhang & et al en la enzima PanD, están localizadas en los últimos 13 aminoácidos de su extremo C terminal (8). Por su parte, Gopal & et al demostraron que mutaciones presentes en este mismo extremo, previenen la unión entre POA y PanD. Así mismo, que POA causa la reducción de los niveles endógenos de PanD (14). Confirmándose así que el extremo C terminal de PanD es una etiqueta de degradación que es reconocida por ClpC1 y que PanD es sustrato del complejo proteasa caseinolítica ClpC1-ClpP (14).

En conjunto, todos estos datos proponen que el mecanismo de acción de la PZA sería la inhibición de la ruta biosintética de CoA en MTB, gracias a que POA se une a PanD y estimula su degradación por la proteasa caseinolítica ClpC1-ClpP (14).

2.3. Factores de estrés presentes en el estado de latencia de MTB y el mecanismo de acción de PZA

La PZA es un fármaco antituberculoso poco convencional y paradójico (9, 10, 15). Ya que, a pesar de su notable actividad esterilizante in vivo, la PZA no es efectiva contra MTB en condiciones de cultivo in vitro normales, cercanas a pH neutro (9, 15). Gracias a la experimentación de McDermott y Thompsett, se demostró que el medio de cultivo necesario para que la PZA ejerza su efecto bactericida, debe ser ligeramente ácido (pH = 5.8) (16). Esta peculiar observación, proporciona evidencia de la importancia del entorno del huésped en la actividad del fármaco (16). Pues MTB se encuentra restringida dentro de los compartimentos celulares del hospedador, en donde experimenta múltiples factores de estrés. Siendo muy probable que estas condiciones sean las responsables de una mayor actividad de la PZA in vivo (16).

La fagocitosis de los bacilos de MTB por los macrófagos alveolares, junto con la formación del granuloma, crean un entorno avascular, inflamatorio y necrótico (17). El cual se caracteriza por niveles bajos de oxígeno, pH ácido, presencia de enzimas hidrolíticas, estrés oxidativo y

limitación de nutrientes (6, 17). Por lo que se propone que estas condiciones impulsen la reducción de la tasa metabólica, propia de bacilos de MTB en estado de latencia (6). Los que se verán obligados a activar una serie de vías para asegurar su estabilidad proteica, reducción del gasto energético, regulación homeostática y el mantenimiento de un nivel metabólico basal (17). Lo que resulta en el establecimiento de la ITBL (17).

Curiosamente, algunos autores proponen que el pH ácido es un requisito para la actividad de la PZA en condiciones in vitro (9, 15). Mientras que otros, no lo consideran indispensable, pero sí importante para inducir la susceptibilidad de MTB a la PZA en entornos acelulares (16). Así mismo, estudios demuestran que factores de estrés como inanición (18) e hipoxia (19), potencian el efecto de la PZA. Inclusive, se ha demostrado la importancia del pH ácido, inanición e hipoxia cuando los bacilos residen dentro de los macrófagos, en los granulomas (20).

Todos estos datos interesantes, sugieren que la heterogeneidad de la patología pulmonar y el microambiente de las lesiones tuberculosas, tienen influencia en la actividad esterilizante y, por lo tanto, en el mecanismo de acción de la PZA (16). Es por esto que se propone su consideración en las investigaciones.

3. Metabolómica aplicada al estudio de mecanismos de acción de drogas

3.1. Bases de la metabolómica

La metabolómica es el estudio del metabolismo a nivel global (21). Es decir, los estudios metabolómicos extraen información de eventos bioquímicos globales al identificar, cuantificar y analizar miles de moléculas pequeñas en células, tejidos, fluidos biológicos, etc. Teniendo en cuenta que el metaboloma es representativo del estado fisiológico general en el que se encuentra un organismo, entonces, se podrá dilucidar la interacción compleja entre la genética, expresión de proteínas y el medio ambiente (21).

Para lograr este objetivo, primero, se obtienen las muestras de interés (ej. plasma, masa celular, biopsias de tejido, etc). Luego, se extraen las moléculas de la muestra y se analizan con técnicas que permiten separarlas, cuantificarlas e identificarlas (ej. cromatografía líquida y de gases, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, cromatografía líquida con detección electroquímica, etc). Después, la información recopilada es depurada para ser procesada con diversos tipos de software (21). De esta manera, se extraen los perfiles metabolómicos que representan el estado de un organismo en un momento, o ante un estímulo determinado. Es por esto que, mediante estudios metabolómicos, podemos evaluar el efecto de dos o más condiciones en el metaboloma de un microorganismo (21).

