

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

ATPasas tipo P de *Mycobacterium tuberculosis* como dianas para el diseño racional de compuestos antituberculosos

Paola Andrea Santos Ruiz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Bogotá D.C., Colombia
Febrero de 2020

ATPasas tipo P de *Mycobacterium tuberculosis* como dianas para el diseño racional de compuestos antituberculosos

Paola Andrea Santos Ruiz

Bacterióloga, M.Sc. Bioquímica

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias-Bioquímica

Director:

Carlos Yesid Soto Ospina

Químico., M.Sc., Ph.D.

Departamento de Química

Universidad Nacional de Colombia

Codirector:

Fabián Harvey López Vallejo

Químico., Ph.D.

Departamento de Química

Universidad Nacional de Colombia

Grupo de Investigación: Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

Febrero de 2020

“Science is not perfect, it is often misused; it is only a tool, but it is the best tool we have. Self-correcting, ever changing, applicable to everything. With this tool, we vanquish the impossible.”

“La ciencia no es perfecta, con frecuencia se utiliza mal; no es más que una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos: se corrige a sí misma, está siempre evolucionando y se puede aplicar a todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible”

Carl Sagan.

Agradecimientos

Que la gratitud en mi corazón bese todo el universo

Hafiz

Resumen

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por el bacilo ácido-alcohol resistente *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). A su vez, la TB es un problema muy relevante de salud pública a nivel mundial. Por otra parte, la aparición de cepas de *Mtb* resistentes a los fármacos antituberculosos actualmente empleados, ha impulsado la búsqueda de dianas terapéuticas alternativas y metodologías para el diseño racional de nuevos fármacos efectivos. En ese sentido, las proteínas de membrana son considerados blancos de interés al ser mayormente accesibles a los compuestos activos. Particularmente los transportadores de membrana ATPasas tipo P son dianas interesantes por su implicación en la homeóstasis iónica y la viabilidad de las micobacterias. El presente trabajo se orientó en CtpF, una ATPasa tipo P de *Mtb* transportadora de Ca^{2+} , relacionada con una gran cantidad de condiciones biológicas asociadas al proceso de infección tales como estrés oxidativo, la adaptación del bacilo tuberculoso a condiciones anaeróbicas, hipoxia y latencia.

Por lo anterior, el objetivo principal de esta Tesis fue determinar mediante análisis *in silico* e *in vitro* el potencial de las ATPasas tipo P de *Mtb*, especialmente el transportador de calcio CtpF, como diana para la búsqueda racional de compuestos con actividad antituberculosa.

Inicialmente se generó un modelo 3D de CtpF por homología, el que fue empleado para identificar las características farmacofóricas del complejo CtpF-ácido ciclopiazónico (CPA), un inhibidor de la Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarco-endoplásmico (SERCA1a), de la que se conoce experimentalmente su estructura 3D, y fue usada como plantilla en la construcción del modelo. Utilizando un repertorio de técnicas experimentales, se evaluó y encontró que CPA causa inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de CtpF, así como actividad micobactericida. El análisis de la respuesta transcripcional de los genes de las ATPasas tipo P2 al tratamiento con CPA, mostró una respuesta específica de *ctpF* en comparación a otras ATPasas tipo P. Estos resultados iniciales permitieron sugerir a CtpF como una diana molecular para el diseño de compuestos con potencial anti-TB.

A continuación, con las características farmacofóricas CtpF-CPA se realizó un cribado virtual basado en farmacóforo utilizando la base de datos ZINC, para seleccionar moléculas

candidatas a inhibidores de CtpF. Estudios de acoplamiento molecular y cálculos de MM-GBSA de los candidatos permitieron la identificación de seis compuestos con la mejor energía libre de unión para ser evaluados *in vitro*.

Los compuestos finalmente seleccionados demostraron tener actividad antimicobacteriana mostrando una concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 50 - 100 $\mu\text{g/mL}$, e inhibición del crecimiento de *Mtb* entre el 29.5 - 64.0 %. De manera similar, causaron inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa en vesículas de membrana de *Mtb* con un rango IC_{50} entre 4.1 - 35.8 μM . Finalmente se evaluó la actividad de los compuestos con mejor respuesta biológica, en un modelo de infección de macrófagos, como un acercamiento al efecto de los compuestos en la sobrevida de *Mtb* durante la infección. El compuesto ZINC63908257 fue seleccionado como el candidato más activo con una CMI de 50 $\mu\text{g/mL}$, inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa con $\text{IC}_{50} = 4.4 \mu\text{M}$ y disminución del 81 % de la replicación intracelular de *Mtb* en macrófagos una vez ocurrida la fagocitosis. Este compuesto demostró un efecto citotóxico del 12.9 % en células MH-S y hemólisis del 2 % de glóbulos rojos humanos, además de presentar propiedades farmacocinéticas adecuadas (drug-like).

El conjunto de resultados obtenidos muestra la importancia de las ATPasas tipo P de *Mtb* para la supervivencia del bacilo durante la infección, e identifican la proteína CtpF como una diana molecular clave para el diseño de nuevos compuestos antituberculosos.

Palabras clave: Tuberculosis; Compuestos antituberculosos; Ácido ciclopiazónico; ATPasas tipo P; Acoplamiento molecular.

Abstract

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by the acid-fast bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), which is one of the most important public health problems worldwide. Furthermore, the emergence of resistant *Mtb* strains to current anti-TB drugs has increased the search for alternative therapeutic targets and methods for the rational design of new effective drugs. In this sense, membrane proteins have been considered interesting targets due to their biological implication and for being highly accessible to active compounds. Particularly, P-type ATPases membrane transporters are interesting targets due to their implication in ionic homeostasis and mycobacterial viability. This work was oriented to CtpF, a calcium P-type ATPase, related to a broad number of biological conditions associated to processes of infection such as oxidative stress, adaptation of tubercle bacilli to anaerobic conditions, hypoxia and latency.

Due to that, the main objective of this doctoral Thesis was to determine, through *in silico* and *in vitro* analysis, the potential of P-type ATPases of *Mtb*, especially the calcium transporter CtpF, as a target for the rational design of anti-TB compounds.

Initially, a 3D homology model of CtpF was generated, which was employed for identified key pharmacophoric features of the CtpF-cyclopiazonic acid (CPA) complex, a well-known inhibitor of the sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA1a), from which its 3D structure is known experimentally and was used as a template in the construction of the model. By using a repertoire of experimental techniques, it was evaluated and found that CPA causes inhibition of the Ca^{2+} -ATPase activity of CtpF, as well as mycobactericidal activity. The analysis of the transcriptional response of P2 ATPases to treatment with CPA showed a specific response of *ctpF* in comparison with other P-type ATPases. These initial results provide evidence that CtpF is a molecular target for the design of compounds with anti-TB potential.

Thereupon, with the CtpF-CPA pharmacophoric features, a pharmacophore-based virtual screening was performed using the ZINC database in order to select candidate molecules to inhibitors of CtpF. Molecular docking-based virtual screening and binding free energy calculations (MM-GBSA) of selected candidates allowed identifying six compounds with the best relative binding energies to be evaluated *in vitro*.

The compounds selected displayed *in vitro* antimycobacterial activity, showing a minimum inhibitory concentrations (MIC) ranging from 50 -100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and growth inhibitions of 29.5 - 64.0 % on *Mtb*. Likewise, they causes inhibition of Ca^{2+} -ATPase activity in *Mtb* membrane vesicles (IC_{50}) ranging from 4.1 - 35.8 μM . Finally, the activity of the compounds with the best biological activity was evaluated in a macrophage infection model, as an approach to evaluate the effect of compounds once the infection has occurred. The compound ZINC63908257 was the best candidate by displaying a MIC of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a Ca^{2+} P-type ATPase inhibition with $\text{IC}_{50} = 4.4 \mu\text{M}$ and 81 % decrease in *Mtb* replication within macrophage. This compound showed cytotoxic activity of 12.9 % in MH-S cells and hemolysis of 2 % of human erythrocytes, thus, this compound shows a good pharmacokinetic profile (drug-like).

Overall, the results presented here shows the importance of the P-type ATPases of *Mtb* for the mycobacteria survival during infection, and identify the CtpF as a key molecular target for the design of new antituberculous compounds.

Keywords: Tuberculosis; Antituberculous compounds; Cyclopiazonic acid; P-type ATPases; Molecular docking.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	IX
Lista de figuras.....	XVI
Lista de tablas.....	XVIII
Lista de símbolos y abreviaturas.....	XIX
Introducción.....	1
1. Marco conceptual y generalidades.....	5
1.1 Generalidades de la Tuberculosis.....	5
1.2 Patogénesis de la Tuberculosis.....	6
1.3 Infección tuberculosa y respuesta inmune.....	7
1.3.1 Supervivencia de <i>Mtb</i> en el fagosoma.....	8
1.3.2 Formación del granuloma tuberculoso e infección latente.....	10
1.3.3 DosR un regulador de estado de latencia de <i>Mtb</i>	12
1.4 Tratamiento actual de la tuberculosis.....	13
1.5 Nuevos compuestos anti-TB en desarrollo.....	15
1.6 Métodos para el diseño de nuevos anti-TB.....	16
1.7 Estrategias experimentales en la búsqueda de nuevos compuestos anti-TB.....	17
1.7.1 Estrategias no racionales.....	18
1.7.2 Estrategias Racionales.....	18
1.7.3 Diseño de fármacos asistido por computadoras (DiFAC).....	19
1.7.4 Diseño de fármacos basado en ligando.....	19
1.7.5 Diseño de fármacos basado en la estructura del receptor.....	20
1.8 Propiedades moleculares de los compuestos anti-TB.....	22
1.9 Dianas terapéuticas para el diseño de nuevos compuestos anti-TB.....	23
1.10 Estructura y clasificación de las ATPasas tipo P.....	25
1.11 Ca ²⁺ -ATPasa de retículo sarco-endoplásmico (SERCA).....	28
1.12 ATPasas tipo P de <i>Mtb</i> , clasificación e implicación biológica.....	31
1.13 CtpF, una Ca ²⁺ -ATPasa de <i>Mtb</i> como diana en el diseño de anti-TB.....	32
2. Justificación.....	35
3. Hipótesis experimental.....	37
4. Objetivos.....	39
4.1 Objetivo general.....	39

4.2	Objetivos específicos.....	39
5.	Métodos y materiales.....	40
5.1	Estudios computacionales.....	41
5.1.1	Modelo 3D de CtpF.....	41
5.1.2	Preparación de las estructuras de los compuestos a evaluar.....	42
5.1.3	Acoplamiento molecular (<i>molecular docking</i>).....	42
5.1.4	Comparación de las secuencias de Ca ²⁺ -ATPasas sensibles y nos sensibles a CPA	43
5.1.5	Cribado virtual (<i>Virtual screening</i>).....	44
5.2	Ensayos biológicos.....	45
5.2.1	Cepas micobacterias y condiciones de cultivo.....	45
5.2.2	Evaluación de la actividad antimicobacteriana de los compuestos seleccionados.....	45
5.2.3	Efecto de CPA y los compuestos seleccionados sobre la actividad Ca ²⁺ -ATPasa en vesículas de membrana de <i>Mtb</i>	47
5.2.4	Evaluación de la actividad citotóxica y hemolítica de los compuestos seleccionados	48
5.2.5	Evaluación del perfil transcripcional de las ATPasas tipo P2 en respuesta a CPA	49
5.2.6	Evaluación del efecto de los compuestos seleccionados en un modelo de infección de macrófagos.....	52
6.	Resultados y discusión.....	57
6.1	Modelo 3D de CtpF por homología.....	57
6.2	Acoplamiento molecular (<i>docking</i>) de CPA con el modelo 3D CtpF- <i>Mtb</i> y SERCA1a.....	59
6.3	Comparación de los residuos de coordinación a CPA en diferentes Ca ²⁺ -ATPasas tipo P	61
6.4	Actividad biológica de CPA.....	63
6.4.1	Efecto de CPA sobre la actividad Ca ²⁺ -ATPasa.....	63
6.4.2	CPA Inhibe el crecimiento de <i>Mtb</i>	66
6.4.3	Perfil de expresión génica de las ATPasas tipo P2 de <i>Mtb</i> en respuesta a CPA	67
6.5	Cribado virtual e identificación de compuestos candidatos a ser evaluados <i>in vitro</i>	70
6.6	Actividad biológica de los compuestos candidatos.....	73
6.6.1	Efecto de los compuestos candidatos sobre la actividad Ca ²⁺ -ATPasa.....	73
6.6.2	Inhibición del crecimiento de <i>Mtb</i> por los compuestos candidatos.....	75
6.6.3	Evaluación de la toxicidad de los compuestos candidatos.....	77
6.7	Los compuestos seleccionados inhiben el crecimiento intracelular de <i>Mtb</i> H37Rv en macrófagos, pero no tienen efecto sobre la fagocitosis.....	79
6.8	Análisis del sitio de unión de los compuestos con mayor actividad biológica.....	85

7.	Observaciones finales y conclusiones	91
8.	Recomendaciones.....	93
A.	Evaluación y comparación de las estructuras cristalográficas de SERCA1a-CPA disponibles en el PDB	95
B.	Alineamiento de las secuencias 3FGO y CtpF	97
C.	Alineamiento múltiple de Ca ²⁺ -ATPasas tipo P de algunas eucariotas y procariotas.....	98
D.	Alineamiento múltiple de algunos transportadores del macrófago alveolar y CtpF 99	
E.	Producción Académica	101
	Referencias	103

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1–1. Mecanismos de respuesta inmune contra <i>Mtb</i>	7
Figura 1–2. Esquema de formación del granuloma clásico en la infección latente de <i>Mtb</i> . ..	11
Figura 1–3. Estructura de los fármacos anti-TB de primera línea.	14
Figura 1–4. Estructura de los algunos fármacos anti-TB usados para el tratamiento de TB-MDR y TB-XDR.	15
Figura 1–5. Programa global de desarrollo de fármacos anti-TB.	16
Figura 1–6. Blancos moleculares y mecanismo de acción de los anti-TB actualmente en uso.	24
Figura 1–7. Esquema de la organización estructural de las ATPasas tipo P.	28
Figura 1–8. Estructura 3D de SERCA1a y 2D de CPA.	30
Figura 6–1. Estructura y validación del modelo 3D de CtpF.	58
Figura 6–2. Acoplamiento molecular de CPA en SERCA1a y CtpF- <i>Mtb</i>	60
Figura 6–3. Alineamiento múltiple de algunas Ca ²⁺ -ATPasas de eucariotas y procariotas.	62
Figura 6–4. Actividad ATPasa basal y estimulada por Ca ²⁺ de <i>Mtb</i> WT y <i>Mtb</i> ΔctpF.	64
Figura 6–5. Efecto de CPA sobre la actividad de Ca ²⁺ -ATPasa normalizada.	65
Figura 6–6. Actividad antimicobacteriana de CPA.	66
Figura 6–7. Respuesta transcripcional de las ATPasas tipo P2 de <i>Mtb</i> frente a CPA.	69
Figura 6–8. Modelo farmacofórico.	71
Figura 6–9. Estructura química de los seis compuestos seleccionados mediante el cribado virtual con la base de datos ZINC.	72
Figura 6–10. Efecto los compuestos seleccionados sobre la actividad Ca ²⁺ -ATPasa normalizada de <i>Mtb</i> WT y <i>Mtb</i> ΔctpF.	75
Figura 6–11. Efecto de los compuestos seleccionados sobre la fagocitosis de <i>Mtb</i> H37Rv. ..	80
Figura 6–12. Efecto de los compuestos seleccionados sobre la viabilidad intracelular de <i>Mtb</i> H37Rv.	81

Figura 6–13. Evaluación de la morfología de las células MH-S bajo el microscopio de luz invertida.	83
Figura 6–14. Representación 3D y 2D de los modos de unión de ZINC63908257 en CtpF.	86
Figura 6–15. Representación 3D y 2D de los modos de unión de ZINC45605493 en CtpF.	87
Figura 6–16. Representación 3D y 2D de los modos de unión de ZINC55090623 en CtpF.	87

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1–1. Estudios para el descubrimiento de compuestos anti-TB empleando combinación de estrategias experimentales y computacionales.....	17
Tabla 1–2. Clasificación de las ATPasas tipo P	26
Tabla 5–1. Ca ²⁺ -ATPasas de células eucariotas y procariotas usadas en el alineamiento múltiple.....	43
Tabla 5–2. Iniciadores usados para análisis por qRT-PCR de los genes de las ATPasas tipo P2.	51
Tabla 6–1. Comparación de los residuos del sitio de unión de CPA en SERCA1a y CtpF.	61
Tabla 6–2. Parámetros utilizados para el análisis por qRT-PCR de los genes de las ATPasas tipo P2 y de <i>ctpA</i>	68
Tabla 6–3. Características moleculares (<i>drug-like</i>) de CPA y los seis compuestos candidatos seleccionados.....	73
Tabla 6–4. Efecto de los compuestos seleccionados sobre la actividad enzimática.	74
Tabla 6–5. Actividad antimicobacteriana de los seis compuestos seleccionados.	76
Tabla 6–6. Citotoxicidad y actividad hemolítica de los seis compuestos seleccionados.	78
Tabla 6–7. Transportadores iónicos en macrófagos alveolares.....	84
Tabla 6–8. Aminoácidos del bolsillo de unión (TMDS M1 - M4) para CPA y los compuestos más activos.	88

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Anti-TB	Anti-tuberculoso
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP *	Adenosina 5'-trifosfato
BCG	Bacilo de Calmette Guérin
BSA *	Albúmina Sérica Bovina
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CPA*	Ácido ciclopiazónico
DBVS*	Cribado virtual basado en acoplamiento molecular
DiFAC	Diseño de fármacos asistido por computadora
DM	Dinámica Molecular
DMSO*	Dimetil Sulfóxido
EMB	Etambutol
FDA*	Agencia de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos
H37Ra	Cepa de referencia no virulenta <i>Mtb</i> H37Ra
H37Rv	Cepa de referencia virulenta <i>Mtb</i> H37Rv
HTSV*	Cribado virtual de alto rendimiento
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
INF γ	Interferón gama
INH	Isoniazida
Min	Minuto
MM-GBSA*	Mecánica molecular con área de superficie generalizada Born
MOI	Multiplicidad de la infección
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OADC	Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa.
OD*	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
P-ATPasa	ATPasa tipo P
PBS *	Búfer fosfato salino
PBVS*	Cribado virtual basado en farmacóforo
PCR*	Reacción en cadena de la polimerasa

Abreviatura	Término
PDB*	Banco de Datos de Proteínas
Pi	Fósforo inorgánico
POPC*	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina
PZA	Pirazinamida
qRT-PCR*	PCR cuantitativa en tiempo real
QSAR*	Relación cuantitativa estructura actividad
RIF	Rifampicina
RMSD*	Desviación cuadrática media
RNS*	Especies de Nitrógeno Reactivo
ROS*	Especies de Oxígeno Reactivo
RPM	Revoluciones por minuto
SERCA	Retículo sarco-endoplásmico
TAES	Terapia Acortada Estrictamente Supervisada
TB	Tuberculosis
TB-MDR	Tuberculosis multi-resistente
TB-XDR	Tuberculosis extremadamente-resistente
U	Unidad de actividad enzimática
UFC	Unidad Formadora de Colonias
V-ATPasa	ATPasa tipo V
VIH	Virus de Inmuno-deficiencia Humana

* Abreviatura original del inglés.

Introducción

La Tuberculosis (TB) continúa siendo una de las principales amenazas para la salud pública a nivel mundial. A pesar de los diversos avances en medicina moderna, se estima que en el 2018, se presentaron 1.2 millones de muertes causadas por TB (World Health Organization, 2019). Este problema ha perdurado por las características de la infección latente, al alto porcentaje de coinfección VIH-TB, la baja efectividad de la vacuna BCG y el surgimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) resistente a los medicamentos tradicionales (Dheda et al., 2017).

La TB activa se trata mediante una combinación de diferentes agentes quimioterapéuticos administrados en un periodo de 6 a 12 meses. La quimioterapia contra la TB no complicada, denominada terapia de primera línea, consiste en una combinación de cuatro fármacos principales, rifampicina (RIF), isoniazida (INH), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA) (Lange, 2015). La larga duración de este tratamiento se debe en parte a la baja permeabilidad a través de la pared celular de *Mtb* (Espinoza-Moraga et al., 2013) y el limitado efecto contra la infección latente (Dheda et al., 2017; Knight et al., 2019).

Si bien el número de casos de TB reportados a nivel mundial se ha mantenido relativamente estable, la resistencia a estos antituberculosos (anti-TB) se ha incrementado, generando una preocupante amenaza a la salud pública. La resistencia simultánea a INH y RIF se define como TB multi-resistente (TB-MDR), condición que en 2018 representó aproximadamente el 18 % del total de muertes por TB (World Health Organization, 2019). Este tipo de resistencia hace necesario cambiar el tratamiento a uno de segunda línea prolongado, con fármacos más tóxicos y costosos. Sin embargo, surge cada vez con más frecuencia una forma de resistencia a los fármacos de primera línea y a las fluoroquinolonas, así como al menos uno de tres fármacos inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina o amikacina) denominada TB extremadamente-resistentes (TB-XDR) (Prestinaci et al., 2015). Adicionalmente han sido reportado algunos casos de una forma de resistencia causada por bacterias resistentes a todos los medicamentos contra la TB usados actualmente denominadas *Mtb* totalmente resistente (*Mtb*-TDR) (Hameed et al., 2018).

La capacidad de *Mtb* para generar rápidamente resistencia a los fármacos, pone en manifiesto la necesidad de identificar blancos terapéuticos alternativos, así como nuevos compuestos anti-TB para ser administrados en combinación con los medicamentos actualmente usados (Cassir et al., 2014; Hofman et al., 2016).

En este sentido diferentes grupos de investigación han trabajado en el desarrollo de compuestos anti-TB. Por ejemplo, el fármaco bedaquiline aprobado para uso regulado en pacientes TB-XDR. Este compuesto tiene como diana la proteína de membrana F_1F_0 ATP sintasa, afectando el bombeo de protones en la membrana de *Mtb* (Dupont et al., 2017; Osborne, 2013). De manera similar, SQ-109 bloquea al transportador de monomicolato de trealosa, MmpL3, encargado de transportar el monomicolato de trealosa, precursor esencial en la biosíntesis de los ácidos micólicos en las micobacterias (Tahlan et al., 2012; Vasava et al., 2017). Estas proteínas de membrana, tienen la ventaja como blancos terapéuticos, que los potenciales compuestos antimicrobianos no necesitan atravesar la membrana celular para encontrar su blanco (Chène, 2002; Palmgren and Nissen, 2011; Yatime et al., 2009).

Por otra parte, algunos trabajos han resaltado la importancia de las proteínas de membrana ATPasas tipo P para la biología de las micobacterias, teniendo en cuenta su importancia en la homeóstasis iónica de cationes metálicos y la supervivencia intrafagosomal de *Mtb* (Padilla-Benavides et al., 2013; Soldati and Neyrolles, 2012). Las ATPasas tipo P han sido blanco para el desarrollo de compuestos antimicrobianos exitosos, como es el caso del anti-malárico artemisina que inhibe la proteína PfATP6, una Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA1a de *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) (Krishna et al., 2010; Naik et al., 2011; Uhlemann et al., 2005; Yatime et al., 2009). Desde este punto de vista, las ATPasas tipo P serían interesantes blancos para el diseño de nuevos compuestos anti-TB.

El genoma de *Mtb* contiene 11 ATPasas tipo P que se han podido clasificar en dos grupos de acuerdo con la naturaleza de los iones transportados: 1) transportadores de metales pesados como CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpG, CtpJ y CtpV, y 2) transportadores de metales alcalinos y/o alcalinotérreos como CtpE, CtpF, CtpH, y CtpI (Cole et al., 1998; Novoa-Aponte et al., 2012).

Varios estudios señalan el papel relevante de las ATPasas tipo P de *Mtb* en diferentes funciones biológicas. Autores han demostrado que CtpV, se encuentra involucrada en la tolerancia al Cu^{2+} (Ward et al., 2010), CtpC ha sido asociada con el eflujo de Zn^{2+} (Padilla-Benavides et al., 2013), y CtpD muestra afinidad tanto a Co^{2+} and Zn^{2+} sugiriendo que se trata de una enzima multifuncional (Raimunda et al., 2012). Bajo condiciones experimentales que simulan la infección latente, las micobacterias regulan negativamente las ATPasas tipo P, excepto aquellas que son esenciales para la actividad de las ATPasa en escasez de ATP,

como los transportadores de Na^+/K^+ y Ca^{2+} (Pulido et al., 2014).