3.2. Antecedentes del uso de metabolómica en la investigación de mecanismos de acción de fármacos contra TB

El enfoque de metabolómica se ha utilizado previamente para dilucidar el mecanismo de acción de fármacos contra la TB. Un claro ejemplo es el uso de metabolómica basada en espectrometría de masas de isótopos estables para investigar el mecanismo de acción de la D-cicloserina (DCS), un antibiótico aprobado por la FDA para el tratamiento de la TB (22). In vitro, la DCS disrumpe la vía metabólica de la D-alanina involucrada en la biosíntesis de peptidoglicano, mediante la inhibición de dos enzimas: alanina racemasa (Alr) y D-alanina: D-alanina ligasa (Ddl). Sin embargo, los estudios proporcionaron evidencia de la inhibición preferencial de la enzima Ddl por parte de DCS en MTB. También, se observó un débil efecto inhibitorio de la enzima Alr, por lo que se sugirió un comportamiento sinérgico, que provoca la interrupción del flujo metabólico de la D-alanina, ejerciendo así su efecto esterilizante (22).

3.3. Predicción del mecanismo de acción *in vivo* de potenciales fármacos mediante metabolómica

Se ha evidenciado una reducción en la aprobación de nuevos antibióticos, debido a la dificultad para determinar el mecanismo de acción *in vivo* y la eficacia de los potenciales fármacos (23). Ante esto, un estudio describió un método eficaz para alcanzar este objetivo a partir de un análisis metabolómico basado en espectroscopía de resonancia magnética nuclear (H^1 RMN) (23). Primero, se obtuvo el perfil metabólico de 12 fármacos con actividad contra TB y con mecanismos de acción conocidos. Luego, por un análisis discriminante de mínimos cuadrados (OPLS-DA), se clasificó 3 compuestos efectivos contra TB, pero con mecanismos de acción desconocidos. Es así como se llegó a predecir que la amiodarona, clorprotixeno y clofazimina inhiben la formación de la pared celular de *M. smegmatis*, el modelo de investigación utilizado (23).

Quedando demostrado que distintos antibióticos afectan de forma única el metaboloma de *M. smegmatis*. Además, que los cambios metabolómicos están directamente correlacionados con el mecanismo de acción de los fármacos contra TB (23). Por lo tanto, el análisis metabolómico H^1 RMN es un método eficiente para clasificar y predecir los mecanismos de acción de potenciales fármacos.

II. Problema de investigación

El bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causante de la TB, puede permanecer en estado latente dentro del huésped (1, 2). Estado en el que los bacilos reducen reversiblemente su tasa metabólica, evitando su replicación, y causando la ITBL (4). La PZA es un fármaco que tiene especial actividad esterilizante contra los bacilos latentes de MTB, evitando el relapso de la TB (4, 7). Sin embargo, a pesar de su importancia en el tratamiento de esta enfermedad, el mecanismo de acción de la PZA es el menos conocido de todas las drogas contra la TB (10).

Recientemente ha tomado relevancia una propuesta de mecanismo de acción para PZA: POA, molécula activa, estaría bloqueando la ruta biosintética de CoA mediante la estimulación de la degradación de la enzima PanD por la proteasa caseinolítica ClpC1-ClpP (8, 13, 14). Es decir, se sugiere que el mecanismo de acción de PZA/POA implica el descarrilamiento suicida de una vía de regulación postraduccional, en el que POA promueve la degradación de su diana, que es esencial para la supervivencia de MTB (14).

Así lo demuestra la evidencia de que la enzima PanD de MTB, contiene en su extremo C terminal una etiqueta de degradación de trece aminoácidos, capaz de unirse a POA (7). La unión de POA estaría propiciando la exposición de esta etiqueta, la cual sería reconocida y degradada por el complejo proteasa caseinolítica ClpC1-ClpP (7). La reducción de los niveles endógenos de PanD en MTB por causa de POA fue confirmado previamente (14). Además, se observó una mayor degradación de PanD cuando se trató a MTB con PZA que con un fármaco control (isoniacida), comprobando que el aumento de la degradación de PanD en MTB es específico de la acción PZA/POA y no del efecto general del tratamiento farmacológico (14).