El presente trabajo se centra en el estudio de CtpF (Rv1997) una ATPasa tipo P de *Mtb*, implicada en el eflujo de Ca^{2+} y la respuesta al estrés oxidativo (Maya-Hoyos et al., 2019), como blanco para el diseño de nuevos compuestos anti-TB. Estudios previos han evidenciado que esta proteína es activada como respuesta a las condiciones de estrés enfrentadas durante la infección micobacteriana (Novoa-Aponte and Soto Ospina, 2014). El gen *ctpF* es uno de los cerca de 50 genes incluidos en el regulón DosR, relevante para la adaptación del bacilo a las condiciones de baja tensión de oxígeno y la entrada en el estado de latencia (Pulido et al., 2014). Durante la infección y ataque del macrófago, *Mtb* también se ve enfrentado a altas concentraciones de calcio, por lo que CtpF haría parte de los sistema de respuesta que le aseguran mantener las concentraciones de este metal dentro de los rangos intracelulares normales (Sharma and Meena, 2017).

CtpF es la ATPasa tipo P micobacteriana filogenéticamente más cercana (35.3 % de identidad) a la proteína Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarco-endoplásmico (SERCA1a). Esta ATPasa ha sido ampliamente estudiada y su estructura 3D ha sido resuelta por cristalografía de rayos X en diferentes estados conformacionales y unida a diferentes ligandos (Bublitz et al., 2012; Gutmann et al., 2015). El ácido ciclopiazónico (CPA) es un ácido indol tetrámico, tóxico producido por *Penicillium* o *Aspergillus*, inhibe la actividad Ca^{2+} -ATPasa de SERCA1a al bloquear los segmentos transmembranales (TMD) implicados en el transporte del calcio (Olesen et al., 2007; Yao et al., 2011). De manera similar, CPA afecta el transporte de calcio mediado por la proteína PfATP6 de *P. falciparum* homóloga a SERCA1a.

Como punto de partida, se evaluó y evidenció la capacidad de CPA de inhibir la actividad Ca^{2+} -ATPasa mediada por CtpF en *Mtb*, de manera similar como sucede con sus homólogos SERCA1a y PfATP6. Además, se demostró que también causó inhibición del crecimiento de las micobacterias, sugiriendo una relación entre la actividad de esta proteína con la viabilidad de *Mtb*. El análisis de expresión de genes de las ATPasas tipo P2, transportadoras de metales alcalinos y/o alcalinotérreos (*ctpE*, *ctpF*, *ctpH*, y *ctpI*) de *Mtb* en respuesta a CPA, mostró una activación del gen *ctpF* en comparación a otras ATPasas tipo P2. El conjunto de estos resultados permitió proponer a CtpF como diana para el diseño de compuestos anti-TB.

Teniendo en cuenta lo anterior, se construyó un modelo 3D para CtpF por homología usando la estructura SERCA1a co-cristalizada con una molécula de CPA como plantilla. Este modelo 3D fue empleado para identificar las características farmacofóricas del complejo CtpF-CPA. Estas características farmacofóricas fueron empleadas para ejecutar un cribado virtual basado en farmacóforo con la base de datos ZINC, para la identificación de moléculas candidatas a inhibidores de CtpF. Estudios de acoplamiento molecular y cálculos MM-GBSA de los

candidatos permitieron la identificación de seis compuestos con la mejor energía libre de unión para ser evaluados *in vitro*. Estos compuestos demostraron tener actividad antimicobacteriana con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 50 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e inhibición del crecimiento de *Mtb* H37Rv del 29.5 to 64.0 %. De manera similar a CPA, causaron disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa en vesículas de membrana de *Mtb* con un rango IC_{50} de 4.1 a 35.8 μM . La evaluación de los compuestos más activos en el modelo de infección en macrófagos demostró que también tienen efecto para la sobrevivencia de *Mtb* H37Rv durante la infección de los macrófagos alveolares de la línea MH-S sin afectar la fagocitosis.

El compuesto ZINC63908257 fue el candidato más activo con una CMI de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de 45 % ($\text{IC}_{50} = 4.4 \mu\text{M}$) e inhibición de la replicación intracelular *Mtb* H37Rv en un 81.3 %. Este compuesto demostró un efecto citotóxico de 12.9 % y hemólisis del 2 % en células eucariotas, además de presentar propiedades farmacocinéticas adecuadas (drug-like).

En general los resultados presentados indican que las ATPasas tipo P de *Mtb* como CtpF son dianas moleculares claves para el diseño de nuevos compuestos anti-TB.

1. Marco conceptual y generalidades

1.1 Generalidades de la Tuberculosis

La TB es una enfermedad infecciosa, causada por *Mtb*, considerada un problema relevante de salud pública a nivel mundial (World Health Organization, 2019). Aunque esta bacteria afecta principalmente a los pulmones, puede atacar el sistema nervioso central, el sistema linfático, circulatorio, genitourinario, gastrointestinal, óseo, articulaciones y la piel (Toro et al., 2006).

Mtb también conocida como bacilo tuberculoso es una bacteria ácido-alcohol resistente que tiene un tiempo de generación muy largo (~24 horas), así como la capacidad de entrar en periodos de latencia dificultando la acción terapéutica de compuestos dirigidos contra su metabolismo activo (Dheda et al., 2017). Posee una envoltura que, de manera general está formada por un conjunto complejo de moléculas que la protege, le da forma y le proporciona mecanismos para el tráfico de sustancias entre en interior y el exterior celular. Esta envoltura está constituida por tres componentes: La cápsula, cuya síntesis parece estar controlada por mecanismos reguladores dependientes del huésped en micobacterias patógenas; la pared celular, formada por unión covalente entre peptidoglicano, arabinogalactano y los ácidos micólicos; y por último, la membrana citoplasmática, cuya composición es similar a la de otras bacterias (Daffé and Draper, 1998; Gorocica et al., 2005; Niederweis et al., 2010).

A pesar que la TB ha afectado a la humanidad a través de su historia, y del interés de la comunidad científica internacional, los estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportan en el último año, cerca de 10 millones de enfermos y 1,2 millones de muertes causadas por TB, de las que más del 95 % ocurrieron en países en desarrollo (World Health Organization, 2019). Los casos de infecciones micobacterianas se han incrementado recientemente, principalmente por la co-infección con el VIH, la aparición de cepas de micobacterias resistentes a los fármacos anti-TB y la existencia de la TB latente (Gandhi et al., 2010). Adicionalmente, la vía de transmisión y las características del desarrollo de la enfermedad han hecho que el control de la TB sea actualmente un reto.

Las diferentes estrategias que actualmente se utilizan para hacer frente a la TB incluyen la vacuna atenuada BCG de efectividad altamente variable y actividad restringida a las formas miliares de la enfermedad (Andersen and Doherty, 2005), quimioterapia y estrategia de tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES), intervenciones nutricionales (vitaminas u oligoelementos) y programas de política de salud pública, entre otras (World Health Organization, 2019). Sin embargo, los datos reportados de incidencia de TB a nivel mundial demuestran que estas herramientas no son efectivas y destacan la importancia del desarrollo de nuevos anti-TB, que puedan hacer frente a esta epidemia.

1.2 Patogénesis de la Tuberculosis

La TB se transmite por vía aérea mediante la inhalación de gotículas de aerosol que contienen la micobacteria, desde una persona con enfermedad activa hacia un receptor susceptible. Este contacto se supone es alto y exponencial; sin embargo, solo un pequeño porcentaje de los infectados desarrollará la enfermedad, mientras que su mayoría portará una TB latente, un estado en el que *Mtb* está presente pero no hay respuesta inmunológica al bacilo (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

Las etapas iniciales de la infección se caracterizan por una respuesta inmune innata por parte del hospedero, en donde la bacteria es fagocitada por macrófagos y células dendríticas en los alveolos pulmonares (Cambier et al., 2014). Esta fagocitosis inicia una cascada de eventos que en muchos casos resulta en el control de la micobacteria, seguida por la infección latente, o en menor proporción a una progresión a una enfermedad activa, llamada TB progresiva primaria (Figura 1.1). La ruta que se escoja depende esencialmente del estado inmunológico de hospedero y del balance que ocurra entre esta respuesta y la capacidad de la bacteria para destruir el macrófago y dispersarse a otros tejidos por vías linfáticas o vasculares (Gengenbacher and Kaufmann, 2012). Aproximadamente un 10 % de las personas que presentan infección latente, desarrollarán TB activa en algún momento de sus vidas. Este porcentaje puede incrementarse dependiendo de las deficiencias del sistema inmune como en casos de coinfección VIH-TB, diabetes, tabaquismo o en otros casos de enfermedades autoinmunes.

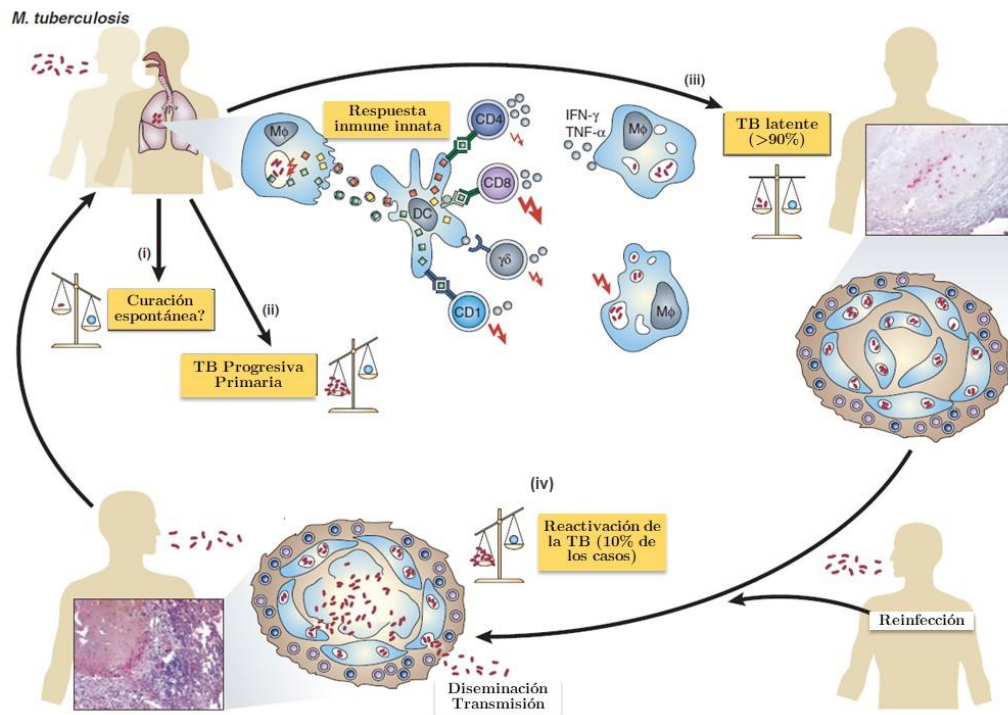


Figura 1–1. Mecanismos de respuesta inmune contra *Mtb*.

Del balance que ocurra entre la respuesta inmune del hospedero y la capacidad de *Mtb* de evadir esta respuesta, la patogénesis la TB puede tomar diferentes vías: (i) curación espontánea; (ii) TB progresiva primaria (iii) TB latente (iv) reactivación. Figura tomada y adaptada al español de la referencia (Kaufmann and McMichael, 2005).

1.3 Infección tuberculosa y respuesta inmune

Uno de los pasos iniciales más importantes de la respuesta inmune innata es la internalización de *Mtb* por los macrófagos, en un evento conocido como fagocitosis. Las bacterias fagocitadas son confinadas en vacuolas, las cuales son procesadas a través de una serie de interacciones con vesículas endosomales tempranas y tardías. En estos compartimentos, los bacilos tuberculosos pueden sobrevivir y se multiplican lentamente, ocurriendo una división bacteriana cada 25 a 32 horas. Los macrófagos infectados son inmediatamente activados por linfoquinas, principalmente el interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), ayudando a destruir de forma eficiente los bacilos. Las linfoquinas son sustancias biológicamente activas producidas y liberadas por los linfocitos T y comprenden, entre otros, los llamados factores quimiotácticos inhibitorios de migración y las linfoquinas (Smith, 2003).

En los macrófagos activados se lleva a cabo un proceso de maduración de los fagosomas, donde adquieren sus propiedades degradativas y microbicidas, fusionándose en última instancia con lisosomas para dar lugar al complejo conocido como fagolisosoma (Flannagan et al., 2012). Esta unión se caracteriza por el establecimiento de un ambiente ácido en el interior, producido por la localización de proteína protón ATPasa vesicular o ATPasas tipo V (V-ATPasa) en el fagosoma, favoreciendo la actividad de las enzimas lisosomales (Seto et al., 2013).

Estos macrófagos activados adquieren una alta capacidad para eliminar los bacilos intra-fagosomales a través de la producción de intermediarios de oxígeno reactivo (ROS) e intermediarios de nitrógeno reactivo (RNS), péptidos antimicrobianos catiónicos, disminución de aminoácidos, carbohidratos y limitación de hierro (Soldati and Neyrolles, 2012). Recientemente, se ha evidenciado además envenenamiento de *Mtb* por exposición a altas concentraciones de metales pesados, principalmente por zinc y cobre dentro del compartimiento fagosomal (Botella et al., 2012). El paso final para la eliminación bacteriana requiere la activación de potentes enzimas proteolíticas que degradan los lípidos y proteínas micobacterianas. Así los macrófagos inician la destrucción del bacilo por mecanismos propios y actuando como células presentadoras de antígeno para los linfocitos T ayudadores CD4+, los cuales son reclutados junto con los monocitos al lugar de la lesión, activando una respuesta celular.

1.3.1 Supervivencia de *Mtb* en el fagosoma

En algunos casos, los mecanismos de respuesta inmune innata solo ayudan a contener la infección y no erradica totalmente las bacterias, ya que después de ser fagocitada, *Mtb* activa mecanismos de evasión de la respuesta inmune para sobrevivir dentro de los macrófagos activados. El éxito del bacilo tuberculoso reside en su habilidad para interferir con los procesos de tráfico intracelular de los macrófagos infectados; específicamente, *Mtb* es capaz de bloquear la biogénesis del fagolisosoma (Vergne et al., 2004). *Mtb* logra esto entre otros, por su capacidad de modular la acidificación de estas vacuolas fagocíticas al restringir la fusión con los endosomas tardíos por exclusión de la V-ATPasa (Vilchèze et al., 2011). También se ha propuesto que el amoníaco generado por la ureasa de las micobacterias está implicado en la neutralización de pH del fagosoma y la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma (Gordon et al., 1980). Además, las bacterias fagocitadas evitan su destrucción mediada por especies de óxido nítrico y aniones superóxido al procesar catalíticamente los oxidantes generados (Botella et al., 2012; Ehrt and Schnappinger, 2009; Ng et al., 2004).

Un importante mecanismo adicional que explica el éxito de *Mtb* al bloquear la fusión del fagosoma–lisosoma, postula que este patógeno es capaz de interferir en el incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico (Malik et al., 2003; Sharma and Meena, 2017). Este efecto inhibitorio de la micobacteria ha sido atribuido al glicolípido manosilado lipoarabinomano (LAM), el que presuntamente interfiere con la señalización de una esfingosinquinasa, que media el aumento transitorio de la concentración de Ca^{2+} , asociada normalmente con la fagocitosis de partículas no virulentas (Russell et al., 2002; Vergne et al., 2004).

Durante la infección tuberculosa, la señalización del Ca^{2+} es crucial y juega un papel importante en la patogénesis. Se ha demostrado que durante la fagocitosis, el macrófago requiere concentraciones incrementadas de Ca^{2+} lo que permite la activación de calmodulina (CaM), la cual cambia su conformación y participa en la fusión fagosoma-lisosoma y la acción bactericida (Jaconi et al., 1990; Malik et al., 2000). Por lo tanto *Mtb* se ve también enfrentado a un ambiente de alta concentración de Ca^{2+} demandando mecanismos de regulación que le permitan mantener las concentraciones de este metal dentro de los rangos intracelulares normales (Sharma and Meena, 2017).

A diferencia de las células eucariotas, poco se ha estudiado sobre la regulación de la concentración intracelular del Ca^{2+} en bacterias. Evidencia experimental señala que diferentes eventos bacterianos son regulados por cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+} libre, como crecimiento, motilidad, esporulación y el desarrollo de diferentes estructuras bacterianas, entre otros (Burns and Minton, 2011; Hu et al., 2011; Naseem et al., 2009). Así mismo, medidas realizadas a través del uso de indicadores fluorescentes han permitido establecer que la concentración intracelular de Ca^{2+} es regulada de manera estricta y mantenida en niveles muy bajos, comparados con las concentraciones usuales en distintos ambientes extracelulares (Gangola and Rosen, 1987; Jones et al., 2002).

La regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} en bacterias comprende transportadores activos, como ATPasas tipo P y transportadores activos de tipo secundario o energizados por un gradiente electroquímico (Domínguez et al., 2015). Los transportadores pasivos involucran a los canales mecano-dependientes (Nazarenko et al., 2003), canales voltaje-dependientes (Chang et al., 2014), así como se ha reportado la existencia de un canal no proteínico (Reusch et al., 1995). Además de estos sistemas, se han identificado en bacterias proteínas de unión a calcio (CaBPs) sobre las que, los cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+} libre, tienen algún efecto. Una característica común a este tipo de proteínas es la presencia de motivos de unión a Ca^{2+} del tipo *EF-hand*, *Greek-key*, motivo β -roll y el motivo *Big* (Domínguez et al., 2015). Estas CaBPs procarionotas han sido implicadas en diversas actividades celulares como

división, respuesta a estrés, señalización e interacción hospedero-patógeno. Es probable que estos sistemas actúen en conjunto para posibilitar aquellas funciones celulares que requieran del Ca^{2+} , desde el mecanismo de influjo que tras ser activado por un estímulo, da lugar a un aumento en la concentración intracelular, seguido por la unión del ion a las proteínas blanco que median una respuesta o evento específico, hasta la restauración de la concentración de Ca^{2+} realizada por el mecanismo de eflujo (Campbell, 2015).

En micobacterias se han postulado como mecanismos de regulación intracelular del Ca^{2+} a proteínas CaBPs con motivo de unión β -roll (Domínguez et al., 2015). Estas proteínas contienen la secuencia señal PE_PGRS y motivos ricos en glicina (GGXGXD/NXUX), así como múltiples sitios de unión a calcio. Estas proteínas han demostrado estar asociadas a la supervivencia del bacilo en el interior del macrófago y son importantes para su patogénesis. Se sugiere que una de sus funciones es ser una fuente de variabilidad antigénica, lo que confiere a *Mtb* la capacidad de evadir la respuesta inmune (Meena, 2015). Otro mecanismo propuesto de regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} de *Mtb* es CtpF, una ATPasa tipo P implicada en el eflujo de Ca^{2+} y la respuesta al estrés oxidativo (Maya-Hoyos et al., 2019).

Como se expuso anteriormente, *Mtb* debe enfrentar otras condiciones hostiles como el aumento en la concentración de iones de metales pesados (Soldati and Neyrolles, 2012). Estudios de la composición iónica al interior del fagosoma activado han permitido establecer que ocurre un incremento de la concentración de Zn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} después de la fagocitosis, a un nivel que resulta ser tóxico (Wagner et al., 2005). Por otra parte, la micobacteria posee ATPasas y otras proteínas encargadas del eflujo de estos iones como CtpV (cobre) y CptC (zinc) o la porina MtcB (cobre)(Ward et al., 2010).

En este sentido, *Mtb* logra sobrevivir y crecer dentro del ambiente hostil del macrófago, adaptándose a través de mecanismos que le permiten evaluar su entorno, regulando respuestas que favorecen su persistencia en el hospedero, lo que incluye la activación de diferentes proteínas dentro de las cuales las ATPasas tipo P cumplen un rol muy importante.

1.3.2 Formación del granuloma tuberculoso e infección latente

Como resultado de los eventos tempranos de la infección con *Mtb*, se establece una pequeña área inflamatoria en el parénquima pulmonar, de naturaleza granulomatosa, acompañado de linfangitis y adenitis tuberculosa, llamada complejo primario o de Ghon (Lin et al., 2006). En la mayoría de los individuos, esta lesión primaria casi inaparente y asintomática, desaparece en pocas semanas dejando una cicatriz. Aproximadamente 3 a 6 semanas después de la

aparición de la lesión primaria, el área en cuestión pasa por una necrosis caseosa. *Mtb* se multiplica y migra de los macrófagos diseminándose hacia los ganglios linfáticos más próximos del pulmón afectado (Curvo-Semedo et al., 2005).

En el caso que la inmunidad mediada por células sea eficiente, el siguiente paso defensivo es la formación de granulomas alrededor del bacilo (Figura 1-2). Linfocitos T ayudadores CD4+, Linfocitos B y monocitos reclutados de la sangre rodean la lesión y se fusionan para formar células gigantes mononucleadas (Pai et al., 2016). El granuloma tuberculoso en humanos, tiene una estructura organizada y puede presentar formas morfológicamente diversas, como granuloma sólido, caseoso, con o sin fibrosis y granuloma calcificado (Lin et al., 2006).

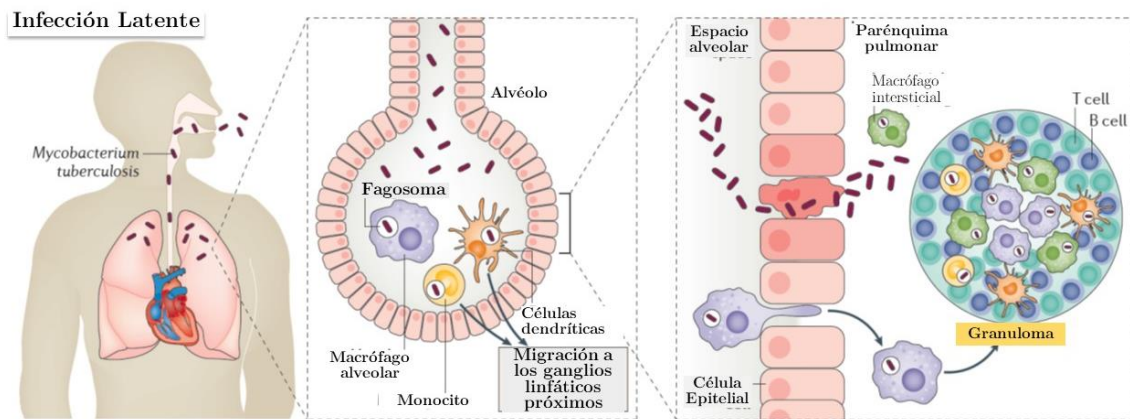


Figura 1-2. Esquema de formación del granuloma clásico en la infección latente de *Mtb*.

En la infección tuberculosa, *Mtb* invade el tejido intersticial pulmonar y migra al parénquima. *Mtb* es transportado a los nodos linfoides pulmonares. Se reclutan linfocitos T, linfocitos B y monocitos para lograr la formación del granuloma. Estas células rodean a la bacteria en el centro del granuloma donde los niveles de oxígeno se reducen creando un ambiente hostil para la micobacteria. Figura tomada y adaptada al español de la referencia (Pai et al., 2016).

A este estado se le conoce como la infección tuberculosa latente, caracterizada por una población de bacilos no replicantes o dormantes. *Mtb* no replicante bajo condiciones de cultivo *in vitro* son característicamente resistentes a la mayoría de los fármacos anti-TB (Parrish et al., 1998). El objetivo de la formación del granuloma es limitar su diseminación bacteriana al crear un microambiente caracterizado por niveles bajos de oxígeno, bajo pH y nutrientes que limita la replicación y la dispersión de la micobacteria (Ahmad, 2011). Sin embargo, *Mtb* puede cambiar su expresión fenotípica para adaptarse a la hipoxia al detener el ciclo celular y entrar en un estado de reposo manteniendo su viabilidad. De esta manera puede persistir en este estado de dormancia o latencia durante largos periodos, hasta el momento en que un

desequilibrio entre el sistema inmune del hospedero (inmunosupresión) y el patógeno, causa una exacerbación endógena, lo que conlleva a la reactivación de la enfermedad tuberculosa (Smith, 2003).

Como se ha resaltado, gran parte del éxito de *Mtb* en establecer una infección se debe a que este microorganismo tiene la capacidad de sobrevivir en diferentes entornos agresivos como el ambiente intracelular del macrófago, así como la capacidad de habitar en el tubérculo deficiente de oxígeno durante varios años. Las características bioenergéticas de las membranas de las micobacterias, los sistemas de regulación del estado de latencia y los mecanismos de equilibrio iónico intracelular, representan puntos de vulnerabilidad, que pueden ser interesantes objetivos como dianas terapéuticas.

1.3.3 DosR un regulador de estado de latencia de *Mtb*

Durante el estado de latencia, *Mtb* es capaz de sobrevivir por varios años en un estado no replicativo, caracterizado por un bajo nivel de oxígeno. Se ha demostrado que, para responder a estas condiciones, *Mtb* cuenta con un conjunto de por lo menos 48 genes que son inducidos por hipoxia, NO y CO, el cual ha sido denominado DosR (*Dormancy survival regulator*). El regulón DosR es controlado por un sistema de tres componentes constituido por dos histidinquinasas, DosS y DosT, capaces de detectar y unirse a los gases NO y CO, y el regulador de la respuesta, DosR (Leistikow et al., 2010).

DosR está relacionado con la supervivencia en el estado de latencia en tanto que son necesarios para la viabilidad de la micobacteria en condiciones anaeróbicas y para la transición desde el crecimiento en ausencia de oxígeno o un estado no respiratorio inducido por NO, hacia el crecimiento en condiciones (Leistikow et al., 2010; Prosser et al., 2017). No obstante, se ha llegado a proponer que su efecto sobre la habilidad que tiene la micobacteria para adaptarse a las condiciones de hipoxia en el hospedero está limitado a las etapas iniciales de esta adaptación y que, en el largo plazo, es reemplazada tanto por una respuesta más extensa y compleja (*Enduring hypoxic response, EHR*) (Rustad et al., 2008), así como por otros reguladores transcripcionales (Galagan et al., 2013).

De manera interesante, el gen *ctpF* (*Rv1997*) de *Mtb* que codifica para una Ca²⁺-ATPasas, se encuentran dentro de los genes que son inducidos bajo condiciones de hipoxia, controlados por DosR, por lo que se podría sugerir una relación entre su función y la adaptación del bacilo a condiciones anaeróbicas (Pulido et al., 2014) y por tanto CtpF sería un interesante blanco para el diseño de nuevos compuestos anti-TB.

1.4 Tratamiento actual de la tuberculosis

La TB activa se trata usando una combinación de diferentes agentes quimioterapéuticos administrados en un periodo de 6 a 12 meses. La quimioterapia contra la TB no complicada, denominada terapia de primera línea o régimen acortado estrictamente supervisado, (estrategia TAES), consiste en una fase inicial intensiva por dos meses administrando cuatro fármacos principales: rifampicina (RIF), isoniazida (INH), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA), (Figura 1-3), seguido por un fase de cuatro meses con RIF e INH (Trauner et al., 2014; World Health Organization, 2018). La larga duración de este tratamiento se debe en parte a la dificultad de tener concentraciones terapéuticas del fármaco en el sitio activo debido a la baja permeabilidad a través de la pared celular de *Mtb*.

Precisamente la típica estructura lipídica de la pared celular de *Mtb* la hace una bacteria fisiológicamente resistente a la mayoría de los fármacos. Los compuestos hidrofílicos atraviesan lentamente la pared celular debido al escaso número de porinas, a la escasa fluidez de los ácidos micólicos y al espesor total de la pared (Rinder et al., 2001). Típicamente, la resistencia a los fármacos anti-TB se produce como consecuencia de diferentes factores, entre ellos la reducción en la concentración intracelular del fármaco o interrupción de la activación de profármacos y la activación de bombas de eflujo (Miotto et al., 2018). Otros estudios relacionan el desarrollo de resistencia a los fármacos principalmente a mutaciones espontáneas en las dianas farmacológicas que aseguran la supervivencia del bacilo a pH muy bajo mediante la inducción de resistencia ácida, adaptaciones a los fármacos a través de enzimas codificadas por genes de *Mtb* y tolerancia epigenética (Hameed et al., 2018).

Durante el proceso replicativo de *Mtb* se generan dos poblaciones, bacilos resistentes generados durante la infección y una población de bacilos sensibles que son eliminados mediante la terapia, dando como resultado la selección de cepas resistentes. Por este motivo, el tratamiento de la TB se basa en la combinación de fármacos con mecanismos de acción diferente para evitar la aparición de resistencias. La frecuencia de aparición de mutantes resistentes varía dependiendo del fármaco: 10^{-6} para la isoniazida, estreptomycin y etambutol y 10^{-8} para la rifampicina (Ford et al., 2013).

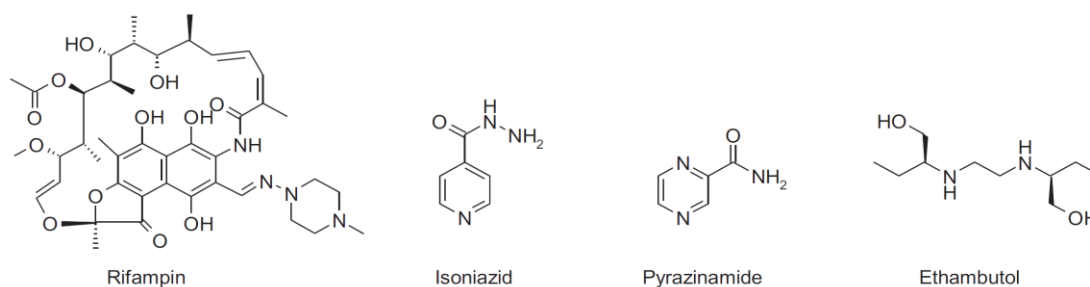


Figura 1–3. Estructura de los fármacos anti-TB de primera línea.

Aunque el 95 % de los individuos con TB pueden curarse mediante el tratamiento de primera línea, la tasa disminuye al 50 % en los casos de aparición, cada vez más frecuente, de resistencia a estos fármacos (Rehman et al., 2013). La resistencia a estos fármacos puede ser del tipo TB-MDR para el caso de resistencia simultánea a INH y RIF. Este tipo de resistencia hace que se tenga que cambiar el tratamiento a uno más complicado, más costoso y prolongado, como fluoroquinolonas, kanamicina, capreomicina, etionamida, cicloserina y tioacetazon, entre otros.

Otro estado de resistencia se define como TB-XDR, para el caso de resistencia a los fármacos de primera línea, junto a las fluoroquinolonas, y al menos uno de los fármacos inyectables de segunda línea, los que incluyen amikacina, kanamicina y/o capreomicina. Para tratar estas formas de la enfermedad, una amplia selección de aproximadamente 25 fármacos han sido usados en diferentes combinaciones (Caminero, 2006). Estas incluyen fluoroquinolonas como ofloxacina y moxifloxacina, aminoglucósidos como amikacina y kanamicina, antibióticos β -lactámicos como imipenem y coamoxicilina-clavulanate, así como péptidos antimicrobianos como capreomicina (Figura 1-4).

El uso de estos fármacos tiene sus propias desventajas como, por ejemplo, menor eficacia o especificidad, alto costo y mayor toxicidad para el paciente. Asimismo, para el año 2018 la OMS reportó 484.000 casos y aproximadamente 214.000 muertes por TB-MDR, dentro de las que el 9 % fueron TB-XDR (World Health Organization, 2019). En años recientes se han identificado en Italia, Irán, India y sur de África, casos de TB resistente a todos los fármacos actualmente en uso, denominada TB totalmente resistente o TB-TDR (Singh et al., 2019).

Este panorama pone de manifiesto la importancia del desarrollo de nuevos anti-TB, encaminados a mejorar el tratamiento tanto de la TB sensible como resistente.

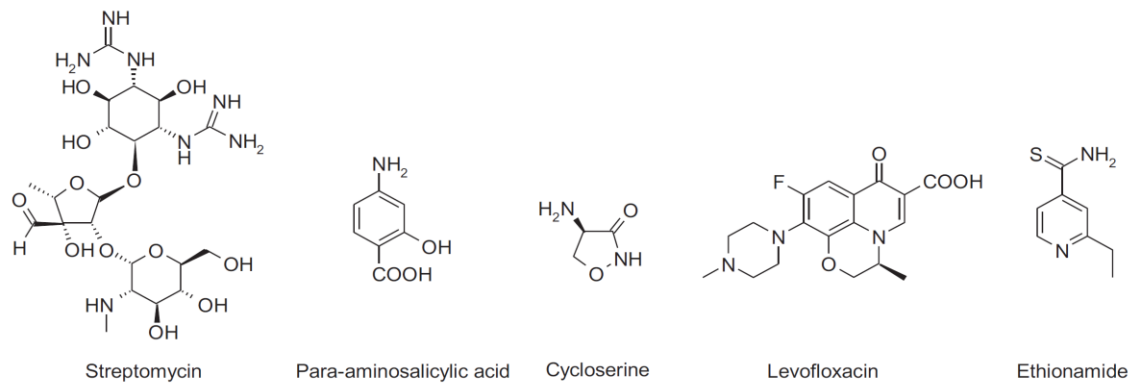


Figura 1–4. Estructura de los algunos fármacos anti-TB usados para el tratamiento de TB-MDR y TB-XDR.

1.5 Nuevos compuestos anti-TB en desarrollo

En casi 40 años la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas frente a la TB había estado abandonada, pero en los últimos 15 años diferentes grupos han trabajado en este tema y el número de compuestos en las diferentes fases de desarrollo pre-clínico y fases I, II y III de desarrollo clínico como posibles anti-TB ha aumentado (Hoagland et al., 2016). Actualmente, existen 11 compuestos en desarrollo dentro de los que se encuentran: fluoroquinolonas, rifamicinas, beta-lactámicos, oxazolidinonas, diarilquinolina, nitroimidazoles y benzotiazinona, entre otros, los que están resumidos en la figura 1-5. Algunos ya han sido aprobados para su uso en combinación con algunos fármacos del esquema tradicional de tratamiento para casos de TB-XDR, como es bedaquiline - sirturo (TMC207 o R207910) (Osborne, 2013).

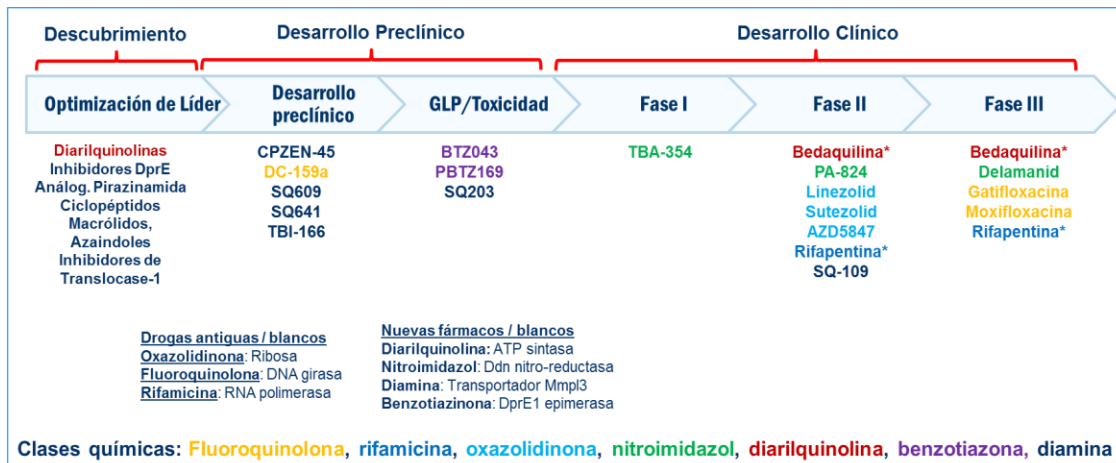


Figura 1–5. Programa global de desarrollo de fármacos anti-TB.

Se describen los fármacos en los diferentes estados de desarrollo. Figura tomada y adaptada desde el grupo de trabajo en nuevos fármacos anti-TB, noviembre de 2019 (The Working Group for New TB, 2019).

Los estudios para el desarrollo de nuevos anti-TB han explorado estructuras desde compuestos usados para tratar otras infecciones bacterianas (Rodríguez et al., 2001), compuestos análogos de fármacos anti-TB conocidos (Zumla et al., 2013) y el diseño de moléculas nuevas (Andries et al., 2005). Estos compuestos anti-TB en actual desarrollo tienen acción sobre algunas rutas biológicas como la síntesis de la pared celular, la síntesis de proteínas o la producción de energía de la membrana (Villemagne et al., 2012). De igual manera, los grupos interesados en este tema han desarrollado diferentes estrategias teniendo en cuenta la diana molecular o características estructurales de los compuestos químicos.

La búsqueda de nuevos compuestos con actividad anti-TB, así como la identificación de dianas terapéuticas alternativas, es un objetivo importante que no puede pausar ya que como se describió anteriormente, *Mtb* tiene la capacidad de generar rápidamente resistencia y por lo tanto se necesita implementar tratamientos con combinaciones de fármacos. Estos estudios son entonces de gran importancia si se quiere hacer frente a este flagelo milenario.

1.6 Métodos para el diseño de nuevos anti-TB

La búsqueda de nuevos compuestos con actividad anti-TB incluye dos etapas: i) el descubrimiento, proceso en donde se identifican las nuevas moléculas activas y ii) el desarrollo, donde se realizan las evaluaciones de estos compuestos (Hughes et al., 2011). En general, este proceso es dispendioso, costoso y toma muchos años. El descubrimiento de fármacos involucra el uso de diferentes metodologías, tanto experimentales como computacionales; estas técnicas

tienen gran importancia y representan enfoques que se complementan. Algunos estudios en la búsqueda de nuevos compuestos anti-TB utilizando combinación de estas estrategias se presentan resumidas en la tabla 1-1. Brevemente se describen las características generales de estas metodologías.

Tabla 1–1. Estudios para el descubrimiento de compuestos anti-TB empleando combinación de estrategias experimentales y computacionales.

Nombre genérico de ligandos	Acción / Diana	Método	Referencia
L1-L8: ligandos catiónicos	Proteína de resistencia multi-fármaco de <i>Mtb</i>	Modelado por homología / <i>Docking</i> /	(Malkhed et al., 2014)
12i, 12l: derivados arilquinolina	ATP-sintasa	Modelado por homología / <i>Docking</i> /	(Jain et al., 2013)
Compuestos 1 y 2: clase 3-bifenil-4-cianopirrol-2-acido carboxílico	PanC: Pantotenato sintetasa	HTS / Actividad en células completas	(Kumar et al., 2013)
T95 y B31: fármacos antiguos	PknI: Serina / treonina proteína quinasa	Modelado por homología / <i>Docking</i> / Farmacóforo	(Kandasamy et al., 2014)
Compuestos A y B: derivados hidrazida	Síntesis de pared celular	QSAR / NN	(Ventura et al., 2013)
Compuestos L1- L4	AlaDH: L-alanina deshidrogenasa	Modelo farmacóforo / <i>Docking</i> /	(Saxena et al., 2014)
Compuestos 11, 12 y 15: derivados hidrazida ácida	PknB proteína kinasa B	HTS / <i>Docking</i>	(Naqvi et al., 2014)
Derivados ácido cinámico y derivados ciclopropil	InhA: Enoil-ACP-reductasa	Farmacóforo / QSAR / <i>Docking</i>	(Mondal et al., 2013)
C1-C10: Sistema anillo aminocumarínico	ADN girasa B	Modelado por homología /Farmacóforo/ DM	(Maharaj and Soliman, 2013)
I1, I3, I4 y I5: dibenzofuranos, acetoamida, y grupos metoxi-fenil	Enoil-acil carrier reductasa	<i>Docking</i> / DM	(Izumizono et al., 2011)
Derivados amida-oxadiazol y 2-aminobenzotiazol	MtsK: Shikimato quinasa	HTS / Actividad en células completas	(Simithy et al., 2014)

HTSV: cribado virtual de alto rendimiento; **QSAR:** relación cuantitativa estructura actividad; **NN:** redes neuronales; **DM:** dinámica molecular.

1.7 Estrategias experimentales en la búsqueda de nuevos compuestos anti-TB

Hasta la década de 1970, la identificación de nuevos compuestos antimicrobianos dependía de hallazgos que se producían por casualidad y en algunos casos guiados por la observación más o menos cuantitativa del efecto que ciertas modificaciones introducidas en dichos compuestos, ejercían sobre una determinada acción farmacológica (Wermuth, 2011). Desde entonces,

estudios de química médica y biología estructural, han permitido el progreso de enfoques más racionales para el descubrimiento de nuevos compuestos (Koseki and Aoki, 2014). Cualquiera que sea la estrategia a seleccionar bien sea racional, o no, el objetivo en la búsqueda de nuevos anti-TB es encontrar moléculas activas con propiedades farmacocinéticas adecuadas, estructuras químicas o mecanismos de acción alternativos y que sean más selectivos y menos tóxicos (Thomas, 2003).

1.7.1 Estrategias no racionales

Estas estrategias hacen referencia a los métodos de cribado, los que básicamente consisten en evaluar el mayor número posible de moléculas estructuralmente diversas, provenientes de colecciones de origen natural o bibliotecas combinatorias comercialmente disponibles, elegidas al azar, aplicando un gran número de ensayos biológicos (Thomas, 2003). Utilizando estas estrategias se consiguen identificar nuevos candidatos o moléculas “líderes” que puedan tener actividad biológica, los que posteriormente se optimizan mejorando las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas (Kerns and Di, 2008). Sin embargo, estas aproximaciones no permiten reconocer la relación entre la estructura química de las moléculas y su actividad, además consumen grandes recursos y tienen un porcentaje de éxito inferior a 1 por cada 10.000 compuestos sintetizados (Sheridan and Venkataraghavan, 1987).

En este proceso, sin embargo, existe una alternativa de alto rendimiento, que permite acelerar la búsqueda de los líderes, que es conocida como “cribado de alto rendimiento” (*High Throughput Screening* - HTS). Esta técnica fue introducida durante la década de 1990, como herramienta para acelerar ensayos masivos, robotizados, a partir de bibliotecas de compuestos previamente seleccionadas, de modo que se asegure la diversidad en sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, permitiendo la identificación de compuestos líderes (Hertzberg and Pope, 2000). El HTS involucra plataformas de operación automatizada, modelos de cribado específico *in vitro*, grandes bibliotecas de compuestos y sistemas de análisis y procesamiento de datos.

1.7.2 Estrategias Racionales

Estas estrategias consideran la información bioquímica, molecular y estructural disponible tanto de la diana molecular (receptor) como de las posibles moléculas activas (ligandos), en la búsqueda de nuevos fármacos, lo que ha permitido aumentar la probabilidad de éxito.

Esta información puede ser relacionada de manera eficiente, como en el caso de la estrategia SAR (Relación Estructura Actividad), en donde se parte del principio, que la actividad biológica de un ligando está relacionada a su estructura molecular o propiedades y que moléculas estructuralmente similares pueden tener actividad biológica similar (Esposito et al., 2004). Mediante estas estrategias, se proponen cambios en las propiedades electrónicas de los ligandos y se evalúa cómo se modifica la actividad biológica mediante los cambios propuestos de manera programada, no al azar.

Las estrategias racionales también pueden incluir el uso de métodos computacionales, que permiten aprovechar la información química y biológica que se conozca sobre la conformación bioactiva de los ligandos o sobre los residuos del sitio activo en el receptor, para identificar y optimizar nuevos compuestos (Kapetanovic, 2008).

Mediante HTS también puede ser posible realizar estrategia racional, en el sentido que se use un grupo de moléculas que sean análogas y se evalúe cómo se modula la actividad en función de cambios estructurales, es decir realizando un estudio de relación estructura actividad al efectuar modificaciones en estas estructuras.

1.7.3 Diseño de fármacos asistido por computadoras (DiFAC)

Estos métodos consisten en aplicar algún procedimiento realizado por una computadora, para relacionar la actividad biológica de un compuesto con su estructura molecular (Kapetanovic, 2008). Esta estrategia hace parte del diseño racional como se mencionó anteriormente, con la ventaja de disminuir el tiempo y recursos en la búsqueda de nuevos candidatos a fármacos (Thomas, 2003). Teniendo en cuenta la información disponible sobre la estructura tridimensional (3D), las estrategias DiFAC se dividen en dos grupos, basados en la estructura del ligando o basados en la estructura del receptor.

1.7.4 Diseño de fármacos basado en ligando

Este grupo reúne los métodos que examinan la estructura química del ligando en su conformación bioactiva, al desconocerse la estructura 3D del receptor. De manera general, un ligando puede ser, un inhibidor, un sustrato, etc. Estos métodos relacionan computacionalmente la actividad biológica potencial de un ligando o grupo de ligandos, con sus propiedades estereo-electrónicas asociadas (Burger, 2003). Estos métodos incluyen estrategias como la relación cuantitativa estructura actividad (QSAR), y el modelado de farmacóforo, entre otros.

La aproximación QSAR establece una relación entre la actividad biológica de estructuras químicas y sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. Entonces, a partir de una estructura química con actividad biológica conocida, utilizando un modelo computacional es posible calcular ciertas propiedades moleculares, llamadas descriptores. Estos descriptores describen una propiedad, ya sea local o global de la molécula. Si se conocen los descriptores de una molécula que tienen una relación con su actividad biológica, se puede usar esta información para diseñar moléculas que tengan una mejor actividad biológica (Kier and Hall, 1993).

▪ **Modelo 3D – Farmacóforo**

El modelo 3D-Farmacóforo, se define como “un ensamble de características estéricas y electrónicas que son necesarias para asegurar las interacciones supramoleculares con un receptor específico y desencadenar, o bloquear su respuesta biológica” (Wermuth et al., 1998). Por lo tanto, un modelo farmacóforo se basa en la identificación de un conjunto de características químicas particulares que representan un ligando o un conjunto de ligandos, que están directamente relacionadas con su reconocimiento en el sitio activo del receptor y por lo tanto, con su actividad biológica (Pandit et al., 2006). El modelado del farmacóforo puede ser: i) basado en ligando, mediante la superposición de un conjunto de moléculas activas, llamado grupo de compuestos de entrenamiento, para generar alineamientos y de esta manera determinar las características químicas comunes esenciales para su bioactividad y ii) basado en el receptor, lo que implica un análisis de las características químicas complementarias del sitio activo y sus relaciones espaciales.

Una vez se obtiene el modelo, se puede buscar en las bases de datos, algunos compuestos que contengan el mismo modelo farmacóforo, para explicar relaciones de estructura-actividad o como punto de partida para el diseño de nuevas moléculas potencialmente activas (Kapetanovic, 2008).

1.7.5 Diseño de fármacos basado en la estructura del receptor

Estos métodos se utilizan cuando se dispone de la estructura 3D del receptor o del complejo receptor-ligando. De manera general, un receptor o diana molecular, es cualquier biomacromolécula que puede ser una proteína de membrana, enzima, ADN, etc. Estas estrategias permiten evaluar la complementariedad y predecir la afinidad y los posibles modos de unión entre los ligandos y el sitio activo del receptor. De este análisis resultan los mejores candidatos

a ser evaluados por ensayos experimentales, lo que implica un acortamiento del proceso de identificación y optimización del compuesto líder.

- **Acoplamiento molecular (*docking*)**

Los programas de acoplamiento molecular (*docking*) en proteínas, evalúan la afinidad y la energía libre de interacción de un ligando y su receptor, entre una colección de moléculas y el sitio activo de una diana molecular en estudio. También se identifican *in silico* las posibles configuraciones del complejo receptor-ligando, por medio de dos funciones: i) estimación de las afinidades de unión basadas en algoritmos de acoplamiento o de búsqueda conformacional, por ejemplo algoritmo genético, búsqueda de Monte Carlo; y ii) funciones de evaluación basados en campos de fuerza, y en funciones empíricas (Koseki and Aoki, 2014). Este proceso permite seleccionar las conformaciones y orientaciones de menor energía del ligando, que representan el modo de unión más probable.

Cualquier programa de acoplamiento molecular efectivo debe ser computacionalmente eficiente para determinar el modo de unión más favorable, suficientemente sensible en su función de puntuación para discriminar entre modos de unión alternativos y el modo de unión correcto y suficientemente robusto para permitir que varios sistemas de ligando-receptor sean estudiados (Huang et al., 2006).

- **Diseño *de novo***

Este método es adaptado para crear moléculas completamente nuevas a partir de las características fisicoquímicas y estructurales del sitio activo en el receptor. Puede ser mediante un diseño a partir de átomos o fragmentos, considerando la información del orden espacial de puntos de interacción receptor-ligando relevantes (Burger, 2003). Las técnicas de diseño *de novo* más comunes usan como entrada un grupo de fragmentos moleculares desconectados o secuencias de residuos muy cortas que son ubicados en la zona activa del receptor con la ayuda de técnicas de simulación y minimización de energía, interacciones de enlace de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, para posteriormente estos fragmentos ser conectados. (Caballero et al., 2011).