Así mismo, mediante un análisis metabolómico en *M. bovis* BCG, se evaluó el efecto de POA en los intermediarios de la ruta biosintética de CoA (13). Llegándose a observar una reducción de los niveles de β -alanina y de los demás metabolitos posteriores a la reacción catalizada por PanD, incluyendo CoA (13). No obstante, el nivel de L-aspartato, el sustrato de PanD, no se vio afectado por el tratamiento con POA (13). Cabe resaltar que este efecto fue dependiente del tiempo de exposición y de la concentración de POA (13).

Por lo anterior, se sugiere que, si POA disminuye los intermediarios metabólicos de la ruta biosintética de CoA, entonces suplementando el medio con dichos intermediarios, el efecto de POA se antagonizaría. Dillon & et al llevaron a cabo estos experimentos, descubriendo que la suplementación de cepas prototróficas de MTB con pantotenato, β -alanina y otros metabolitos intermediarios, antagoniza el efecto de PZA/POA (24). Adicionalmente, otro estudio determinó que los niveles de mRNA de PanD no se vieron afectados por el tratamiento con POA, de tal manera que se descartan efectos a nivel transcripcional (14). En resumen, todos estos datos

apoyan la propuesta de la inhibición de la ruta biosintética de CoA por parte de POA, como mecanismo de acción de la PZA.

In vivo, los bacilos latentes de MTB están presentes dentro de los granulomas sólidos, donde están expuestos a condiciones de estrés (6, 17). Siendo las más representativas: pH ácido, inanición e hipoxia (20). Dado que el microambiente de las lesiones tuberculosas influye en la actividad esterilizante de PZA, se sugiere la consideración de estas condiciones en las investigaciones (16). Curiosamente, un factor común entre todos los estudios que demuestran la actividad de PZA/POA, es que la comprueban bajo condiciones que provocan una respuesta al estrés en MTB (25). Esto quiere decir que para observar actividad esterilizante de PZA, los bacilos de MTB tienen que someterse a condiciones que les generen estrés (pH ácido, pH alcalino, limitación de nutrientes, temperaturas bajas e hipoxia (8)) (25).

Ante esto, Anthony & et al plantearon la hipótesis de que estos factores estresantes conducen un cambio de fenotipo en las bacterias, hacia un estado en el que la diana de POA sea esencial para MTB (25). Es decir, que la diana de POA, bajo condiciones normales, no logra ser esencial para MTB, por lo que la PZA no ejerce su efecto bactericida. Mientras que, bajo condiciones estresantes, la diana de POA será esencial para la supervivencia de MTB, por lo que la droga ejerce un efecto esterilizante.

Si analizamos en conjunto esta hipótesis con el mecanismo de acción propuesto, resulta interesante acotar que, mediante un enfoque genómico, se comprobó la esencialidad de PanD para el crecimiento de MTB en medio mínimo (26). Lo cual sugiere la importancia de PanD bajo condiciones limitadas de nutrientes, factor estresante que está presente durante el estado de latencia de MTB. Además, las proteasas Clp son esenciales para la viabilidad de MTB, ya que degradan selectivamente proteínas mal plegadas acumuladas bajo condiciones de estrés (4). Lo cual se relaciona con la hipótesis planteada por Anthony & et al.

Por otro lado, la ruta biosintética de CoA es importante para los bacilos no replicantes de MTB, así lo reveló un estudio del exometaboloma de estas bacterias (27). Así vez, se ha demostrado que factores de estrés como inanición e hipoxia disminuyen las reservas de CoA (8), además de aumentar la sensibilidad de MTB a la PZA (18, 19). Todo esto sugiere la esencialidad de la ruta biosintética de CoA en MTB bajo condiciones de estrés. A pesar de esto, hasta el momento, no se ha llevado a cabo un estudio que considere los principales factores de estrés presentes en el estado de latencia de MTB (pH ácido, inanición e hipoxia), en el mecanismo de acción propuesto para PZA: la inhibición de la ruta biosintética de CoA mediante la degradación de la enzima PanD por la proteasa caseinolítica ClpC1-ClpP.