1.8 Propiedades moleculares de los compuestos anti-TB

En general las propiedades fisicoquímicas de un fármaco, como la solubilidad y la permeabilidad, establecen su biodisponibilidad oral, además de determinar su capacidad de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad, también conocido como “ADMET” (Kerns and Di, 2008). Un reto importante en el campo de diseño de fármacos es asegurar estas propiedades para los compuestos activos, lo que podría evitar fallos en las fases clínicas de desarrollo. Esta evaluación puede hacerse según la “regla de los cinco de Lipinski” (Lipinski '5), que filtra las moléculas en función de su peso molecular (≤ 500 g/mol), su lipofilia en función del coeficiente de partición octanol-agua (LogP) (≤ 5), el número de donadores de enlace de hidrógeno (≤ 5), número de aceptores de enlace de hidrógeno (≤ 10), enlaces rotables (≤ 10) y área de superficie polar (≤ 140 Å). Se considera que un compuesto que no satisfaga dos o más de estos criterios, tiene una baja probabilidad de convertirse en un buen fármaco (Lipinski, 2000). Estos límites parecen demasiado estrictos, por lo que se han realizado estudios que establecen márgenes de variabilidad para estos descriptores (Walters, 2012).

Estudios de varios conjuntos de compuestos con actividad anti-TB indican que la hidrofobicidad, peso molecular y el valor medio para área superficial polar (PSA), son estadísticamente diferentes a los fármacos aprobados por la FDA (Agencia de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos) (Ekins et al., 2014; Espinoza-Moraga et al., 2013). Estas características fisicoquímicas específicas de los anti-TB son necesarias, debido a que las paredes celulares micobacterianas poseen una arquitectura única que afecta la permeabilidad de los fármacos a través de estas membranas (Espinoza-Moraga et al., 2013); además estos compuestos deben poder atravesar diferentes barreras para llegar a su objetivo principal que son los bacilos activos dentro de los macrófagos.

En una revisión previa, se analizó el espacio químico basado en propiedades moleculares y en estructura de los anti-TB actualmente en uso, anti-TB en desarrollo, fármacos aprobados para uso oral reportados en la base de datos del DrugBank, compuestos con actividad anti-ATPasa y compuestos pertenecientes a la base de datos de la medicina tradicional china (TCM), encontrando que, en general la mayoría de los anti-TB no siguen la regla de Lipinski '5 (Santos et al., 2017). Al analizar los fármacos anti-TB actualmente en uso, se observa que la mayoría de estos compuestos son de origen natural. Esto también explica el por qué no siguen estas reglas siendo fármacos de uso oral, ya que los productos naturales se transportan en el individuo que los recibe, a través de mecanismos activos, no difusión pasiva para entrar a la célula, como lo hacen los compuestos sintéticos (Beutler, 2009; Clardy et al., 2006). En la misma revisión publicada (Santos et al., 2017) también se encontró que los compuestos con

actividad anti-ATPasa tipo P reportados en las bibliotecas virtuales, ocupan un espacio químico basado en propiedades moleculares, similar al ocupado por los compuestos aprobados para uso oral del DrugBank y fármacos aprobados para el uso como anti-TB, lo que podría significar que estos compuestos tienen buen perfil farmacocinético para poder ser evaluados como anti-TB.

1.9 Dianas terapéuticas para el diseño de nuevos compuestos anti-TB

Los fármacos anti-TB de primera y segunda línea actualmente en uso están dirigidos hacia una pequeña fracción de proteínas diana de *Mtb*. Por ejemplo la INH, pro-fármaco que necesita ser activado por una catalasa bacteriana, inhibe la biosíntesis de ácidos micólicos; la actividad de PZA es dependiente de la liberación del ácido pirazinóico, que causa entrada de protones y alteración del balance del pH intracelular; EMB es un etilenediamino, afecta la polimerización de arabinogalactano y lipoarabinomanan, por lo tanto la síntesis de pared celular y RIF de la familia rifamicina de origen natural, inhibe la síntesis de ARN bacteriano al unirse a la subunidad- β de la polimerasa dependiente de ADN (Horsburgh et al., 2015; Villemagne et al., 2012).

La identificación de nuevas dianas terapéuticas es un objetivo importante para el diseño de fármacos anti-TB. Sin embargo, los compuestos que se encuentran en desarrollo, al ser en su mayoría fármacos usados frente a otras infecciones bacterianas y análogos de fármacos anti-TB, no cumplen con esta intención. En la figura 1-6 se señalan las dianas sobre las que son dirigidos los fármacos anti-TB actualmente en uso y algunos descritos en el pipeline del actual programa global de desarrollo.

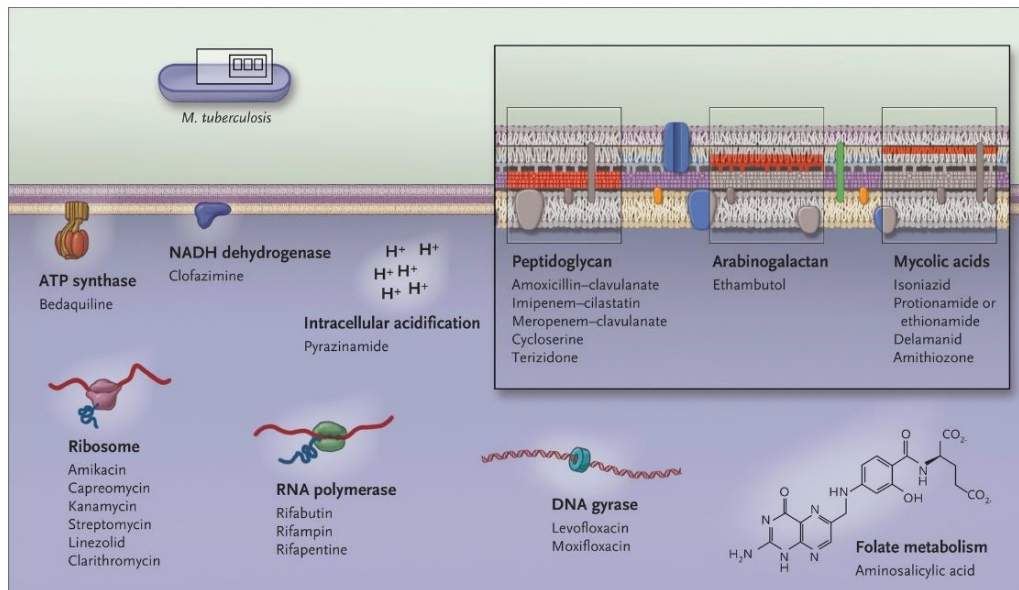


Figura 1–6. Blancos moleculares y mecanismo de acción de los anti-TB actualmente en uso.

Se indican los blancos moleculares de los fármacos de primera y segunda línea en uso. Algunos anti-TB tienen como blanco la membrana plasmática de *Mtb*. Figura tomada de la referencia (Robert Horsburgh et al., 2015).

De manera interesante, investigadores han resaltado la importancia de proteínas esenciales de membrana como dianas interesantes en el desarrollo de fármacos. En ese sentido, se ha descrito a la proteína de membrana transportadora de ácido micólico MmpL3 involucrada en la biosíntesis de pared celular, como inhibida en presencia de la diamina SQ-109 (Vasava et al., 2017) y a la ATP sintasa, una proteína de membrana importante en la regulación de protones y generación de energía para las micobacterias, diana del nuevo fármaco bedaquiline (sirturo) (Osborne, 2013). Adicionalmente, las ATPasas tipo P han sido blanco exitoso de compuestos antimicrobianos, como el antimalárico artemisina, el cual inhibe la proteína PfATP6, una Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA1a de *P. falciparum* (Krishna et al., 2010; Naik et al., 2011)

Estos hallazgos sugieren que las proteínas de membrana, como las ATPasas tipo P de las micobacterias, podrían ser dianas de interés ya que además de participar en el transporte de cationes y metales pesados a través de la membrana, tratado previamente, tienen otras funciones muy importantes discutidas a continuación.

1.10 Estructura y clasificación de las ATPasas tipo P

Las ATPasas tipo P son una familia de proteínas de membrana, involucradas en el transporte selectivo de diferentes iones y fosfolípidos a través de membranas biológicas, utilizando la hidrólisis de ATP para conducir el transporte. Estas enzimas generan y mantienen gradientes de potencial electroquímico importantes a través de las membranas biológicas (Bublitz et al., 2012; Chan et al., 2010). La denominación “P” ATPasa se debe a su particularidad de fosforilarse durante el ciclo catalítico, en un residuo altamente conservado de aspartato, dentro de la secuencia consenso DKTGTLT de todas las ATPasas. El proceso de fosforilación/defosforilación está acompañado por el transporte iónico que se da, gracias a los cambios conformacionales presentados por la enzima. Estas ATPasas son sensibles a la inhibición por el vanadato, que es similar al fosfato y toma su lugar en una de las fases del funcionamiento de la enzima (Saffioti et al., 2019).

Las ATPasas tipo P se clasifican filogenéticamente en cinco clases (P1-P5) según su especificidad iónica y topología de membrana, dentro de las que se encuentran 10 subclases diferentes clasificados de acuerdo al sustrato transportado. Sin importar su clasificación todas utilizan el mismo mecanismo catalítico y la misma estructura base. En la tabla 1-2 se muestra la clasificación de esta familia de proteínas.

La clase P1 está conformada por las que se cree, son las bombas más antiguas de la superfamilia y comprende dos subclases. La subclase P1A es representada por la bomba KdpB de *E. coli*, la ATPasa más pequeña conocida con una masa de apenas 72 kDa y sólo 6 hélices transmembranales (Hu et al., 2008). Las bombas que pertenecen a la subclase P1B están involucradas en el transporte de iones de metales pesados llevando a cabo funciones de desintoxicación o metalación de proteínas, esenciales para la viabilidad celular (Padilla-Benavides et al., 2013).

La clase P2 incluye a las ATPasas transportadoras de metales alcalino/alcalinotérreos y se considera el grupo más diverso. Se divide en 3 subclases: P2A, P2B y P2C. El representante más importante de la subclase P2A es la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarco-endoplásmico, SERCA, de células musculares en mamíferos, que será descrita con más detalle en la siguiente sección. En la subclase P2B se encuentra clasificada la PMCA (*Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase*), bomba encargada de reestablecer el gradiente de concentración de iones Ca^{2+} luego de eventos de señalización en que un aumento abrupto de la concentración citosólica de este ion es usado como mensaje (Palmgren and Nissen, 2011). En la subclase P2C hace parte la Na^+/K^+ -ATPasa, primera ATPasa en ser descrita (Skou, 1998), responsable de establecer y mantener gradientes electroquímicos de los iones Na^+ y K^+ a través de la membrana

plasmática. Otro miembro importante de esta subclase es la H^+/K^+ -ATPasa, encargada de la secreción de ácido gástrico por medio de un intercambio electroneutro de iones H^+ por iones K^+ , a expensas de la energía almacenada en el ATP.

Los miembros de la clase P3, subclase P3A son bombas H^+ -ATPasas presentes en hongos, plantas y bacterias, tienen el rol de generar una separación de carga a través de la membrana plasmática. Su estructura es similar a la de las Na^+/K^+ - y Ca^{2+} -ATPasas, lo que sugiere un mecanismo de transporte común conservado (Kühlbrandt et al., 2002). Por otra parte, la subclase denominada P3B donde se agrupan a Mg^{2+} -ATPasas de bacterias. Recientemente, se ha reportado que un miembro de esta subclase participa en la formación de complejos multiméricos de ATPasas cuyo fin es hiperacidificar el interior de vacuolas en células eucariotas (Faraco et al., 2017).

La clase P4 es conocida por agrupar ATPasas que transportan fosfolípidos en lugar de iones, usualmente denominadas flipasas. Su función principal es la formación y mantenimiento de la asimetría de la bicapa lipídica y su participación en la formación de vesículas transporte para las rutas de secreción y endocitosis (Lopez-Marques et al., 2014).

Finalmente, la clase P5 corresponde a un grupo de ATPasas presentes en todos los genomas eucariotas, no han sido encontradas en procariota, de las que se desconoce su especificidad o sustrato transportado.

Tabla 1–2. Clasificación de las ATPasas tipo P

	Bacteria	Arquea	Hongos	Plantas	Invertebrados	Vertebrados	Especificidad	Función
P1A	•	•					K^+	Regulación de presión Detoxificación homeostasis
P1B	•	•	•	•	•	•	Cu^+ , Cu^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+}	
P2A	•	•	•	•	•	•	Ca^{2+} , Mn^{2+} (SERCA)	Señalización, homeostasis
P2B			•	•	•	•	Ca^{2+} (PMCA)	
P2C			•		•	•	Na^+/K^+ , H^+/K^+	Potencial de membrana, acidificación
P2D			•		•	•	Na^+ , Ca^{2+}	Desconocida
P3A	•	•	•	•			H^+	Potencial de membrana, pH
P3B	•						Mg^{2+}	Desconocida
P4			•	•	•	•	Fosfolípidos	Transporte de lípidos
P5			•	•	•	•	Desconocido	Desconocida

Se describen las principales funciones, especificidad y distribución entre los organismos de la familia de ATPasas tipo P. Los puntos negros indican la presencia en los diferentes organismos de las subclases P1, P2, P3, P4 y P5. Información tomada y adaptada de la referencia (Bublitz et al., 2010).

Las ATPasas tipo P se caracterizan por tener cinco dominios que son funcional y estructuralmente diferentes, representados en la figura 1-7. Tres de estos dominios son citoplasmáticos (N, unión a nucleótido, P, fosforilación y A, actuador), y los otros dos se embeben en la membrana (TMD, transporte y S, soporte específico de clase. Durante el ciclo catalítico, el dominio N reconoce el ATP y posiciona el fosfato γ para el ataque nucleofílico, mientras que un residuo de aspartato (Asp) ampliamente conservado en el dominio P acepta este grupo fosfato y forma un intermediario aspartil-fosfato de alta energía. Un glutamato (Glu) en el dominio A posiciona una molécula de agua para la hidrólisis subsecuente, la cual lleva a la liberación del grupo fosfato (Palmgren and Nissen, 2011). Los dominios citoplasmáticos son conectados a los segmentos transmembranales mediante cinco regiones “linker”. En esta región se encuentra el sitio de fosforilación de la proteína, al igual que los sitios de unión al ATP. La región de unión del metal tienen motivos altamente conservados y dependen de la especificidad del catión transportado (Bublitz et al., 2010).

Los motivos característicos de las ATPasas se presentan en el dominio A, como TGE, en el dominio P, como DKTG que contienen al residuo de aspartato conservado y al TGDN y GDGXND, involucrados en la coordinación de Mg^{2+} asociado con la unión del ATP en el sitio de fosforilación. El dominio TMD presenta una alta variabilidad entre las distintas ATPasas salvo por la región donde se encuentran los aminoácidos responsables de la coordinación del sustrato (Chourasia and Sastry, 2012).

Adicionalmente, las ATPasas tipo P presentan dos estados conformacionales: E1, donde se unen los iones en un lado de la membrana celular, induciendo su auto-fosforilación y la generación de un nuevo estado conformacional (E2), que tiene una menor afinidad por los sustratos y por lo tanto los iones inicialmente reconocidos son liberados al otro lado de la membrana, promoviendo el transporte de iones y la auto-defosforilación (Kühlbrandt, 2004). A pesar que las ATPasas tipo P comparten un mecanismo catalítico basado en los cambios conformacionales de sus cinco dominios estructurales, su regulación y la afinidad por el sustrato transportado es diferente para cada una de ellas.

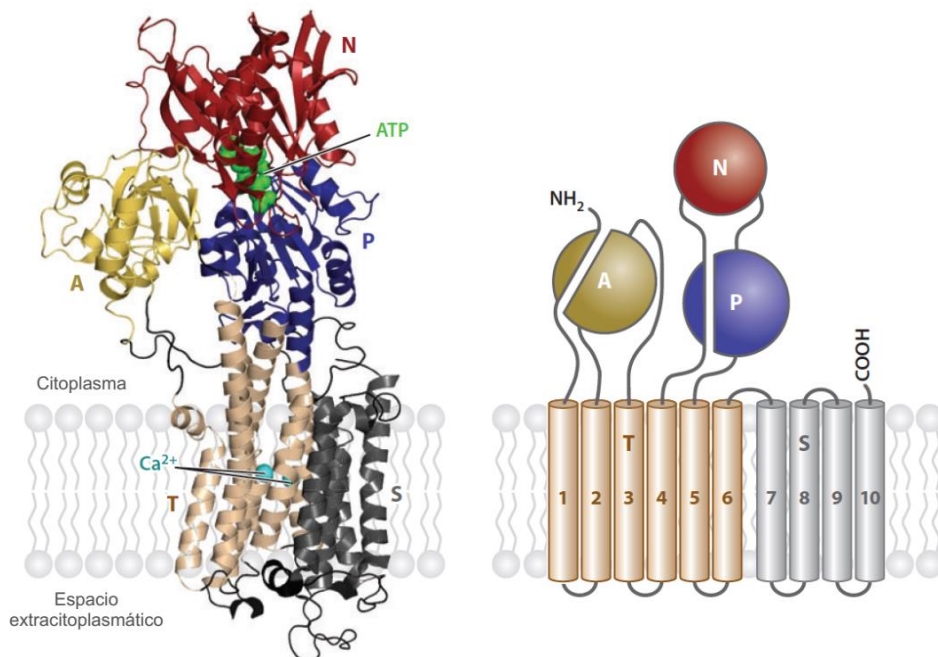


Figura 1-7. Esquema de la organización estructural de las ATPasas tipo P.

En la figura de la izquierda se muestra un modelo de cintas de la estructura terciaria de la Ca^{2+} ATPasa tipo P SERCA1a (ID PDB 1T5S), en la que se ilustra el sitio de unión transmembranal del metal y el sitio de unión a nucleótido (Palmgren and Nissen, 2011). En la figura de la derecha se muestra una representación esquemática de la misma estructura con los dominios representados en letras mayúscula. Figura tomada y adaptada de la referencia (Bublitz et al., 2010).

La estructura tridimensional (3D) de varias ATPasas tipo P han sido determinadas por cristalografía de rayos X, pero la proteína más estudiada es la Ca^{2+} -ATPasa tipo P de retículo sarco-endoplásmico SERCA1a, de la que se encuentran disponibles modelos en todos los estados del ciclo de reacción y en complejo con diferentes ligandos. Esta abundante información estructural ha sido una valiosa herramienta para entender el funcionamiento y especificidad iónica de otras proteínas putativas transportadores ATPasas tipo P. A continuación describimos las principales características de esta SERCA1a.

1.11 Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarco-endoplásmico (SERCA)

SERCA es una proteína de membrana del retículo sarco-endoplásmico (SR/ER) de los miocitos, su función es transportar Ca^{2+} desde el citosol al lumen SR/ER a expensas de la hidrólisis de ATP durante la relajación muscular. Es la representante mejor caracterizada de las ATPasas subclase P2A, en cuanto se ha resuelto su estructura cristalina en múltiples

conformaciones (Jensen et al., 2006; Takahashi et al., 2007; Toyoshima et al., 2000). Su secuencia se encuentra altamente conservada en eucariotas superiores y también han sido halladas secuencias que comparten un alto grado de homología con ella en ciertos organismos procariotas (Kotšubei et al., 2013; Zanotti, 2016). Esta proteína integral de membrana de 994 aminoácidos está compuesta por tres dominios citoplasmáticos típicos de las ATPasas tipo P y diez hélices transmembranales (TMDs) M1–M10. Posee dos sitios de unión a Ca^{2+} , ricos en átomos de oxígeno y con una densidad de carga predominantemente negativa, denominados Ca-I y Ca-II (Musgaard et al., 2012). SERCA es responsable de mantener el gradiente de concentración de Ca^{2+} que existe a lo largo de la membrana plasmática de ciertos organelos y de las células, así como de mantener una concentración intracelular de Ca^{2+} baja, lo cual es esencial para diferentes funciones biológicas en células eucariotas y procariotas.

El transporte activo de Ca^{2+} lo realiza alternando cuatro estados conformacionales: el estado E1-P, donde dos sitios de unión a Ca^{2+} tienen alta afinidad y se enfrentan al lado citoplasmático de la membrana; el estado E2 abierto, donde los sitios de unión tienen baja afinidad por Ca^{2+} y alta afinidad por protones y se ubican hacia el lumen; el estado E2-P cerrado el cual es ocluido por un protón; finalmente el estado E2-ATP donde un ATP modulador es unido (Musgaard et al., 2012; Zanotti, 2016).

En mamíferos, existen tres tipos distintos de SERCA (1 al 3) los cuales pueden presentarse como varias isoformas generadas a partir de *splicing* alternativo: tres de SERCA1 (a-c), tres de SERCA2 (a-c) y seis de SERCA3 (a-f). Este *splicing* da lugar a diferencias en la longitud del extremo C-terminal, siendo SERCA1a la ATPasa más corta, con 994 aminoácidos y SERCA3a la más larga, con 1052. SERCA1a predomina en el músculo esquelético mientras que las isoformas 2a y 2b predominan en el músculo cardíaco y las isoformas de SERCA3 en células no musculares, especialmente células hematopoyéticas (Zanotti, 2016). La figura 1-8.A representa la estructura 3D de SERCA1a en estado E2 indicando todos los dominios de estas ATPasas tipo P2 y en complejo con el ácido ciclopiazónico (CPA).

Ha sido demostrado que varios compuestos se unen e inhiben SERCA1a en el rango de concentraciones de micro a nanomolar, al bloquear su estructura en un estado conformacional definido. Por ejemplo, tapsigargina (TG), el ácido ciclopiazónico (CPA) y la 2,5-di(t-butil)hidroquinona (BHQ), bloquean la proteína en un estado E2, mientras que 1,3-dibromo-2,4,6-tri (metilisotiouronio) benceno, la estabiliza en el estado conformacional E1-P (Chourasia and Sastry, 2012; Seidler et al., 1989).

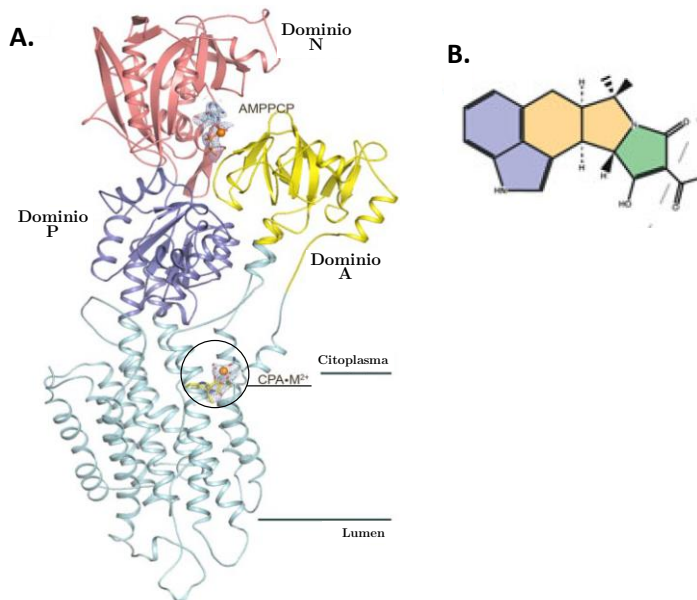


Figura 1–8. Estructura 3D de SERCA1a y 2D de CPA.

A. Representación de la estructura 3D de SERCA1a (PDB: 3FGO), se indica el dominio N en rojo, dominio A en amarillo, dominio P en púrpura. Los diez dominios TMD se muestran en azul claro. El círculo negro señala el sitio de unión CPA en el canal de acceso al Ca^{2+} . **B.** Fórmula estructural de CPA con el motivo indol en azul, el motivo hidrindano central en amarillo y el motivo ácido tetrámico en verde. Figura tomada y adaptada de la referencia (Kotšubei et al., 2013)

De manera particular CPA, un metabolito secundario, aislado de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, ha demostrado ser una micotoxina asociada a intoxicación por alimentos contaminados en vertebrados superiores. Su estructura está compuesta por un motivo indol en un extremo y un motivo ácido tetrámico al otro, separados por un motivo central hidrindano (Figura 1-8 B). Estudios bioquímicos y estructurales demuestran que CPA actúa en el rango nanomolar, ocluyendo el canal de acceso al Ca^{2+} de SERCA1a, alterando en el flujo intracelular y homeóstasis de Ca^{2+} (Moncoq et al., 2007). Su sitio de unión es diferente al de TG y parcialmente sobrepuesto al de BHQ.

La unión de CPA al bolsillo en SERCA1a es específica y depende de los aminoácidos del bolsillo que coordinan esta interacción. Se ha demostrado que, de manera similar afecta el transporte de calcio por la proteína PfATP6, la Ca^{2+} -ATPasa de *P. falciparum* homóloga a SERCA1a (Di Marino et al., 2015).

1.12 ATPasas tipo P de *Mtb*, clasificación e implicación biológica

Estudios del genoma de *Mtb* evidencian que existen 28 secuencias que codifican para transportadores putativos de iones metálicos, entre ellos 11 ATPasas tipo P las cuales se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo con la naturaleza de los iones transportados. Transportadores de metales pesados (CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpG, CtpJ y CtpV) y transportadores de metales alcalinos y/o alcalinotérreos (CtpE, CtpF, CtpH, y CtpI) (Cole et al., 1998; Novoa-Aponte et al., 2012). Estudios bioinformáticos adicionales indican que estas proteínas se encuentran conservadas, con identidad de al menos 98 % en sus secuencias de aminoácidos en diferentes especies del género *Mycobacterium* (Novoa-Aponte and Soto Ospina, 2014), lo que facilitaría el diseño de inhibidores de espectro extendido entre las especies patogénicas de micobacterias.

Como se discutió previamente, *Mtb* debe afrontar condiciones adversas durante la infección. Dentro de estas condiciones, se expone a una intoxicación con metales pesados, como Cu^{2+} y Zn^{2+} , así como y una alta concentración de Ca^{2+} citosólico, situaciones que pueden afectar su capacidad de sobrevivir y replicarse en los macrófagos activados. En ese sentido se ha evidenciado que, en las micobacterias, las ATPasas tipo P cumplen funciones claves y muy diversas; por ejemplo, la ATPasa CtpV está implicada en la resistencia a concentraciones elevadas de Cu^{2+} (Ward et al., 2010); de manera similar recientemente se ha sugerido que CtpA está involucrada en la desintoxicación de Cu^+ de las células micobacterianas (León-Torres et al., 2015). CtpG ha sido asociada al transporte de Cd^{2+} de manera más eficiente que otros cationes de metales pesados (López et al., 2018). La ATPasa CtpC ha sido asociada a la protección del bacilo del exceso de Zn^{2+} (Botella et al., 2011; Padilla-Benavides et al., 2013) y CtpD presenta afinidad hacia Co^{2+} y Zn^{2+} (Raimunda et al., 2012), lo que sugiere que estas ATPasas podrían transportar diferentes iones a la vez.

En condiciones experimentales que simulan el estado de infección latente, se ha demostrado que *Mtb* regula negativamente las ATPasas, excepto aquellas que son esenciales para la supervivencia en escases de ATP como transportadores Na^+/K^+ and Ca^{2+} ATPasas (Pulido et al., 2014).

Un estudio en el que se analizó la respuesta transcripcional de *Mtb* frente a diferentes condiciones como hipoxia, estrés oxidativo, toxicidad e infección, permitió evidenciar que los genes de estas ATPasas se expresan de manera diferencial frente a dichas condiciones encontradas durante la infección (Novoa-Aponte and Soto Ospina, 2014). Este estudio,

interesantemente destaca que, dentro de estos genes, *ctpF* que codifica para una ATPasa, cuya afinidad iónica por el Ca^{2+} ha sido determinada recientemente (Maya-Hoyos et al., 2019), exhibe un comportamiento transcripcional positivo en la mayoría de condiciones consideradas.

Lo anterior indica que la ATPasas tipo P de *Mtb* son vitales en la supervivencia intrafagosomal del bacilo y considerando la implicación biológica, las principales características de CtpF se describen a continuación.

1.13 CtpF, una Ca^{2+} -ATPasa de *Mtb* como diana en el diseño de anti-TB

CtpF (Rv1997) es una Ca^{2+} -ATPasa tipo P de *Mtb* de 905 aminoácidos. A través de estudios *in silico*, como la obtención de perfiles de hidrofobicidad y la identificación de motivos conservados presentes en la estructura primaria y secundaria de CtpF, se ha logrado establecer que es una ATPasa subclase P2A involucrada en el transporte de Ca^{2+} (Novoa-Aponte et al., 2012). Adicionalmente se ha encontrado que la expresión de *ctpF* desde el vector pMV261 confiere tolerancia a las micobacterias frente a concentraciones tóxicas de Ca^{2+} y Na^{+} , además que su actividad ATPasa es estimulada por Ca^{2+} (Novoa Aponte, 2017). Recientemente se ha identificado que CtpF conserva 10 de los 11 aminoácidos que constituyen los sitios de unión a Ca^{2+} en SERCA1a y que está implicada en el eflujo de Ca^{2+} de *Mtb* (Maya-Hoyos et al., 2019). De esta manera los sistemas de eflujo como CtpF, que garanticen una concentración intracelular de Ca^{2+} adecuada, para poder sobrevivir a la alta concentración citosólica de Ca^{2+} en el macrófago activado representan factores cruciales en la viabilidad de *Mtb*.

En el estado de latencia de la infección tuberculosa, *Mtb* disminuye su maquinaria metabólica celular, logrando sobrevivir durante un largo periodo en hipoxia. En este proceso, el regulón DosR es relevante para lograr la adaptación a las condiciones de baja tensión de oxígeno. En este sentido, es importante el hecho de que el gen *ctpF* es uno de los cerca de 50 genes incluidos en el regulón DosR, siendo entonces relevante para la adaptación del bacilo a estas condiciones y para lograr persistir en el hospedero.

Como se mencionó anteriormente, dentro de los genes diferencialmente regulados en condiciones de infección, hipoxia, estrés oxidativo y presencia a sustancias tóxicas, la expresión de *ctpF* se encuentra incrementada en la mayoría de las condiciones, lo cual sugiere que esta proteína es importante para la supervivencia de *Mtb*. Se puede sugerir que aun cuando existen otras ATPasas putativas asociadas con el transporte de calcio como CtpH y CtpI (Novoa-

Aponte, 2016), su función transportadora no sería redundante y estaría reservada casi exclusivamente para la homeóstasis durante la infección del macrófago.

Lo anterior indica que las ATPasas tipo P de *Mtb* son vitales en la supervivencia intrafagosomal del bacilo y considerando la evidencia expuesta, CtpF una ATPasa tipo P transportadora de Ca^{2+} sería una interesante diana para el diseño de nuevos fármacos anti-TB, además de tener como ventaja adicional su localización en la membrana plasmática, lo que las hace accesibles a compuestos antimicrobianos que no necesitarían ser internalizados por la célula. Adicionalmente, CtpF es la ATPasa de tipo P micobacteriana más cercana a la Ca^{2+} -ATPasa SERCA1a eucariota, lo que ofrece importante información que facilitaría su entendimiento y el desarrollo de estrategias racionales para el diseño de nuevos compuestos activos.

2. Justificación

La TB es la causa más frecuente de muerte ocasionada por un agente infeccioso a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en el 2018 se presentaron 10.0 millones de nuevos casos y 1.2 millones de muertes por TB (World Health Organization, 2019). Aproximadamente 1/3 de la población mundial se encuentra infectada por *Mtb* de forma latente; de esta población, 1 de cada 10 casos desarrollará TB en algún momento de la vida, y el resto de la población permanecerá en un estado asintomático y facilitando el contagio entre individuos (Dheda et al., 2017).

En Colombia, durante el año 2018 se presentaron 14.338 casos nuevos de TB, de los cuales 3.508 presentaban co-infección VIH-TB y 570 tenían TB-MDR (OPS-OMS, 2019), lo que indica que esta enfermedad continúa siendo un problema de salud pública para nuestro país.

Aunque para combatir la TB se emplea un régimen compuesto por cuatro fármacos: INH, RIF, PZA y EMB, la tasa de éxito disminuye al 50 % en los casos de aparición cada vez más frecuente, de resistencia (Horsburgh et al., 2015). Para el año 2018 se reportaron 484.000 casos y aproximadamente 214.000 muertes por TB-MDR, dentro de las que el 9 % fueron TB-XDR (World Health Organization, 2019). La resistencia de *Mtb* a los fármacos evoluciona a través de varios mecanismos como son: la impermeabilidad de la envoltura celular, bombas de eflujo, modificaciones de los blancos moleculares por mutaciones genéticas y degradación del fármaco, entre otros (Singh et al., 2019). Esta situación resalta la importancia del desarrollo de nuevos anti-TB, encaminados a mejorar el tratamiento tanto de la TB sensible como resistente.

En el diseño de nuevos fármacos anti-TB, un objetivo importante es la identificación de compuestos de clases estructurales diversas, así como dianas terapéuticas alternativas. El desarrollo del presente trabajo propone a las proteínas ATPasas tipo P de *Mtb* como dianas interesantes. La importancia de estos transportadores radica en que son requeridos para la persistencia (Botella et al., 2011) y su disminución compromete la virulencia y sobrevivencia

(Ward et al., 2010), además que son parcialmente alejadas en su secuencia a las ATPasas humanas (Novoa-Aponte and Soto Ospina, 2014).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo de investigación proponemos a CtpF una Ca^{2+} -ATPasas de *Mtb*, como diana para el diseño de compuestos anti-TB, mediante una estrategia combinada de experimentación *in silico* e *in vitro*, que podrá ser aplicada al estudio de otras ATPasas tipo P de *Mtb* en futuros trabajos de investigación. La justificación de la selección CtpF como diana clave se radica en: [i] CtpF representa un mecanismo de eflujo de Ca^{2+} que podría garantizar una concentración intracelular de Ca^{2+} adecuada, para poder sobrevivir a la alta concentración citosólica de Ca^{2+} en el macrófago (Maya-Hoyos et al., 2019); [ii] el gen *ctpF* está incluido en el regulón DosR, relevante para la adaptación del bacilo a las condiciones de baja tensión de oxígeno y la entrada en el estado de latencia (Pulido et al., 2014); [iii] *ctpF* exhibe un comportamiento transcripcional positivo en la mayoría de condiciones que *Mtb* experimenta durante la infección de macrófagos como la hipoxia y el estrés oxidativo, lo cual sugiere que la expresión de esta proteína es importante para su supervivencia (Novoa-Aponte and Soto Ospina, 2014); [iv] una Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA1a de *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) homóloga a CtpF ha sido diana para el diseño de efectivo antimalárico que no afecta las proteína en humanos (Krishna et al., 2010; Naik et al., 2011); [v] CtpF es la ATPasa de tipo P micobacteriana más cercana a SERCA1a, la ATPasa de tipo P más ampliamente estudiada, lo que ofrece información que facilita su entendimiento y el desarrollo de estrategias racionales para el diseño de nuevos compuestos activos.

Los resultados del presente trabajo contribuirán en la búsqueda de nuevas moléculas con posible actividad anti-TB como ayuda en el control de esta enfermedad.

3. Hipótesis experimental

La identificación de nuevos blancos terapéuticos para el diseño de compuestos anti-TB, es un importante objetivo para profundizar en el conocimiento de la fisiología de *Mtb*, así como reducir la incidencia de TB fármaco resistente.

Se plantea determinar si el ácido ciclopiazónico (CPA) y compuestos derivados desde las características farmacofóricas de este, tienen efecto sobre la actividad de CtpF, una ATPasa tipo P de *Mtb* involucrada en el transporte de calcio. Además, si la alteración en la función de CtpF causa inhibición del crecimiento de las micobacterias, afectando además la supervivencia de *Mtb* en los macrófagos durante la infección. La demostración de esta relación puede contribuir en el reconocimiento de las ATPasas tipo P como dianas alternativas para el diseño de compuestos anti-TB.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar mediante análisis *in silico* e *in vitro* el potencial de las ATPasas tipo P de *Mycobacterium tuberculosis* como diana molecular para la búsqueda racional de compuestos con actividad anti-tuberculosa.

4.2 Objetivos específicos

- 1- Generar un modelo *in silico* de la estructura terciaria de las proteínas ATPasa tipo P de *Mycobacterium tuberculosis*, basado en métodos de predicción como modelado por homología o reconocimiento de plegamiento.
- 2- Identificar por estudios de acoplamiento molecular, a partir de bibliotecas de compuestos, los ligandos con mayor afinidad por el sitio activo de las proteínas ATPasa tipo P de *Mycobacterium tuberculosis*.
- 3- Evaluar *in vitro* el efecto de algunos compuestos seleccionados sobre la actividad enzimática en vesículas de membranas y sobre el comportamiento transcripcional de las ATPasas tipo P de *Mycobacterium tuberculosis*.
- 4- Determinar la actividad de algunos compuestos seleccionados sobre la viabilidad de las micobacterias en un modelo de infección en macrófagos.

5. Métodos y materiales

Para el abordaje de los objetivos propuestos en el presente trabajo de investigación, se estableció una estrategia combinada que incluye experimentación *in silico* e *in vitro* desarrolladas de manera escalada. Como primera medida, en ausencia de una estructura 3D obtenida experimentalmente para las ATPasas tipo P de *Mtb*, se generó y validó un modelo por homología de CtpF en el que se evaluó el modo de unión del ligando CPA en comparación con SERCA1a. Con el fin de validar estos resultados, se determinó *in vitro*, el efecto de CPA sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa de CtpF, así como la actividad micobactericida. También fue estudiada la respuesta transcripcional del gen *ctpF* en comparación con otras ATPasas tipo P2 de *Mtb*. Estas evaluaciones permitieron proponer a CtpF como diana molecular.

Con base en las características farmacofóricas del complejo CtpF-CPA se diseñó una metodología basada en estudios de cribado virtual basado en farmacóforo, acoplamiento molecular y cálculos de mecánica molecular MM-GBSA, a partir de la biblioteca de compuestos ZINC, para identificar los ligandos con mayor afinidad por el sitio activo. Los compuestos con mejor energía libre de unión de acuerdo con los cálculos de MM-GBSA se evaluaron *in vitro* en su capacidad de micobactericida e inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de CtpF. Finalmente se determinó la actividad de los compuestos más activos sobre la viabilidad de las micobacterias en un modelo de infección en macrófagos.

Para describir los materiales y métodos de manera organizada, se detallan a continuación los métodos desarrollados en las estrategias *in silico* seguido de los métodos *in vitro*. Sin embargo, los resultados serán descritos de manera consecuente a como fueron programados y analizados.

5.1 Estudios computacionales

5.1.1 Modelo 3D de CtpF

La estructura 3D de CtpF-*Mtb* fue obtenida por modelado por homología usando el servidor web automatizado de modelado de estructura de proteínas Swiss-Model (Biasini et al., 2014). La secuencia de CtpF-*Mtb* (UniProt ID: P9WPS9) fue obtenida de la base de datos revisada UniProtKB. La estructura cristalográfica de SERCA1a en el estado E2 y unida en complejo con CPA (código PDB: 3FGO) se utilizó como plantilla (Laurson et al., 2009). Esta plantilla fue seleccionada después de realizar una evaluación y matriz de comparación del valor de desviación cuadrática media o RMSD (en Å) de las ocho estructuras cristalográficas disponibles en el PDB, así como de los residuos más importantes en la coordinación de CPA. En el anexo A se describen los resultados de esta comparación.

La plantilla usada presentaba un metal divalente (Mn^{2+}) y tres moléculas de agua en el sitio de unión de CPA. Sin embargo, el modelo por homología de CtpF se construyó manteniendo una molécula de agua presente en el sitio activo de CPA en lugar de Mn^{2+} ya que las estructuras cristalográficas reportadas muestran una molécula de agua conservada que es importante para la unión de CPA (Moncoq et al., 2007; Takahashi et al., 2007).

Para relajar el modelo de CtpF, se realizó una simulación de dinámica molecular (DM) restringida de 20 ns, utilizando el software Desmond v.2.3 y el campo de fuerza OPLS_2005 (Bowers et al., 2006). Para esto, el modelo CtpF se insertó en una bicapa lipídica de 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), solvatada en una caja ortorrómbica con una distancia buffer de 10 Å. El modelo se neutralizó añadiendo 12 iones Na^+ para equilibrar la carga neta del sistema y se introdujo $MgCl_2$ a una concentración de 2,5 mM. Primero se minimizó todo el sistema y luego se equilibró con el proceso de relajación con los parámetros por defecto de seis etapas para el ensamble NPT. Los parámetros de simulación de Desmond se mantuvieron en sus valores por defecto para producir una corrida de DM de 20-ns: ensamble NPT, temperatura constante a 300° K usando el termostato de cadena Nosé-Hoover y presión constante a 1 atm usando el barostato de Martyna-Tobias-Klein, con tiempos de relajación de 1 y 2 ps, respectivamente.

El modelo resultante fue evaluado en su calidad con los programas ProSA-web (Sippl, 1993; Wiederstein and Sippl, 2007) y PROCHECK (Laskowski et al., 1993).

5.1.2 Preparación de las estructuras de los compuestos a evaluar

La estructura 3D de CPA y de los candidatos obtenidos del cribado virtual (descargados de la base de datos ZINC) (Sterling and Irwin, 2015) fueron curados y preparados con el módulo LigPrep de Maestro 2016-2 (LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016) y se generaron los estados de protonación a $\text{pH } 7.0 \pm 2.0$ usando Epik (Greenwood et al., 2010). La minimización de energía se realizó durante la preparación de cada ligando usando MacroModel (MacroModel, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016) con el campo de fuerza OPLS_2005. Los descriptores moleculares relacionados a las propiedades ADME (*drug-like*) para cada ligando, como peso molecular (MW), coeficiente de partición octanol-agua (LogP), número de donantes de enlaces de hidrógeno (donadores enlace-H), número de aceptores de enlaces de hidrógeno (aceptores enlace-H), el área de superficie topológica polar (tPSA) y el número de enlaces rotables (RB), se calcularon con QikProp de Maestro (Jorgensen, 2016).

5.1.3 Acoplamiento molecular (*molecular docking*)

Para garantizar que la metodología de acoplamiento molecular (*docking*) pueda reproducir la conformación, se realizó una reconstrucción del complejo ligando-receptor, mediante el acoplamiento de CPA en su propia estructura cristalográfica SERCA1a, usando los métodos Glide de precisión estándar (SP) y Glide precisión extra (XP) para refinar los cálculos (Friesner et al., 2006, 2004). Este acoplamiento se define como *auto-docking* (Ramírez and Caballero, 2018). Glide ha demostrado ser una herramienta muy confiable para los experimentos de acoplamiento con muchas aplicaciones exitosas en el estudio de las interacciones proteína-ligando, incluyendo la evaluación *in silico* de nuevos fármacos (Gangopadhyay et al., 2019; Ramírez et al., 2019), y la descripción de los modos de unión y afinidad diferencial de series congénicas de ligandos (Almerico et al., 2012; Mena-Ulecia et al., 2015; Quesada-Romero et al., 2014; Velázquez-Libera et al., 2019). La rejilla del acoplamiento fue generada por los parámetros por defecto usando como centro el ligando co-cristalizado en el sitio de unión, asegurando que el tamaño de la caja de la rejilla sea lo suficientemente grande para cubrir todo el sitio de unión. Se utilizaron los parámetros de acoplamiento por defecto y las opciones para mejorar la planaridad de los grupos π conjugados incluyendo carbonos aromáticos como donadores de enlaces de hidrógeno. El mismo protocolo de acoplamiento se utilizó para predecir el sitio y el modo de unión de CPA en CtpF. Las poses del acoplamiento fueron revisadas visualmente y se consideraron aquellas con las mejores puntuaciones de acoplamiento (*docking score*). La calidad de las poses fue analizada considerando los valores de RMSD con respecto a las coordenadas de referencia (CPA en la

estructura cristalográfica).

5.1.4 Comparación de las secuencias de Ca²⁺-ATPasas sensibles y nos sensibles a CPA

Con el fin de comparar la conservación de los sitios de unión a CPA se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias de algunas proteínas Ca²⁺-ATPasas presentes en organismos eucariotas y en bacterias, incluyendo CtpF. También se incluyó la Na⁺/K⁺ ATPasa subunidad A1, una ATPasas tipo P2C humana, cuya reacción frente a CPA ha sido evaluada previamente. Las características generales de las proteínas evaluadas en el alineamiento múltiple se indican en la tabla 5-1.

Tabla 5-1. Ca²⁺-ATPasas de células eucariotas y procariotas usadas en el alineamiento múltiple.

Código	Nombre	Identificador	Organismo	Longitud residuos	Reacción frente a CPA	Ref.
P9WPS9	Ca ²⁺ -ATPasa	CtpF	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	905	Desconocida	(Maya-Hoyos et al., 2019)
P98194	Ca ²⁺ -ATPasa tipo 2C1	ATPase 2C1	Humano	919	Insensible	(Chen et al., 2017)
P04191	Ca ²⁺ -ATPasa SERCA1a	SERCA1a	Conejo	1001	Sensible	(Di Marino et al., 2015)
P20020	Ca ²⁺ -ATPasa de membrana plasmática	PMCA1	Humano	1220	Insensible	(Liu et al., 2006)
P05023	Na ⁺ /K ⁺ ATPasa subunidad A1	ATP-A1	Humano	1023	Insensible	(Seidler et al., 1989)
Q08853	Ca ²⁺ -ATPasa	PfATP6	<i>Plasmodium falciparum</i>	1228	Sensible	(Di Marino et al., 2015)
Q8Y8Q5	Ca ²⁺ -ATPasa	LMCA1	<i>Listeria monocytogenes</i>	880	Insensible	(Faxén et al., 2011)
Q73E41	Ca ²⁺ -ATPasa	BACA1	<i>Bacillus cereus</i>	888	Sensible	(Kotšubei et al., 2013)
Q9CFU9	Ca ²⁺ -ATPasa	LLCA1	<i>Lactococcus lactis</i>	878	Insensible	(Kotšubei et al., 2013)

Las secuencias y la información de esta tabla fueron obtenida de la base de datos UniProt. La información sobre la sensibilidad frente a CPA fue obtenida de las referencias indicadas.

Las secuencias seleccionadas para la realización del análisis por comparación fueron obtenidas de la base de datos de proteínas UniProt y clasificadas como sensibles o insensibles a CPA de acuerdo a los reportes publicados de actividad enzimática. Se realizó el alineamiento múltiple con las secuencias de las ATPasas tipo P de células eucariotas y bacterianas frente a SERCA1a. Se analizaron los residuos que forman el sitio de unión a CPA de acuerdo con las estructuras cristalizadas (Laursen et al., 2009; Moncoq et al., 2007; Takahashi et al., 2007). Las comparaciones se realizaron con el programa Clustal Omega, el cual utiliza árboles de decisión y perfil de modelos ocultos de Márkov (HMM) para generar alineamientos entre dos o más secuencias (Sievers and Higgins, 2014).

5.1.5 Cribado virtual (*Virtual screening*)

La estrategia de búsqueda de compuestos activos en este trabajo de investigación, contempla el cribado virtual basado en un modelo farmacofórico generado a partir de la pose del complejo CPA-CtpF obtenida en los estudios previos de acoplamiento molecular. Se identificaron las interacciones claves entre CPA y CtpF y se definieron como un patrón farmacofórico para la búsqueda automática de nuevos compuestos ajustados a este patrón. El cribado virtual basado en farmacóforo (definido desde ahora como PBVS), se realizó utilizando la interfaz en-línea de ZINCPharmer (<http://zincpharmer.csb.pitt.edu>) (Koes and Camacho, 2012). Como criterio de búsqueda se seleccionó la biblioteca ZINC de compuestos comercialmente disponibles (Wolber and Langer, 2005). Este enfoque incluye interacciones proteína-ligando en contacto con el farmacóforo y filtros *drug-like*. (Lipinski, 2000; Veber et al., 2002). Los compuestos obtenidos o *hits*, fueron también restringidos a aquellos con la mejor afinidad geométrica promedio al patrón de búsqueda, permitiendo 1.0 Å como RMSD máximo, entre las posiciones de los átomos del ligando y posiciones de los átomos del patrón (Koes and Camacho, 2012).

Los compuestos candidatos resultantes fueron descargados como un archivo único en formato sdf. Estas estructuras fueron preparadas de igual manera a la descrita en 2.2.2.

Posteriormente, con los compuestos candidatos se realizó un cribado virtual por acoplamiento molecular (definido desde ahora como DBVS) sobre el sitio de unión de CPA del modelo CtpF construido por homología. La programación del DBVS se configuró de la misma manera que la utilizada para el acoplamiento de CPA usando Glide SP y XP.

La afinidad de los complejos proteína-ligando resultantes del DBVS fue re-evaluada por cálculos de mecánica molecular basados en Área de Superficie Generalizada-Born (MM-GBSA), para predecir de manera más exacta las energías libres de unión. Los nuevos valores

de energía MM-GBSA permiten obtener una clasificación más confiable (Lyne et al., 2006; Mulakala and Viswanadhan, 2013). Los cálculos de MM-GBSA fueron realizados con el módulo Prime de Schrödinger (Schrödinger LLC, 2014) usando el modelo de solvatación VSGB-2.0 (Li et al., 2011).

5.2 Ensayos biológicos

5.2.1 Cepas micobacterias y condiciones de cultivo

La evaluación de la actividad antimicobacteriana en células completas, así como en el modelo *in vitro* de infección en macrófagos MH-S, de los compuestos candidatos derivados del diseño racional establecido en este trabajo fue realizada con la cepa de *Mtb* virulenta *Mtb* H37Rv. Todos los ensayos realizados con esta cepa virulenta fueron llevados a cabo en el laboratorio de bioseguridad nivel III de la unidad de Patología experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México.