Es por esto que, el presente proyecto plantea realizar un análisis metabólico para evaluar el efecto de la PZA en los intermediarios de la ruta biosintética de CoA en MTB, sometida a los

principales factores de estrés relacionados con el estado de latencia: pH ácido, inanición e hipoxia. Por lo que proponemos la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál será el efecto de la PZA sobre los intermediarios metabólicos de la ruta biosintética de CoA en MTB bajo condiciones de estrés (pH ácido, inanición e hipoxia)? De tal forma que se integre al conocimiento del mecanismo de acción de la PZA, la influencia de los factores de estrés más representativos del estado de latencia de MTB.

III. Estrategia de investigación

Para responder a la pregunta de investigación, se realizará un análisis metabolómico basado en espectroscopía de resonancia magnética nuclear (H^1 RMN). Así se evaluará el efecto de la PZA en los intermediarios metabólicos de la ruta biosintética de CoA, en MTB (cepa H37Rv) bajo las condiciones de estrés más representativas del estado de latencia: pH ácido (9, 15), inanición (18) e hipoxia (19). Claramente, los modelos in vitro no pueden replicar todas las condiciones complejas en la que subyacen los bacilos en la ITBL (28). Sin embargo, se utilizarán modelos que muestren características importantes del estado de latencia de MTB, como: resistencia a fármacos antituberculosos (principalmente isoniacida), restricción del crecimiento y de la replicación celular (28). El termino correcto para referirse a estas bacterias viables, pero con características del estado de latencia de MTB, es dormancia (28).

En este estudio se inducirá la dormancia exponiendo a las bacterias a pH ácido, inanición e hipoxia. En cuanto al primero, se ajustará el medio de cultivo (caldo Middlebrook 7H9+OADC+Tween 80) a pH=5.0 y se verificará la inducción de dormancia mediante el fenotipo resistente a isoniacida, señal de la reducción del metabolismo bacteriano (17, 20). Para el segundo modelo, se cultivará MTB por 7 días, luego se obtendrá la masa celular por centrifugación y se resuspenderá en PBS (17, 28). Corroborando la dormancia mediante la resistencia a isoniacida (17, 28). Finalmente, para el modelo de hipoxia, se cultivará MTB en un recipiente sellado hasta alcanzar un nivel de saturación de O_2 igual a 0.06% (17). También se verificará por el fenotipo resistente a isoniacida, pero sensible a metronidazol, fármaco sin efecto inhibitor en condiciones aeróbicas (17).

Una vez inducida la dormancia a través de los tres factores estresantes, se procederá siguiendo lo propuesto por Gopal & et al (13). Por cada factor estresante, se trabajará con 4 réplicas de cultivos de MTB dormantes y 4 réplicas control, cultivos sin estrés ni tratamiento con PZA. En cuanto a las réplicas experimentales, se les adicionará una concentración subletal de PZA y se tomará una muestra de cada una de las réplicas a las 0, 4 y 24 h. Luego, cada una de las muestras tomadas (4 por cada tiempo) se centrifugará y se agrupará en un solo tubo, obteniendo una sola muestra por cada punto en el tiempo. Estos sedimentos celulares se almacenarán a $-80^{\circ}C$. La totalidad de

muestras se enviarán al Centro de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear del Departamento de Ciencias, Sección Química de la PUCP, para realizar el análisis metabolómico.

Referencias bibliográficas

1. WHO. Global tuberculosis report 2020. Genova: World Health Organization; 2020.
2. Houben, R, Dodd, P. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. PLoS Med. 2016;13(10): e1002152.
3. WHO. Latent tuberculosis infection: updated and consolidated guidelines for programmatic management. (1st ed.). Suiza: World Health Organization; 2018.
4. Caño-muñiz, S, Anthony, R, Niemann, S, Alffenaar, J. New Approaches and Therapeutic Options for Mycobacterium tuberculosis in a Dormant State. Clinical Microbiology Reviews. 2017;31(1): e00060-17.
5. Kolloli, A, & *et al.* Granulomatous Response to Mycobacterium tuberculosis Infection. In: Vishwanath, V (ed.) Understanding the Host Immune Response Against Mycobacterium tuberculosis Infection. Suiza: Springer International Publishing; 2018. p. 41-50.
6. Gengenbacher, M, Kaufmann, S.H. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(3): 514-32.
7. Gopal, P, Grüber, G, Dartois, V, Dick, T. Pharmacological and Molecular Mechanisms Behind the Sterilizing Activity of Pyrazinamide. Trends in Pharmacological Sciences. 2019;40(12): 930-940.
8. Lamont, A, Dillon, N, Baughn, A. The Bewildering Antitubercular Action of Pirazinamide. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2020;84(2): e00070-19.
9. Zhang, Y, Mitchison, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. Int J Tuberc Lung Dis. 2003;7(1): 6-21.
10. Zhang, S, Chen, J, Shi, W & *et al.* Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. Emerg Microbes Infect. 2013;2(6): e34.
11. Ragunathan, P, Cole, M, Latka C, & *et al.* Mycobacterium tuberculosis PanD Structure-Function Analysis and Identification of a Potent Pyrazinoic Acid-Derived Enzyme Inhibitor. ACS Chem Biol. 2021.
12. Gopalan, G, Chopra, S, Ranganathan, A, & *et al.* Crystal structure of uncleaved L-aspartate-alpha-decarboxylase from Mycobacterium tuberculosis. Proteins. 2006;65(4): 796-802.