Los ensayos de actividad ATPasa fueron realizados en vesículas de membrana obtenidas a partir de la cepa de *Mtb* no virulenta, *Mtb* H37Ra, y la cepa *Mtb* H37Ra defectiva en el gen *ctpF* (*Mtb* Δ *ctpF*). La cepa *Mtb* Δ *ctpF* fue previamente construida por Milena Maya (Candidata a doctorado) como desarrollo de su tesis doctoral en nuestro Grupo de investigación (Maya-Hoyos et al., 2019).

En todos los casos, el número de bacterias fue calculado a partir de un stock en buffer fosfato salino (PBS) y glicerol al 10 %, mantenido a -80°C, el cual fue ajustado para tener una $OD_{600} = 0.85$ que corresponde aproximadamente a una concentración de 5×10^8 UFC/mL. Para su uso, las bacterias fueron descongeladas a 37°C por 10 minutos y sonicadas por 10 segundos. Se realizó una dilución con medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con OADC (ácido oléico, albúmina, dextrosa y catalasa; Becton-Dickinson) al 10 %, hasta obtener la concentración final en UFC/mL deseada en cada ensayo, según la densidad óptica. Para los ensayos de viabilidad micobacteriana se usó una densidad óptica $OD_{600} = 0.4$ correspondiente a $\sim 3.5 \times 10^5$ y para el aislamiento de vesículas de membrana una densidad óptica $OD_{600} = 0.6$ correspondiente a $\sim 2.5 \times 10^7$.

5.2.2 Evaluación de la actividad antimicobacteriana de los compuestos seleccionados

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de CPA y de los compuestos seleccionados por

PBVS y cálculos de energía de unión por MM-GBSA, fue evaluada *in vitro* frente a *Mtb* H37Rv, para así determinar su actividad antimicobacteriana. CPA fue obtenido desde sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Los compuestos de la base de datos ZINC fueron obtenidos en la casa comercial MolPort (MolPort house, USA). Todos los compuestos fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) estéril y almacenados a -20 °C hasta su uso. Las diluciones seriadas de los compuestos se prepararon en medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con OADC al 10 %.

Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio [CLSI, *formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)] (M. P. Weinstein, 2012) con modificaciones (Martin et al., 2003). En general, 100 µL de cultivo micobacteriano correspondiente a $\sim 3.5 \times 10^5$ unidades formadoras de colonias (UFCs) en medio Middlebrook 7H9 + OADC y Tween 80 al 0.05 %, pH 7.2, se mezclaron por separado con 100 µL de diluciones seriadas de los compuestos (desde 200 a 0,78 µg/mL, concentración final) en placas de microtitulación de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C con agitación (90 rpm) durante 6 días. Posteriormente, se agregaron 30 µL de resazurina al 0.01 % a cada pocillo y las placas se incubaron durante 48 horas adicionales a 37 °C protegidas de la luz. Las células viables se detectaron colorimétricamente. Un cambio de color de azul a rosa indicó crecimiento celular (Khalifa et al., 2013; Martin et al., 2003; Palomino et al., 2002).

La CMI se estableció como la concentración del compuesto que inhibe ≥ 90 % del crecimiento celular correspondiente a la concentración del pozo previo al que se observó el cambio de color. Este valor fue obtenido a partir de dos experimentos independientes por cuadruplicado. Como controles se usaron: control del medio (medio de cultivo sin bacterias), control positivo (cultivo bacteriano sin compuestos), control negativo (cultivos suplementados con RIF: 0,125 µg/mL), control del solvente de los compuestos (DMSO al 1 %).

El porcentaje de inhibición del crecimiento se determinó subcultivando diluciones del pocillo correspondiente a la CMI para cada compuesto en medio sólido Middlebrook 7H10 + OADC (Becton-Dickinson). Se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) después de 21 días de incubación a 37 °C. El porcentaje de inhibición fue calculado al comparar las UFCs del control de 100 % crecimiento (sin compuesto) con las UFCs en presencia de los compuestos evaluados.

5.2.3 Efecto de CPA y los compuestos seleccionados sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa en vesículas de membrana de *Mtb*

Se evaluó el efecto del CPA y de los compuestos seleccionados sobre la actividad ATPasa estimulada por Ca^{2+} en las vesículas de membrana invertidas obtenidas a partir de *Mtb* H37Ra WT (*Mtb* WT) y la cepa *Mtb* Δ *ctpF*.

Las vesículas de membrana plasmática de las micobacterias fueron aisladas a partir de un cultivo bacteriano masivo en medio líquido Middlebrook 7H9 + OADC con una $\text{OD}_{600} = 0,6$ y utilizando un protocolo de lisis mecánica y centrifugación diferencial implementado por Basu et al, con modificaciones realizadas en nuestro grupo de investigación (Basu et al., 1992; Santos et al., 2012). Se garantizó que todo el proceso de separación fuera mantenido a 4°C.

La conformación de membrana invertida fue asegurada al incluir en el buffer de reacción el detergente Brij-58, un polioxietilenacil éter cuya cabeza polar posee un tamaño tal que induce la apertura e inversión de vesículas de membrana de acuerdo con lo postulado en la hipótesis de acoplamiento de bicapas lipídicas; de esta manera quedan los dominios de fosforilación, actuador y de unión a nucleótido de CtpF expuestos al exterior de la vesícula, lo cual permite controlar el funcionamiento de la enzima por medio del consumo de ATP en el buffer de reacción (Johansson et al., 1995).

La concentración de proteína de membrana se estimó siguiendo el método Bradford-Zor-Selinger (Zor and Selinger, 1996), usando la fracción V de albúmina de suero bovino como estándar.

La actividad ATPasa en las vesículas de membrana plasmática se determinó cuantificando el fosfato inorgánico (Pi) liberado durante el ciclo catalítico de la ATPasa de tipo P utilizando el método de Fiske-Subbarow y el citrato de bismuto de acuerdo con las recomendaciones de Cariani (Cariani et al., 2004; Kyaw et al., 1985; León-Torres et al., 2015). En general, la reacción enzimática (50 μL) se llevó a cabo a pH 7,4 en un medio de incubación (10 mM MOPS pH 7.4, 3 mM MgCl_2 , y 0.02 % Brij-58) usando 10 μg de membrana plasmática. El buffer de reacción fue suplementado con Ca^{2+} (30 μM) para determinar la actividad ATPasa Ca^{2+} dependiente. El software Maxchelator (<http://maxchelator.stanford.edu/>) se usó para calcular el Ca^{2+} libre a partir de la concentración de Ca^{2+} total y de EGTA (Bers et al., 2010; Fabiato, 1988).

La comparación entre la actividad ATPasa Ca^{2+} dependiente en vesículas de membrana de *Mtb* WT y membrana de células defectivas del gen *ctpF*, *Mtb* Δ *ctpF*, permitió estimar la actividad Ca^{2+} -ATPasa específica de CtpF.

Para evaluar el efecto de CPA y los compuestos seleccionados sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa, los medios de reacción fueron suplementados individualmente con los compuestos a concentración final: 0.1 μM , 1.0 μM , 10 μM , 40 μM , 80 μM , 100 μM and 200 μM y pre-incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La concentración máxima permitida de DMSO en el medio de reacción fue 0.5 %.

Las reacciones enzimáticas se iniciaron agregando Na_2ATP 3 mM, se incubaron durante 30 minutos más a 37 °C y se detuvieron agregando 100 μL de solución de parada que contenía: 3.0 % de ácido ascórbico, 0.5 % de molibdato de amonio y 3.0 % de SDS en 1,0 M HCl. Finalmente, se agregaron 150 μL de citrato de bismuto al 3.5 % y citrato de sodio al 3.5 % en HCl 2.0 M, las muestras se incubaron a 37 °C durante 10 minutos, y el fosfato inorgánico liberado (Pi) se cuantificó colorimétricamente a 690 nm como se describió previamente (Ayala-Torres et al., 2015; Sikdar et al., 1991).

Reacciones sin proteína (control negativo), sin Ca^{2+} (actividad basal) y suplementados con los compuestos a evaluar, pero sin proteína se usaron como controles. La actividad Ca^{2+} -ATPasa se calculó como la diferencia de la actividad de ATPasa medida en presencia y ausencia de calcio. Se utilizó ortovanadato de sodio 50 μM como inhibidor de control de la actividad ATPasa tipo P (Saffioti et al., 2019). De manera similar, el efecto de los compuestos evaluados sobre la actividad de Ca^{2+} -ATPasa, se consideró como la diferencia entre la actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia y ausencia de los compuestos probados.

La actividad enzimática fue reportada como nmol de Pi liberado / mg de proteína \times min, a partir de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron utilizando el paquete de software GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, Inc). Este programa también se usó para calcular el IC_{50} , que representa la concentración del compuesto que produce la inhibición del 50 % de la actividad enzimática máxima. Las diferencias significativas entre la actividad de ATPasa estimulada por el calcio en presencia y ausencia de los compuestos se analizaron utilizando la prueba t de Student no pareada.

5.2.4 Evaluación de la actividad citotóxica y hemolítica de los compuestos seleccionados

La actividad citotóxica de CPA y los compuestos evaluados se determinó en células de macrófagos murinos de la línea celular MH-S en placas de fondo plano de 96 pocillos en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %. Específicamente, 100 μL de la línea celular MH-S (15,000 células) fueron tratadas de manera individual con diluciones seriadas de los compuestos (desde 200 a 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a un volumen final de 200 μL , y se

incubaron a 37 °C y 5 % CO₂ por 48 h. Posteriormente, se eliminaron los sobrenadantes y las células se fijaron con 100 µl de RPMI suplementado con glutaraldehído al 1 %. Las muestras se revelaron agregando 80 µL de solución de cristal violeta (CV) durante 10 minutos. Después, los pocillos se lavaron y secaron durante 20 minutos, y se añadieron 200 µL de ácido acético al 10 % a cada pocillo para liberar el CV acumulado dentro de las células fijas (Ishiyama et al., 1996). La OD₅₇₀ se midió usando un espectrofotómetro lector de micoplacas Epoch™ 2. Como control positivo en este ensayo de citotoxicidad se usaron células no suplementadas con compuestos, con adición de DMSO al 0.25 % v/v, el cual fue también un control del efecto del solvente de los compuestos. El ensayo se realizó por triplicado a partir de dos experimentos independientes. Los resultados se expresaron como el porcentaje de muerte celular, donde % de viabilidad = (OD de células tratadas) / (OD de células no tratadas) × 100.

El ensayo de actividad hemolítica se realizó en placas de fondo en V de 96 pocillos. Para esta evaluación se dispusieron 100 µl de una suspensión de eritrocitos humanos O Rh (+) de donantes sanos por pocillo al 2 % (concentración final) en solución salina al 0,9%. Luego, las muestras se suplementaron con 100 µL de diluciones seriadas de los compuestos (de 200 a 0.78 µg / mL) y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 2 horas. Posteriormente, las placas se centrifugaron a 3500 rpm y se midió la concentración de hemoglobina en los sobrenadantes a una OD₅₅₀, usando un espectrofotómetro lector de micoplacas Epoch™ 2. Las células suspendidas en solución salina (0 % de hemólisis) y en agua destilada (100 % de hemólisis) se utilizaron como controles negativos y positivos, respectivamente. (Braga et al., 2014). Los experimentos se realizaron por triplicado a partir de dos experimentos independientes y se expresaron como un porcentaje de hemólisis con respecto a los controles.

5.2.5 Evaluación del perfil transcripcional de las ATPasas tipo P2 en respuesta a CPA

Este tipo de análisis permitió conocer el perfil de expresión de los genes de las ATPasas tipo P2 de *Mtb* en respuesta al tratamiento con CPA y así evaluar si la estimulación es específica del gen *ctpF*.

La evaluación del comportamiento transcripcional de las ATPasas tipo P2, se realizó a partir de células *Mtb* H37Ra WT (*Mtb* WT), cultivadas en la presencia de CPA y a la mitad de la concentración CMI (Ekins et al., 2014). Los genes que se evaluaron fueron las ATPasas tipo P2: *ctpF*, *ctpE*, *ctpH*, *ctpI*, transportadores de metales alcalino / alcalino-térreos, y el gen no relacionado de ATPasas tipo P1B *ctpA*, transportador de metales pesados.

La metodología empleada para este análisis transcripcional, implicó el crecimiento de *Mtb* WT en 300 mL de medio Middlebrook 7H9 suplementado con OADC, glicerol y tween 80 hasta la fase exponencial. Posteriormente, el cultivo se expuso al compuesto CPA, a la mitad de la CMI obtenida de acuerdo con los resultados del ensayo de inhibición del crecimiento, por un tiempo de 3 horas y por triplicado. Un cultivo control paralelo fue tratado con DMSO (usado como blanco y control del solvente) en lugar del compuesto en estudio, a una concentración de 0.5 % y por triplicado.

Luego, se realizó extracción de ARN por el método del Trizol, tratamiento con DNAsas y síntesis de cADN, para la realización de ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Todos estos procedimientos se describen en orden a continuación.

▪ Extracción de ARN y síntesis de cADN de *Mtb*

A partir de los triplicados de los cultivos micobacterianos (cultivos en presencia de CPA y cultivos control en ausencia del compuesto) se realizó la extracción del ARN con el método TRIzol (Invitrogen), basado en una metodología denominada *single-step* (Chomczynski, 1987), la cual a través del empleo de una solución ácida de tiocianato de guanidinio, acetato de sodio, fenol y cloroformo logra separar el ARN del ADN genómico al mantenerlo en la fase acuosa, desplazando a la mayoría de las proteínas y ADN hacia la interfase y la fase orgánica. Cuando se remueve la fase acuosa, el ARN se puede precipitar de ella utilizando isopropanol.

Para esto los cultivos (50 mL cada uno), fueron centrifugados a 7.600 rpm por 15 minutos a 4°C. Los pellets celulares se resuspendieron en 1000 µL del reactivo de TRIzol® (Invitrogen), se añadieron 100 µL de agua DEPC y 0.5 µL de inhibidor de RNAsas (Ribolock) de Thermo Scientific.

Para la lisis celular, se transfirió la suspensión celular a tubos O-ring conteniendo 500 µL de perlas de zirconio; las células se lisaron mediante 6 pulsos de 1 minuto en Mini Beadbeater-16 (Biospec), con 1 minuto de reposo en hielo entre pulsos. Se centrifugaron los tubos a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C y se transfirieron los sobrenadantes a nuevos microtubos. Posteriormente se añadieron 300 µL de cloroformo al lisado celular. Se dejaron en reposo por 10 minutos a 4 °C y se centrifugaron a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. La fase acuosa fue separada y el ARN se precipitó añadiendo un volumen igual de isopropanol (IPA) e incubando toda la noche a -20 °C. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 20 min y a 4 °C. Los pellets que correspondieron al ARN precipitado fueron secados al aire y resuspendidos en 30 µL de DEPC 0.1 %. La integridad del RNA extraído fue corroborada en gel de agarosa al 2 % en buffer TE 0.5X-DEPC. Posteriormente fue tratado

con DNAsa I (Thermo Scientific), durante 30 minutos a 37 °C, para eliminar ADN genómico contaminante. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 2 µg de ARN tratado con DNAsas y se construyeron las librerías de cADN usando el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific). El cADN se almacenó a -20°C hasta su uso.

▪ Análisis transcripcional de las ATPasas tipo P2 por qRT-PCR

Los niveles de transcripción de los genes de las ATPasas tipo P2 fueron analizados mediante qRT-PCR, utilizando el kit EXPRESS SYBR GreenER qRT-PCR SuperMix (Invitrogen), en un termociclador CFX-96 (Biorad). Se usaron los iniciadores diseñados previamente por el grupo de investigación Bioquímica y Biología Molecular de las micobacterias para los genes *ctpF*, *ctpE*, *ctpH*, *ctpI* y el gen no relacionado *ctpA* (Novoa-Aponte, 2016). El gen *sigA* fue utilizado como normalizador y se realizó una cuantificación relativa, determinando la eficiencia de todos los cADN extraídos y haciendo un análisis por medio del método de Pfaffl (Pfaffl et al., 2004). En la tabla 5-2 se indican las secuencias y tamaños de los productos esperados para cada juego de iniciadores.

Tabla 5–2. Iniciadores usados para análisis por qRT-PCR de los genes de las ATPasas tipo P2.

Gen	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
<i>ctpF</i>	F-RT-dir	cagtgatcttcggtgtggtg	192
<i>ctpF</i>	F-RT-rev	tgactcggtcacgctcaatc	192
<i>ctpE</i>	E-RT-dir	ccgtgaaacgctggattatt	172
<i>ctpE</i>	E-RT-rev	acggccaaaactggtgtaag	172
<i>ctpH</i>	H-RT-dir	ggtgctcaccgaaactcta	249
<i>ctpH</i>	H-RT-rev	acgtcgacctcctcaatcac	249
<i>ctpI</i>	I-RT-dir	ctgtcctacgaaccggtgat	178
<i>ctpI</i>	I-RT-rev	agtagcgcgtcgatattgct	178
<i>ctpA</i>	A-RT-dir	gaccacctcgacgttgacc	192
<i>ctpA</i>	A-RT-rev	caagctgttgagaccacga	192
<i>sigA</i>	RTsigA-dir	Cctacgctacgtggtggatt	208
<i>sigA</i>	RTsigA-rev	tggatttccagcactctcc	208

Se indican los iniciadores diseñados para el análisis transcripcional de las ATPasas tipo P2 y *ctpA* como gen no relacionado, mostrando los tamaños del amplicón esperado para cada juego de iniciadores.

Para cada juego de iniciadores se construyó previamente una curva de eficiencia de amplificación, con el fin de asegurarse que estos pudieran ser empleados para el análisis por qRT-PCR. Las curvas de eficiencia se realizaron partiendo de diferentes concentraciones de ADN genómico de *Mtb* H37Ra, estandarizando las condiciones de reacción para cada juego de iniciadores con el objetivo de obtener una eficiencia cercana a 2, además de evidenciar la amplificación de un único producto asegurando la especificidad de los iniciadores.

5.2.6 Evaluación del efecto de los compuestos seleccionados en un modelo de infección de macrófagos

En este ensayo usando un modelo celular, se busca reproducir *in vitro* la interacción macrófago-*Mtb* y evaluar el efecto de los compuestos que demostraron tener mayor actividad antimicobacteriana e importante inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa, ahora en un modelo macrófago de infección. Esta aproximación permitió estimar la actividad anti-TB de los compuestos frente a *Mtb* en las condiciones enfrentadas una vez ocurrida la infección. Determinar la actividad inhibitoria de moléculas con posible actividad anti-TB en estos modelos de infección, apoya la identificación de compuestos inhibitorios líderes en etapas tempranas de desarrollo (Sarkar and Sarkar, 2012; Schaaf et al., 2017, 2016)

Este estudio fue realizado en macrófagos murinos de la línea celular MH-S infectados con *Mtb* H37Rv en presencia de los compuestos a evaluar. Se llevó a cabo en cuatro tiempos de incubación: día 0 (D0), que permitió estimar el efecto de los compuestos en la fagocitosis. En los tiempos día 1 (D1), día 3 (D3) y día 6 (D6), se evaluó el efecto sobre la replicación de *Mtb* dentro del macrófago una vez ocurrida la fagocitosis.

El ensayo se realizó en cuatro etapas. La primera es la preparación del cultivo celular de los macrófagos MH-S, asegurando un específico número de células. La segunda etapa es el estímulo o adición de compuestos al cultivo celular en una concentración final correspondiente a la CMI obtenida previamente. La tercera etapa es la infección de *Mtb* H37Rv, o fagocitosis. La cuarta etapa es el killing o lisis de los macrófagos para el conteo de UFC/mL intracelulares. El desarrollo de cada una de estas etapas se realizó de la siguiente manera:

• Cultivo de células MH-S

Para este estudio se empleó una línea celular continua de macrófagos alveolares murinos, células MH-S (Hsieh et al., 2018), derivados de ratones BALB/c (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Esta línea celular MH-S, es susceptible a la infección por *Mtb* y ha sido ampliamente empleada como modelo celular para el estudio de respuesta inmune respiratoria del hospedero (Liu et al., 2018; Yuan et al., 2012).

Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), suplementado con suero fetal bovino 10 %, l-glutamina 20 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 10 mM y glucosa 1 %. Se incubaron a 37 °C en 5 % CO₂ por 24H hasta alcanzar la confluencia y formar una monocapa de 2×10^5 células/pozo (recuento final esperado). Se calcularon células para todos los pozos de 4 placas: D0, D1, D3 y D6 más un exceso de 1/10.

▪ Infección y fagocitosis de *Mtb* H37Rv en presencia de los compuestos a evaluar

La infección *in vitro* de las células MH-S fue realizada con *Mtb* H37Rv. Se realizó a una relación de multiplicidad de infección o MOI de 1:5 (5 bacterias / 1 célula)(Hsieh et al., 2018). Como se describió previamente se ajustó el número de bacterias para cada pozo a 1.0×10^6 UFC/mL y de 2×10^5 células/pozo.

El efecto de los compuestos sobre la fagocitosis fue evaluado al mismo tiempo en que se lleva a cabo la infección. La adición de los compuestos a las células macrófagos MHS se denomina “estímulo” ya que se evalúa el efecto o estímulo que puedan causar. Se realizó con los compuestos que presentaron mayor actividad antimicobacteriana y además inhibición de la actividad Ca²⁺-ATPasa de *Mtb* H37Rv, a las concentraciones de la CMI.

Para la realización de este ensayo, se usaron placas de poliestireno de 12 pozos fondo plano, asignando una columna como control de fagocitosis: con células MH-S infectadas con *Mtb* H37Rv, sin estímulo (sin compuesto). A estos pozos se adicionaron 200 µl de medio RPMI y dimetil sulfóxido (DMSO) 0.1 % como control adicional del efecto del solvente (Liu et al., 2018). Tres columnas de pozos fueron reservadas para la evaluación del efecto de los compuestos sobre la fagocitosis o evaluación del estímulo, por triplicado. A estos pozos se adicionaron 200 µl de medio RPMI y el volumen necesario del stock de cada compuesto para obtener la concentración final deseada, asegurando una concentración máxima de DMSO 0.1 %. Todas las placas de cultivo fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, para permitir el equilibrio de los compuestos en solución.

La infección se llevó a cabo mediante la adición de 300 μL de la suspensión de bacterias (1×10^6 bacterias/pozo) a cada pozo, teniendo de este modo 500 μL de volumen final. Se permitió la infección por 3 horas a 37 °C, 5 % CO_2 , tiempo que tarda en llevarse a cabo la fagocitosis (Bongiovanni et al., 2015).

Posteriormente, se retiró el sobrenadante a todos los pozos y se hicieron lavados con medio RPMI 1640 con antibiótico (penicilina 50 U/mL y estreptomycinina 0.05 mg/mL). Finalmente se adicionaron 200 μL de RPMI 1640 a los pozos de las células sin y con estímulo y se incubaron a 37 °C, 5 % CO_2 durante 1 hora (D0), 24 horas (D1), 72 horas (D3) y 144 horas (D6).

▪ **Evaluación del crecimiento intracelular de *Mtb* H37Rv en células MH-S (Killing)**

Para determinar el efecto de los compuestos evaluados sobre la fagocitosis y crecimiento intracelular de *Mtb* H37Rv en los macrófagos, las células MH-S infectadas fueron lisadas con 200 μL de SDS (dodecyl-dulfato de sodio) 0.1 % por diez minutos y neutralizando la lisis con 100 μL de BSA (albúmina sérica bovina) al 20 %. Esta parte del ensayo busca liberar los bacilos fagocitados y evaluar viabilidad de los mismos mediante el recuento de UFCs/mL.

Se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) de la suspensión de lisis en medio Middlebrook 7H9 + OADC, las que fueron cultivadas en medio sólido Middlebrook 7H10 + OADC e incubadas a 37 °C, 5 % CO_2 por 21 días por triplicado para cuantificar el crecimiento intracelular de *Mtb* H37Rv viables mediante el recuento de las UFC/mL. Los resultados se evaluaron según la diferencia en el crecimiento intracelular en presencia de los compuestos estimando las UFC/mL a los tiempos de incubación D0, D1, D3 y D6, y comparando con el control de fagocitosis sin estímulo.

Previo a la realización del Killing, se revisó al microscopio de luz invertida la integridad de las células MH-S y se tomó registro fotográfico. Adicionalmente, se realizó control de las bacterias usadas en la infección. Para esto, diluciones seriadas de la suspensión bacteriana empleada en la infección fueron sembradas en medio sólido Middlebrook 7H10 + OADC a 37 °C, 5 % CO_2 por 21 días para la verificación de las UFC/mL (cantidad de bacterias sembradas).

▪ **Análisis estadístico**

Los resultados se reportaron como la media \pm SEM, a partir de dos experimentos independientes realizados por triplicado o cuadruplicado. La significancia estadística fue

analizada por la prueba t-Student no pareada. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$; **** $P < 0.001$. El análisis estadístico fue realizado el programa Prism version 5 (GraphPad Prism 5 Software, San Diego, CA, USA).

6. Resultados y discusión

A continuación, se describen y discuten los resultados obtenidos de la estrategia metodológica propuesta. Se presentan de manera cronológica como fueron planteados para dar respuesta a los objetivos específicos del presente trabajo de investigación.

6.1 Modelo 3D de CtpF por homología

Hasta la fecha no existe descripción de estructuras cristalográficas de las ATPasas tipo P de *Mtb*. Previa aproximaciones bioinformáticas han permitido caracterizar ciertos aspectos estructurales de CtpF. Un análisis por comparación de la secuencia de aminoácidos predice que CtpF-*Mtb* es un transportador de cationes alcalino/alcalino-térreos homólogo a la Ca²⁺-ATPasa eucariota de retículo sarco-endoplásmico SERCA, isoforma 1a (Novoa-Aponte et al., 2012). También se ha logrado describir su topología transmembranal y posible número de sitios de unión al Ca²⁺ (Novoa-Aponte, 2016). En este trabajo, la estructura tridimensional (3D) de CtpF-*Mtb* fue construida mediante modelado por homología utilizando como plantilla la estructura cristalina de SERCA1a en conformación E2 y estabilizada con CPA (código PDB: 3FGO) (Laursen et al., 2009). La secuencia de aminoácidos de SERCA1a fue obtenida de la base de datos UniProt con el código P04191. Ambas secuencias de aminoácidos muestran un 35.3 % de identidad según la herramienta Clustal Omega (Sievers and Higgins, 2014). El alineamiento de estas secuencias se indica en el Anexo B.

El modelo 3D de CtpF-*Mtb* fue construido con el servidor de modelado por homología Swiss-Model a partir del alineamiento con la plantilla seleccionada. Posteriormente el modelo generado fue refinado usando la herramienta *Protein Preparation Wizard* de Maestro-Schrödinger, que completa residuos con átomos faltantes, ajusta conformaciones de cadenas laterales, resuelve átomos solapados, crea puentes disulfuro, completa hidrógenos, remueve moléculas de agua no estructurales y define los estados de protonación para los residuos expuestos al solvente. Finalmente, se relajó el modelo y su muestreo conformacional se obtuvo realizando una simulación de dinámica molecular de 20 ns. Se seleccionó la conformación más estable de esta simulación para tener un modelo confiable de CtpF. La representación de esta conformación se describe en la figura 6-1 A. Similar a SERCA1a y a otras ATPasas tipo P2

(Axelsen and Palmgren, 1998), el modelo CtpF está conformado por tres dominios citoplasmáticos: un dominio de unión a nucleótidos (N) conectado a un dominio de fosforilación (P), un dominio actuador (A) y 10 hélices transmembranales (TMDs), M1 a M10.

La calidad estereoquímica de CtpF se evaluó con PROCHECK y los resultados revelaron que el 91 % de los residuos se encuentran en las regiones más favorables del gráfico de Ramachandran y la desviación cuadrática media (RMSD) con respecto a la plantilla SERCA1a es 0.890 Å, lo que demuestra que el modelo CtpF es preciso y confiable (Figura 6-1 B). Además, el modelo se validó utilizando ProSA-web, que midió la desviación de la energía total de la estructura en comparación con una distribución de energía derivada de conformaciones aleatorias. El análisis arrojó un puntaje Z-score de -5.98, lo que indica en general una buena calidad (Figura 6-1 C). SERCA1a y CtpF mostraron una estructura 3D de conformación global muy similar, que incluyen la mayoría de los residuos alrededor del sitio de unión de CPA con posiciones casi idénticas.

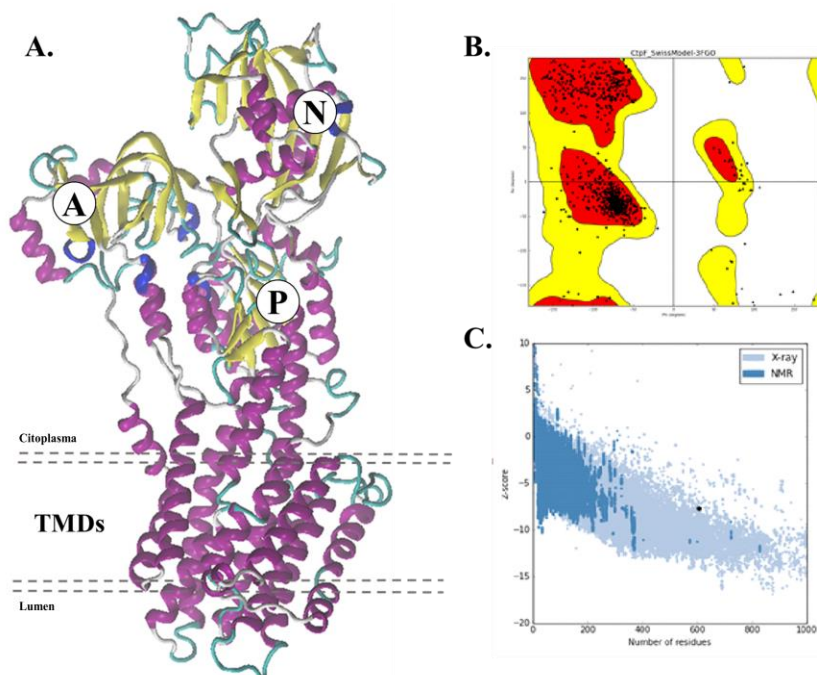


Figura 6–1. Estructura y validación del modelo 3D de CtpF.

- A. Modelo 3D de CtpF generado por modelado por homología: se representan los dominios citoplasmáticos (N) dominio de unión a nucleótidos; (P) de fosforilación; (A) dominio actuador y dominios transmembranales (TMD). B. Gráfico de Ramachandran del modelo 3D de CtpF. C. Gráfico ProSA: el Z-score para CtpF se indica con un punto negro.

La información anterior permite considerar que este modelo CtpF tiene calidad suficiente para fines de diseño de fármacos basados en la estructura. En este caso, el uso de herramientas computacionales y una simulación de la dinámica molecular permitió construir un modelo de estructura 3D de la proteína, en donde fue posible identificar los dominios característicos de la familia de las ATPasas tipo P2.

6.2 Acoplamiento molecular (*docking*) de CPA con el modelo 3D CtpF-*Mtb* y SERCA1a

El acoplamiento molecular de CPA en el modelo 3D CtpF-*Mtb* se comparó con el auto-docking en SERCA1a. Los resultados indican que el modo de unión y orientación CtpF-CPA es similar al modo de unión del cristal SERCA1a-CPA (3FGO) (Laursen et al., 2009). La figura 6-2 A, muestra el alineamiento estructural entre SERCA1a y el modelo de CtpF después de los cálculos de acoplamiento. La similitud del modo de unión de CPA dentro de ambas proteínas indica que este ligando tiene una misma orientación y los dos sitios de unión están altamente conservados.

Los modos de unión de CPA en SERCA1a reportados en las estructuras cristalográficas, describen que el sitio de unión de CPA está formado por dos bolsillos: **i)** un bolsillo polar orientado hacia M1 y M2 (con residuos Gln56 y Asn101) donde se establecen contactos cortos con el motivo ácido tetramérico de CPA. En esta región polar, se han reportado interacciones adicionales con Gln56 mediadas por una molécula de agua (Moncoq et al., 2007) y otros autores han descrito que se requiere un ion metálico divalente para la unión de CPA a través de la coordinación del resto de ácido tetramérico (Laursen et al., 2009). Y **ii)** el otro bolsillo de unión de CPA es hidrofóbico y adyacente a M3 y M4, haciendo contactos cortos con el anillo indol.

Los resultados del auto-docking de CPA en SERCA1a mostraron la misma orientación que el cristal, con un valor RMSD de 0.325 Å entre ambos modos de unión. El acoplamiento de CPA en CtpF también condujo a la misma orientación con respecto al cristal 3FGO, con un valor de RMSD de 0.665 Å (Figura 6-2 A). Adicionalmente, el modelo auto-docking muestra que un enlace de hidrógeno se puede formar entre un átomo de nitrógeno del anillo indol y Leu253, el que ha sido propuesto que mejora la afinidad del compuesto (Laursen et al., 2009); un enlace similar se forma con el modelo de CtpF y el aminoácido Leu245 (Figura 6-2 B).

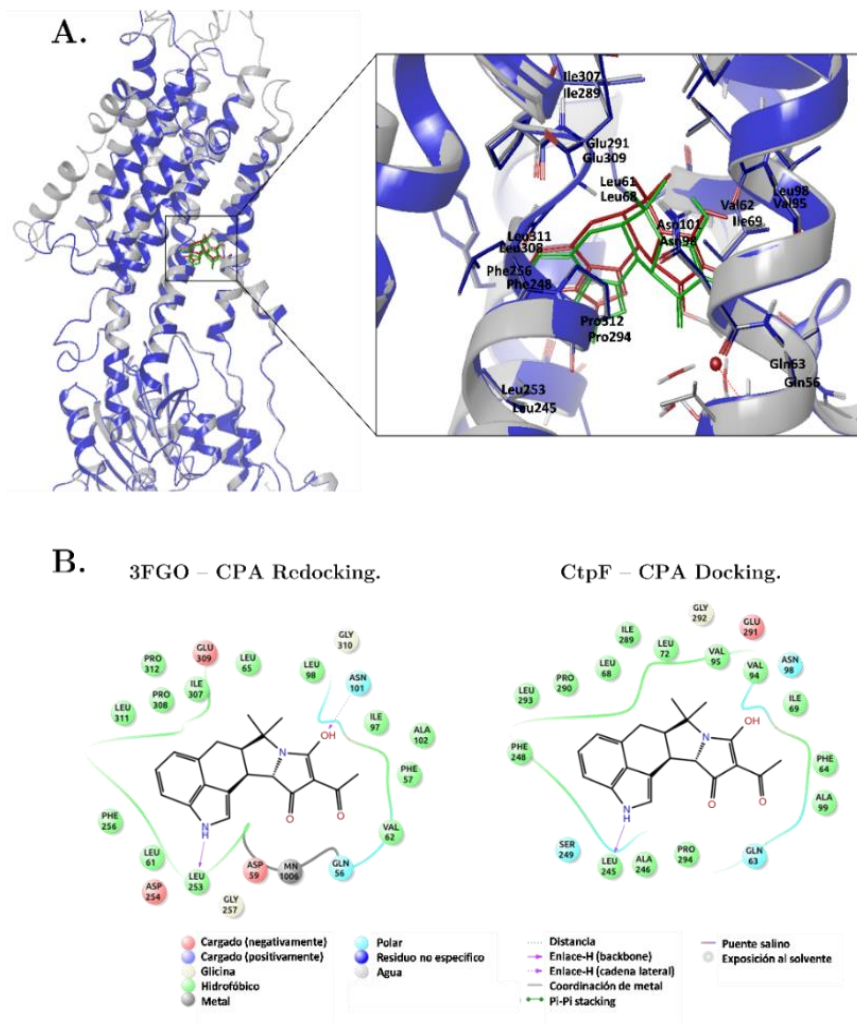


Figura 6–2. Acoplamiento molecular de CPA en SERCA1a y CtpF-*Mtb*.

A. Alineamiento estructural de 3FGO (gris) y CtpF (azul), con CPA en el bolsillo de SERCA1a (auto-docking: verde) y en CtpF (rojo). **B.** Visualización 2-D del modo de unión de CPA con SERCA1a (Izquierda) y modelo CtpF (derecha). En ambas figuras se muestran los residuos que representan las interacciones más importantes dentro de 4 Å.

Como se muestra en la tabla 6-1, el alineamiento estructural de los residuos a 4 Å de CPA en el sitio de unión tanto en SERCA1a como en CtpF, indica que este sitio de unión está integrado por 13 residuos, de los cuales las principales diferencias radican en los aminoácidos Asp59, Val62 y Leu98 en SERCA1a que corresponden respectivamente en la secuencia de CtpF a His66, Ile69 y Val95. Todos estos residuos están cerca del motivo ácido tetrámico de CPA.

Tabla 6–1. Comparación de los residuos del sitio de unión de CPA en SERCA1a y CtpF.

Residuos en el sitio de unión de SERCA1a	Residuos en el sitio de unión de CtpF
Gln56	Gln63
Asp59	His66
Leu61	Leu68
Val62	Ile69
Leu98	Val95
Asn101	Asn98
Ala102	Ala99
Leu253	Leu245
Phe256	Phe248
Ile307	Ile289
Glu309	Glu291
Leu311	Leu308
Pro312	Pro294

Se indican los residuos dentro de 4.0 Å de CPA. Los residuos que son diferentes en las dos proteínas se resaltan en negrita

De estos residuos, la principal diferencia recae en Asp59, residuo polar con carga negativa, en SERCA1a sustituido por His66, residuo polar con carga positiva en CtpF. Si bien estos dos residuos hacen parte del bolsillo de unión no forman interacciones importantes con CPA, por lo tanto, este cambio de carga no tendría mayor inferencia en el modo de unión. En comparación con estos, se encuentran diferencias menores entre los residuos Val62 y Leu68 en SERCA1a y sus homólogos Ile69 y Val95 en CtpF, ya que estos aminoácidos tienen características fisicoquímicas similares. En general, los resultados de acoplamiento molecular sugieren que estos cambios no afectaron la energía ni el modo de unión de CPA en las dos proteínas.

6.3 Comparación de los residuos de coordinación a CPA en diferentes Ca²⁺-ATPasas tipo P

Mediante un alineamiento múltiple realizado con el programa Clustal Omega, se compararon las secuencias de algunas Ca²⁺-ATPasas presentes en organismos eucariotas y en bacterias, incluyendo CtpF. Esta comparación fue importante para identificar los residuos determinantes

en la unión a CPA y de este modo establecer las diferencias entre las ATPasas sensibles y no sensibles a CPA. El alineamiento completo se aporta en el Anexo C.

Como se observa en la figura 6-3, existen diferencias importantes en los residuos de coordinación a CPA entre los dos grupos de Ca²⁺-ATPasas, pudiendo establecerse una diferencia entre sensibles e insensibles a CPA con respecto a SERCA1a. Se muestran en negrita los residuos que forman las interacciones más importantes con CPA y que además están conservados en las ATPasas tipo SERCA1a.

		<u>M1</u>			<u>M2</u>			<u>M3</u>		<u>M4</u>																											
		56	59	61	62	98	101	102	253	256	307	309	311	312																							
Sensibles a CPA	SERCA1a	I	E	Q	F	E	D	L	L	V	R	I	L	I	A	N	A	I	V	Q	K	L	D	E	F	G	A	A	I	P	E	G	L	P	A	V	P04191
	PfATP6	L	N	Q	F	D	D	L	L	V	K	I	L	I	L	N	A	V	I	K	I	D	L	F	G	A	A	I	P	E	G	L	P	A	V	Q08853	
	BACA1	F	A	Q	I	N	D	V	L	V	Y	V	V	V	L	N	A	V	I	K	S	L	A	Q	V	G	A	A	I	P	E	G	L	P	A	I	Q73E41
	CtpF	L	R	Q	F	H	H	P	L	I	Y	V	V	V	I	N	A	I	V	A	K	L	A	W	F	S	G	A	I	P	E	G	L	P	T	A	P9WPS9
Insensibles a CPA	PMCA1	W	E	A	L	Q	D	V	T	L	I	I	V	V	C	V	V	L	V	G	K	L	T	K	L	A	V	A	V	P	E	G	L	P	L	A	P020020
	ATPase_2C1	I	S	Q	F	K	N	P	L	I	M	L	I	L	I	V	V	T	V	K	S	M	D	L	L	G	A	A	I	P	E	G	L	P	I	V	P098194
	Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	C	R	Q	L	F	G	F	S	M	L	V	I	I	T	G	C	F	A	E	I	E	H	F	I	A	N	V	P	E	G	L	L	A	T	P05023	
	LMCA1	L	E	T	F	K	D	P	M	V	I	V	L	I	V	N	S	I	I	R	K	L	E	S	F	S	A	A	I	P	E	A	L	S	S	I	Q8Y8Q5
	LLCA1	I	D	T	L	K	D	P	M	V	I	I	L	M	I	N	S	V	V	Q	K	L	E	K	F	G	A	A	I	P	E	A	L	S	S	V	Q9CFU9

Figura 6-3. Alineamiento múltiple de algunas Ca²⁺-ATPasas de eucariotas y procariontas.

Se presentan las secuencias de ATPasas tipo P sensibles e insensibles a CPA de manera separada. Se resaltan en amarillo los trece residuos implicados en la coordinación de CPA. Se indican en negrilla los residuos con las interacciones más importantes y en rojo los residuos reemplazados con respecto a SERCA1a.

A diferencia de las ATPasas tipo P sensibles a CPA, aquellas con demostrada baja sensibilidad, presentan un número elevado de residuos reemplazados. Como es el caso de la proteína PMCA1, que a pesar de presentar un porcentaje de identidad del 29.5 %, tiene ocho de los trece residuos no conservados en el alineamiento con respecto a SERCA1a. Las Ca²⁺-ATPasas LMCA1 y LLCA1 que experimentalmente han sido reportadas como insensibles (Kotšubei et al., 2013), tienen cuatro aminoácidos diferentes con respecto a las sensibles tipo SERCA1a que, aunque puede ser un número bajo, precisamente estos residuos hacen parte de las interacciones más importantes, lo que podría estar generando una unión inestable con CPA.

CtpF solo presenta cambios en tres posiciones His66, Ile69 y Val95 (Tabla 6-1), lo que junto con los resultados del acoplamiento de CPA en CtpF, permite sugerir que estos reemplazos no afectarían de manera importante la interacción, ya que la orientación con respecto al cristal 3FGO fue similar. Sin embargo, la sensibilidad de CtpF a CPA fue evaluada

experimentalmente para validar la importancia de estos residuos, como se discute a continuación.

6.4 Actividad biológica de CPA

Con el objetivo de evaluar *in vitro* si existe una correlación entre la unión de CPA a los dominios TMDs de CtpF implicados en el transporte de calcio con su actividad Ca^{2+} -ATPasa y más aún, si esta afectación repercute en la viabilidad de *Mtb*, se estimó el efecto de CPA en los ensayos de actividad enzimática y viabilidad micobacteriana. Adicionalmente se estudió el perfil de expresión de *ctpF* y los demás genes de las ATPasas tipo P2 de *Mtb* en respuesta a CPA, con el fin de determinar la especificidad de su respuesta.

Con estos resultados se busca establecer una relación que justifique la postulación de CtpF como una diana molecular para el desarrollo de la estrategia de búsqueda de compuestos con actividad anti-TB.

6.4.1 Efecto de CPA sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa

Mediante un ensayo de actividad ATPasa se evaluó la capacidad de CPA de inhibir la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de *Mtb* de manera similar a lo observado en SERCA1a

Como punto de partida, se determinó la actividad ATPasa basal (actividad no estimulada por iones) de las vesículas de membrana. Luego, se evaluó la actividad ATPasa estimulada por Ca^{2+} , que se denominará Ca^{2+} -ATPasa (actividad en presencia de Ca^{2+} libre) y la actividad ATPasa tipo P específica, en presencia de vanadato, un inhibidor de ATPasas tipo P (Caroni and Carafoli, 1981; Saffioti et al., 2019). Estas determinaciones se realizaron en vesículas de membrana invertidas de *Mtb* H37Ra tipo silvestre (*Mtb* WT) y *Mtb* H37Ra defectiva en el gen *ctpF* (*Mtb* Δ *ctpF*). La evaluación de la actividad con la cepa *Mtb* Δ *ctpF* permitió tener un control para diferenciar la verdadera actividad Ca^{2+} -ATPasa dirigida por CtpF de otros transportadores que puedan tener afinidad por el calcio presente en las membranas de *Mtb* (Novoa Aponte, 2017).

De acuerdo con las condiciones anteriores, la actividad Ca^{2+} -ATPasa tipo P de *Mtb* se estimó como la diferencia entre la actividad ATPasa estimulada por Ca^{2+} y la actividad ATPasa estimulada por Ca^{2+} en presencia de vanadato (50 μM).

Los resultados indican que el Ca^{2+} (30 μM) causó una estimulación de la actividad ATPasa

basal de *Mtb* WT en un 30 %, mientras que la actividad enzimática de las vesículas de membrana obtenidas de las células *Mtb* Δ *ctpF* se estimuló solo un 7 % (Figura 6-5). Estas diferencias demuestran que la membrana plasmática de *Mtb* presenta actividad Ca^{2+} -ATPasa tipo P mediada por CtpF.

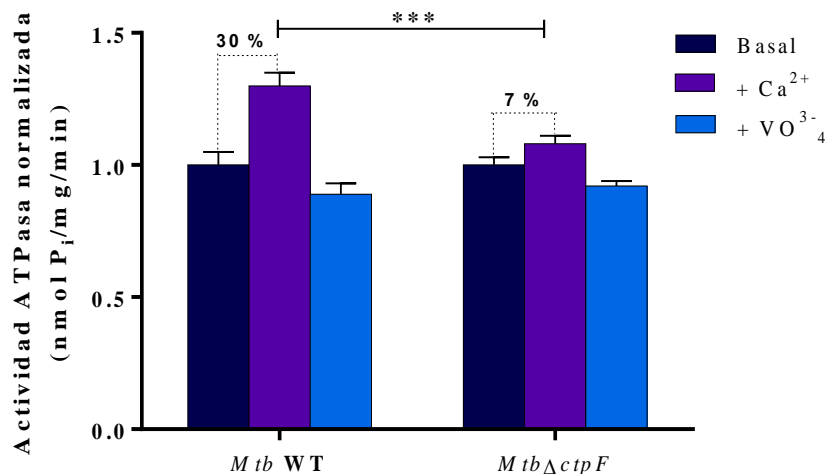


Figura 6–4. Actividad ATPasa basal y estimulada por Ca^{2+} de *Mtb* WT y *Mtb* Δ *ctpF*.

La actividad de Ca^{2+} -ATPasa se midió mediante la adición de Ca^{2+} -libre (30 μM). Los valores se comparan con la actividad obtenida en presencia de vanadato ($\text{VO}_3^- = 50 \mu\text{M}$). Los valores representan la media \pm SEM (n = 3). Las diferencias significativas observadas están identificadas por asteriscos como ***, $P < 0.001$.

Los resultados de la evaluación del efecto del CPA sobre la actividad de Ca^{2+} -ATPasa normalizada, en la membrana plasmática de *Mtb* representados en la figura 6-5, señalan que CPA inhibe significativamente la actividad Ca^{2+} -ATPasa en las células *Mtb* WT de manera concentración dependiente (desde 1.0 μM , con $\text{IC}_{50} = 7.2 \pm 0.3 \mu\text{M}$) en comparación con la actividad enzimática normalizada mostrada por las células *Mtb* Δ *ctpF*. Si bien se observa una disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa normalizada de las vesículas de membrana *Mtb* Δ *ctpF*, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medidas de actividad en presencia CPA a diferentes concentraciones con respecto al control sin compuesto.

De esta manera, los resultados presentados indican que CPA inhibe la actividad Ca^{2+} -ATPasa mediada por CtpF a concentraciones comparables a las reportadas para SERCA1a. Específicamente el valor de IC_{50} de CPA para SERCA está en el rango de 0.6 - 10.0 μM , dependiendo de las condiciones experimentales (Soler et al., 1998; Yao et al., 2011). Por lo tanto, se comprueba la relación entre las aproximaciones bioinformáticas sobre el modo de unión de CPA en el sitio de unión en CtpF y la inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de

esta proteína.

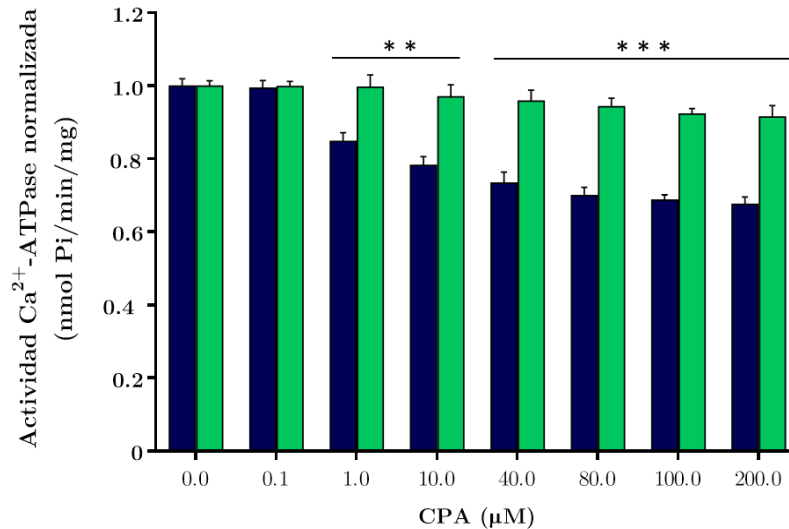


Figura 6–5. Efecto de CPA sobre la actividad de Ca²⁺-ATPasa normalizada.