13. Gopal, P, narthey, W, ragunathan, P, Sarathy, J, & *et al.* Pyrazinoic Acid Inhibits Mycobacterial Coenzyme A Biosynthesis by Binding to Aspartate Decarboxylase PanD. *ACS Infect Di.* 2017;3(1): 807–819.
14. Gopal, P, Sarathy, J, Yee , M, & *et al.* Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase. *Nature Communications.* 2020;11(1): 1661.
15. Zhang, Y, Wade, M, Scorpio, A. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(5): 790-795.
16. Lamont, E, Baughn, A. Impact of the host environment on the antitubercular action of pyrazinamide. *EBioMedicine.* 2019;49(1): 374-380.
17. Campaniço, A, Harjivan, S.G, Warner, D.F, & *et al.* Addressing Latent Tuberculosis: New Advances in Mimicking the Disease, Discovering Key Targets, and Designing Hit Compounds. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22): 8854.
18. Huang, Q, Chen, Z.F, Li, Y.Y, & *et al.* Nutrient-Starved Incubation Conditions Enhance Pyrazinamide Activity against Mycobacterium tuberculosis. *Chemotherapy.* 2007;53: 338-343.
19. Wade, M, Zhang, Y. Anaerobic incubation conditions enhance pyrazinamide activity against Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Medical Microbiology.* 2004;53: 769–773.
20. Batyrshina, Y, Schwartz, Y. Modeling of Mycobacterium tuberculosis dormancy in bacterial cultures. *Tuberculosis (Edinb).* 2019;117(1): 7-17.
21. Kaddurah-daouk, R, Kristal, B.S, Weinshilboum, R.M. Metabolomics: A global biochemical approach to drug response and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48(1): 653-83.
22. Prosser, G.A, De carvalho, L.P. Metabolomics Reveal d-Alanine:d-Alanine Ligase As the Target of d-Cycloserine in Mycobacterium tuberculosis. *ACS Med Chem Lett.* 2013;4(12): 1233-1237.
23. Halouska, S, Fenton, R, Barletta, R, Powers, R. Predicting the in vivo Mechanism of Action for Drug Leads using NMR Metabolomics. *ACS Chem Biol.* 2012;7(1): 166–171.
24. Dillon, N, Peterson, N, Rosen, B, Baughn, A. Pantothenate and Pantetheine Antagonize the Antitubercular Activity of Pyrazinamide. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(12): 7258–7263.
25. Anthony, R, Den Hertog, A, Van Soolingen, D. ‘Happy the man, who, studying nature’s laws, Thro’ known effects can trace the secret cause’ † Do we have enough pieces to solve the pyrazinamide puzzle?. *Antimicrob Chemother.* 2018;73(7): 1750–1754.

26. Minato, Y, Gohl, D, Thiede, J, Chacón, J, & *et al.* Genomewide Assessment of Mycobacterium tuberculosis Conditionally Essential Metabolic Pathways. *MSystems*. 2019;4(4): e00070-19.
27. Zimmermann, M, Kuehne, A, Boshoff, H, Barry III, C, & *et al.* Dynamic exometabolome analysis reveals active metabolic pathways in non-replicating mycobacteria. *Environmental Microbiology*. 2015;17(11): 4802–4815.
28. Dutta, N, Karakousis, P. Latent tuberculosis infection: myths, models, and molecular mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78(3): 343-371.