Se indica el efecto de CPA (0.1, 1, 10, 40, 80, 100 y 200 µM) sobre las actividades Ca²⁺-ATPasa de *Mtb* WT y *MtbΔctpF*. Se encontraron diferencias significativas entre las mediciones de la cepa *Mtb* WT y *MtbΔctpF* desde 1.0 µM, indicadas como **, P <0.01; *** P <0.001. Los valores representan la media ± SEM (n = 3). El IC₅₀ fue calculado por regresión no lineal utilizando el paquete de software GraphPad Prism 5.04.

Estudios previos han evaluado el efecto de CPA sobre la actividad Ca²⁺-ATPasas de diferentes organismos incluidas bacterias. Estos reportes indican que CPA afecta la actividad de LMCA1, una ATPasa transportadora de Ca²⁺ de *L. monocytogenes* solamente a concentraciones muy altas (IC₅₀ = 918 ± 38 µM) (Kotšubei et al., 2013), a pesar de compartir una alta identidad (37.4 %) con SERCA1a. Lo anterior sugiere que, en este caso los residuos no conservados son relevantes para la coordinación de CPA.

En este mismo estudio, evaluaron las Ca²⁺-ATPasas de *B. cereus* (BACA1) y *L. lactis* (LLCA1), con el objetivo de encontrar diferencias en la sensibilidad a CPA en relación con la conservación de los aminoácidos del sitio de unión de CPA. Encontraron que LLCA1, con cuatro residuos variados respecto a SERCA1a, es insensible a CPA (IC₅₀ = >1000 µM), mientras que BACA1 fue sensible a CPA con un IC₅₀ = 4.0 µM, quien presenta total similitud con SERCA1a en las posiciones más relevantes de unión a CPA.

De manera similar a BACA1, CPA inhibe CtpF con un valor de IC₅₀, que es comparable con el rango de inhibición de SERCA1a. Lo que sugiere que CtpF es una Ca²⁺-ATPasa tipo P

sensible a CPA, demostrando que los aminoácidos de las tres posiciones no conservadas tienen un efecto menor en la interacción de CPA en el sitio de unión.

Estos hallazgos permiten sugerir que las diferencias entre los aminoácidos que abarcan el sitio de unión a CPA de bacterias y mamíferos, abrirían la posibilidad de diseñar derivados de CPA específicos para bacterias u otros patógenos, sin mayor efecto en las Ca²⁺-ATPasas del hospedero.

6.4.2 CPA Inhibe el crecimiento de *Mtb*

Teniendo en cuenta que CPA inhibe la actividad Ca²⁺-ATPasa de CtpF, se evalúa si esta afectación influye en la viabilidad de *Mtb*. La actividad antimicobacteriana de CPA se estimó mediante su capacidad de inhibir el crecimiento de la cepa virulenta *Mtb* H37Rv.

Los resultados demuestran que CPA inhibe el crecimiento de *Mtb* H37Rv a una CMI de 100 µg/mL (Figura 6-6 A). Adicionalmente se evaluó la capacidad micobactericida al cuantificar las UFC/mL en medio sólido 7H10 + OADC. Como se observa en la figura 6-6 B, CPA causó una inhibición del ~ 30 % de las UFCs con respecto al control 100 % de crecimiento en ausencia del compuesto.

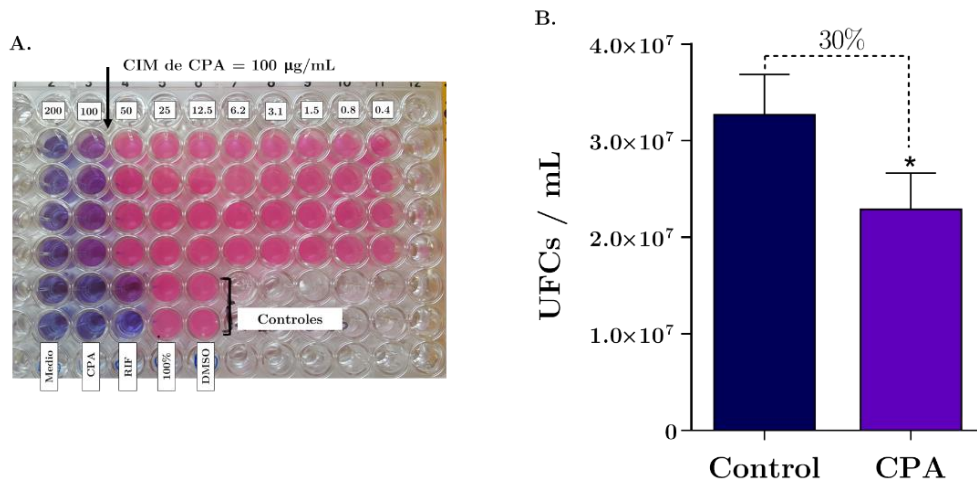


Figura 6–6. Actividad antimicobacteriana de CPA.

A. Inhibición de crecimiento de *Mtb* H37Rv por el método de resazurina. El cambio de color indica la CMI. Se determinó el valor de CMI a partir de dos experimentos independientes por cuadruplicado. **B.** Evaluación de la capacidad bactericida de CPA de acuerdo a la disminución de UFCs/mL con respecto al control 100 % de crecimiento (sin inhibidor). Los resultados representan el promedio ± SEM de dos experimentos independientes. Se observa diferencia significativa marcada con asterisco como *, $P < 0.05$.

La evaluación del efecto de CPA sobre la viabilidad bacteriana no ha sido reportada

previamente. Estudios realizados con el virus respiratorio sincitial (RSV), señalan que el tratamiento con CPA causa un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} del virus y que esta acumulación altera su replicación y transcripción (Cui et al., 2016).

En este trabajo se encuentra que existe una relación entre la actividad de CtpF una ATPasa tipo P implicada en la regulación intracelular de Ca^{2+} en *Mtb* y su viabilidad, lo que nos permite postular a CtpF como una diana molecular potencial para aplicar estrategias en la búsqueda de compuestos con actividad anti-TB.

6.4.3 Perfil de expresión génica de las ATPasas tipo P2 de *Mtb* en respuesta a CPA

Esta evaluación permitió determinar la respuesta transcripcional de los genes que codifican para las ATPasa tipo P2 de *Mtb* frente al tratamiento con CPA mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Los genes analizados fueron *ctpF*, *ctpE*, *ctpI*, *ctpH*, teniendo en cuenta que estas proteínas están clasificadas en la misma subclase P2, de transportadoras de metales alcalino/alcalinotérreos y que, además estudios previos han asociado las proteínas CtpH y CtpI al transporte de Ca^{2+} (Novoa-Aponte, 2016). De esta manera, los resultados obtenidos contribuyen a explicar el mecanismo de acción de este compuesto, específicamente para definir si CtpF es su blanco molecular.

La cepa *Mtb* WT fue enfrentada a una concentración sub-letal de CPA, específicamente a la mitad de la CMI (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 3 horas. También se evaluó el perfil de expresión con respecto al control sin tratamiento.

Para el análisis transcripcional de las ATPasas tipo P2, se utilizaron los iniciadores diseñados previamente en nuestro grupo de investigación y las curvas de eficiencia de amplificación de cada pareja de iniciadores utilizando diferentes concentraciones de ADN genómico de *Mtb* H37Ra WT. Las condiciones de reacción se estandarizaron, buscando que cada juego de iniciadores mostrara una eficiencia cercana a 2, y las curvas de melting evidenciaran un único producto, asegurando así la especificidad de los iniciadores. La tabla 6-2 muestra las condiciones de reacción de la qRT-PCR utilizadas, estableciendo temperatura de anillaje de cada juego de iniciadores y las eficiencias de reacción. Estos resultados demostraron que los iniciadores eran apropiados para el análisis mediante qRT-PCR.

Tabla 6–2. Parámetros utilizados para el análisis por qRT-PCR de los genes de las ATPasas tipo P2 y de *ctpA*.

Gen	Iniciadores	T _{anillaje} (°C)	Eficiencia	R ²	Threshold
<i>ctpF</i>	F-RT-dir y F-RT-rev	60.0	1.91	0.996	19.26
<i>ctpE</i>	E-RT-dir y E-RT-rev	58.0	1.82	0.999	8.26
<i>ctpH</i>	H-RT-dir y H-RT-rev	60.0	1.96	0.998	4.75
<i>ctpI</i>	I-RT-dir y I-RT-rev	59.3	1.85	0.958	8.74
<i>ctpA</i>	A-RT-dir y A-RT-rev	58.0	2.01	0.996	5.103
<i>sigA</i>	RTsigAdir y RTsigArev	58.0	2.12	0.989	8.120

Se relacionan los genes, las condiciones con las que se hicieron las amplificaciones y los parámetros para la cuantificación.

▪ Respuesta transcripcional de las ATPasas tipo P2 al tratamiento con CPA

Esta respuesta fue evaluada de acuerdo con los resultados de transcripción relativa de cada gen de las ATPasas tipo P2 de *Mtb* bajo la acción de CPA, utilizando como normalizador la transcripción del gen de expresión constitutiva *sigA* (factor sigma A de la ARN polimerasa). Los genes evaluados fueron *ctpF*, *ctpE*, *ctpI*, *ctpH* y del gen *ctpA* como gen no relacionado, ya que esta proteína es un transportador de metales pesados de la subclase P1B.

Los resultados fueron obtenidos utilizando el método Pfaffl (Pfaffl et al., 2004) que tiene en cuenta las eficiencias de los iniciadores usados y descarta errores asociados al comparar iniciadores con diferentes eficiencias.

La figura 6-7 muestra los resultados del análisis transcripcional de las ATPasas tipo P2 y *ctpA* normalizados en células *Mtb* H37Ra tipo silvestre (*Mtb* H37Ra WT), en respuesta a la presencia de CPA (50 µg/mL) por tres horas. Esta concentración y tiempo fue seleccionada después de pruebas similares realizados en nuestro grupo de investigación y de acuerdo con estudios previos publicados, que sostiene que esta concentración y tiempo es suficiente para permitir la acumulación del compuesto en el citosol de la micobacteria y generar una respuesta transcripcional (Waddell et al., 2004).

Como se indica en la figura, la exposición al compuesto causó una regulación positiva en la expresión del gen *ctpF* de 2.7 ± 0.6 veces en relación al control sin tratamiento.

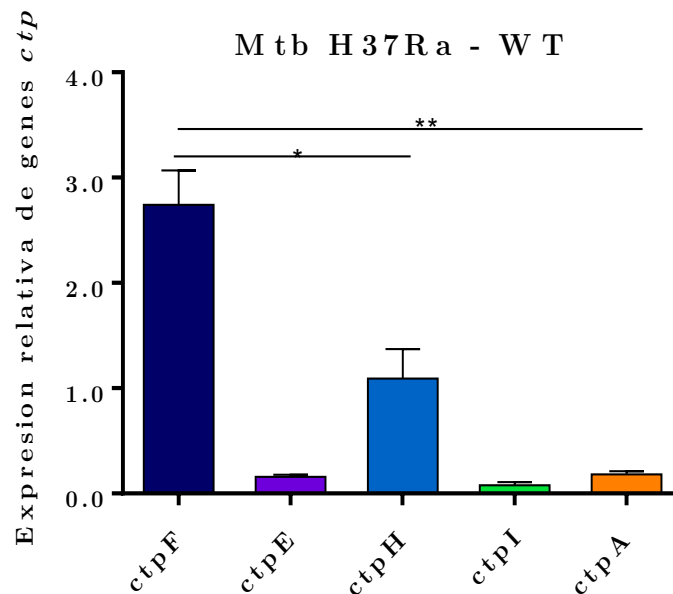


Figura 6–7. Respuesta transcripcional de las ATPasas tipo P2 de *Mtb* frente a CPA.

Se relaciona la expresión relativa de los genes: *CtpF*, *ctpE*, *ctpH*, *ctpI* y *ctpA* en células *Mtb* H37Ra WT, en presencia de CPA 50 µg/mL, usando como normalizador *sigA*. Los datos se grafican como promedio ± DE (n = 3). Las diferencias significativas (*p<0.05 y **p<0.01) indican el resultado de una prueba de comparación t student.

A diferencia de *ctpF*, los genes *ctpE* y *ctpI*, no tuvieron un incremento en su expresión y se comportaron de manera similar al gen no relacionado *ctpA*. Sin embargo, para el gen *ctpH* si se experimenta un aumento en la transcripción, aunque menor que *ctpF* (1.0 ± 0.3), lo permite suponer que esta ATPasa podría apoyar en parte la función, en el caso de inhibición de CtpF por un fármaco o una mutación. Estos resultados coinciden con los estudios previos que asocian a CtpH al transporte de Ca^{2+} (Novoa-Aponte, 2016).

Lo anterior permite sugerir que, en efecto CtpF es el blanco molecular de CPA, ya que al alcanzar el citosol de *Mtb* induce una regulación positiva de *ctpF*, sin estimular de manera importante la transcripción de los genes de otras ATPasas clase P2.

Un factor importante en el desarrollo de un nuevo fármaco, es asegurar la inhibición selectiva del blanco propuesto (Betts et al., 2003; Murima et al., 2013). En este sentido, algunos estudios demuestran que el patrón de expresión génica regulada positivamente refleja el modo de acción del fármaco (Fu, 2006).

La evaluación del perfil de expresión de genes por microarreglos y confirmación con qRT-PCR es una estrategia usada exitosamente en el proceso de diseño de anti-TB, que ha permitido la

confirmación rápida del modo de acción de estos compuestos, al analizar cambios transcripcionales causados en respuesta al tratamiento en concentraciones sub-inhedoras (De Knecht et al., 2013; Fu, 2006; Liang et al., 2011; Murima et al., 2013). También han permitido identificar la respuesta de nuevos inhibidores al comparar la expresión génica de éstos frente al de fármacos con modos de acción conocidos (Chan et al., 2002). Con un enfoque similar se ha estudiado la respuesta de *Mtb* frente al tratamiento con compuestos que inhiben la biosíntesis de ácidos micólicos como isoniazida, tiolactomicina y triclosán, logrando identificar el blanco molecular específico de cada uno de ellos. Aunque los perfiles de respuesta global de estos fármacos están relacionados entre sí, existen diferencias que distinguen el modo de acción de manera independiente (Betts et al., 2003).

Los resultados obtenidos en la evaluación del perfil de respuesta de las ATPasas tipo P2 de *Mtb*, permiten evidenciar que CPA causa una inhibición selectiva de CtpF. Esto a su vez se relaciona con el efecto encontrado frente a la actividad Ca^{2+} -ATPasa en vesículas de membrana y a la inhibición del crecimiento de las micobacterias en la evaluación en células completas. De esta manera se postula a CtpF como una diana terapéutica para la búsqueda de compuestos anti-TB basados en su estructura, a través de la estrategia combinatoria cuyos resultados se describen a continuación.

6.5 Cribado virtual e identificación de compuestos candidatos a ser evaluados *in vitro*

La estrategia desarrollada para la búsqueda de compuestos con mayor afinidad frente CtpF de *Mtb*, comprende un cribado virtual basado en el modelo farmacofórico construido a partir del complejo CtpF-CPA obtenido por acoplamiento molecular y cálculos de mecánica molecular MMGB-SA.

El acoplamiento molecular de CtpF-CPA descrito en la sección 6.2 fue usado para construir un modelo de farmacóforo derivado de las principales interacciones identificadas entre CPA y los residuos del sitio de unión de CtpF.

La interface *online* ZINCPharmer empleada para la definición del modelo, extrae automáticamente un grupo de características farmacofóricas desde la estructura molecular. Cada característica consiste en el tipo, que puede ser, donador o aceptor de enlace de hidrógeno, ion positivo o negativo y grupos aromáticos, una posición y un radio (Koes and Camacho, 2012). El siguiente paso es identificar y seleccionar de estas características las que fueron consideradas de acuerdo con la probabilidad de CPA de formar buenas interacciones

con la proteína.

El modelo farmacofórico final se describe en la figura 6-8 B y estuvo conformado por dos donantes de enlace de hidrógeno (D1 y D2), dos aceptores de enlace de hidrógeno (A1 y A2) y un grupo hidrofóbico (H1).

Usando este modelo, se realizó un cribado virtual basado en farmacóforo (PBVS) con la interfaz en línea ZINCPharmer (<http://zincpharmer.csb.pitt.edu>) y la base de datos comercial ZINC con 22,723.923 compuestos.

El PBVS permitió identificar 362 candidatos, los que fueron sometidos a un segundo cribado virtual basado por acoplamiento molecular o *docking* (DBVS) usando los programas Glide SP y XP.

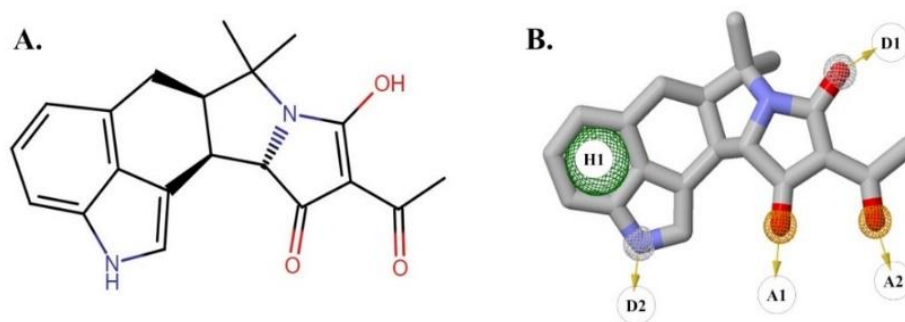


Figura 6–8. Modelo farmacofórico.

A. Características estructurales de CPA. **B.** Características farmacofóricas de CPA seleccionadas para el cribado: donantes de enlace de hidrógeno (D1 y D2), aceptores de enlace de hidrógeno (A1 y A2) y grupo hidrofóbico (H1).

Como muchos autores han discutido, las funciones de puntuación (*scoring function*) de los programas de acoplamiento molecular (*docking*) no son del todo confiables ya que no consideran adecuadamente los factores entrópicos en los cálculos de la energía de unión (Ramírez and Caballero, 2016; Warren et al., 2006). Por lo tanto, se aplicó un método de re-evaluación (re-scoring) por medio de cálculos de energía mecánica molecular combinada con solvatación continua de área de superficie generalizada Born (MM-GBSA) a los todos los 362 candidatos obtenidos después del acoplamiento Glide XP con el fin de recalculer y ordenar los resultados de DBVS. Los cálculos MM-GBSA se utilizaron para modelar los efectos del solvente mediante un modelo de solvatación continua y los términos dependientes del área de superficie. Esta es una aproximación confiable para predecir las diferencias de energía libre de unión entre los compuestos identificados con el acoplamiento (Gilson and Zhou, 2007). Esta estrategia ha sido aplicada con éxito en el estudio de las interacciones entre series de

compuestos con múltiples dianas moleculares. (Aparna et al., 2014; Sgobba et al., 2012).

Se identificaron y seleccionaron de la lista completa seis (6) compuestos candidatos para ser evaluados *in vitro*, entre los que tenían las mejores energías de unión según la evaluación por MM-GBSA. Se tuvieron en cuenta varias consideraciones para la selección de los mejores compuestos a evaluar *in vitro*, como la mejor energía libre de unión (ΔG MM-GBSA), diversidad estructural, propiedades *drug-like* y costo.

Los compuestos seleccionados, que se muestran en la figura 6-9, demostraron una mejor energía de unión en comparación con CPA según los cálculos MM-GBSA (-47.09 kcal/mol) y variaron de -49.62 a -70.13 kcal/mol. Como se observa en la figura, aunque estos compuestos son obtenidos del farmacóforo de CPA, el cribado virtual aplicado permitió obtener moléculas de estructura diversa.

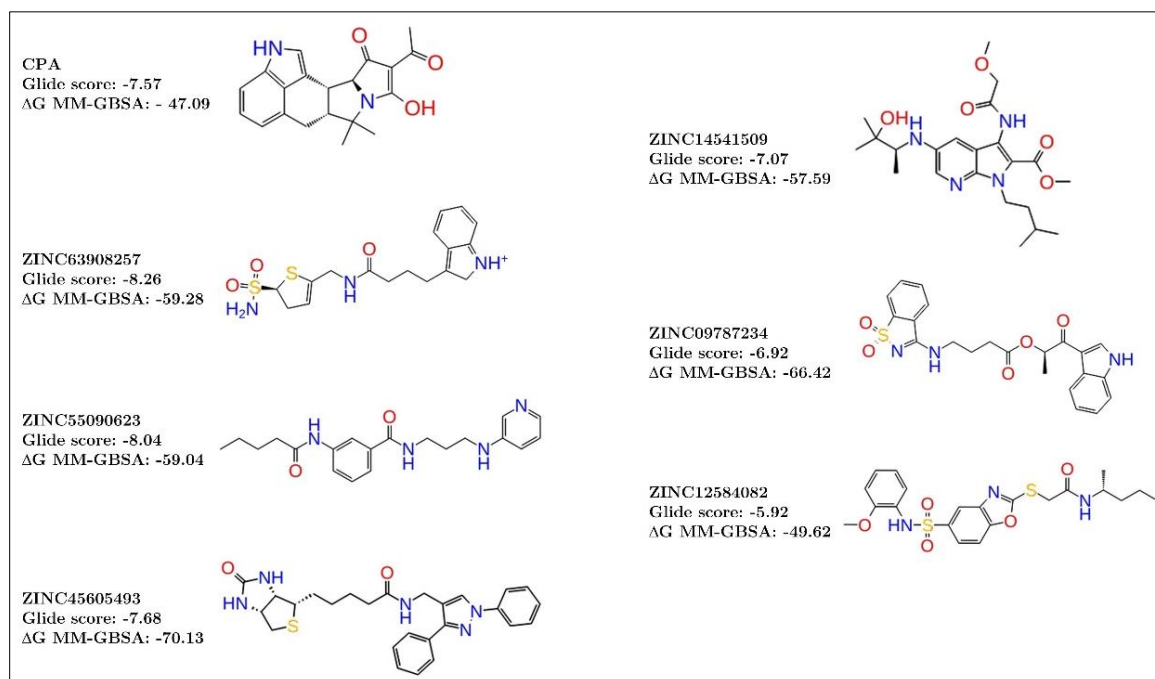


Figura 6–9. Estructura química de los seis compuestos seleccionados mediante el cribado virtual con la base de datos ZINC.

Se indica el valor de energía de unión para cada compuesto (*Glide score* y ΔG MM-GBSA: kcal/mol).

Para todos los compuestos candidatos seleccionados mediante el cribado virtual con la base de datos ZINC se calcularon los descriptores fisicoquímicos incluidos en la tabla 6-3. Estas características representan las propiedades fisicoquímicas de un fármaco, como la solubilidad y la permeabilidad e indican si los compuestos tienen propiedades óptimas para ser un potencial fármaco de uso oral. Todos los compuestos seleccionados y evaluados se encuentran

en el rango aceptable drug-like de acuerdo con las reglas de Lipinski, ya que ningún compuesto incumple más de una de ellas.

Los hallazgos teóricos presentados sugieren que los compuestos candidatos seleccionados tienen propiedades moleculares adecuadas para hacerlos biodisponibles oralmente en humanos y tienen probabilidad de convertirse en un fármaco.

Tabla 6-3. Características moleculares (*drug-like*) de CPA y los seis compuestos candidatos seleccionados.

Compuestos	Estructura	MW	LogP	Donadores enlace-H	Aceptores enlace-H	tPSA	RB
Ácido ciclopiazónico (CPA)		336.4	2.21	2	3	73	1
ZINC63908257		380.5	1.68	4	6	103	7
ZINC55090623		354.4	2.91	3	6	83	10
ZINC45605493		475.6	3.34	3	7	88	9
ZINC14541509		434.5	3.32	3	9	115	11
ZINC09787234		439.4	1.82	2	8	117	9
ZINC12584082		463.5	4.08	2	8	111	10

Propiedades *drug-like*: peso molecular (MW), logaritmo de coeficiente de partición octanol-agua (LogP), número de donadores de enlace de hidrógeno (donadores enlace-H); número de aceptores de enlace de hidrógeno (aceptores enlace-H); área de superficie polar topológica (tPSA); número de enlaces rotables (RB).

6.6 Actividad biológica de los compuestos candidatos

6.6.1 Efecto de los compuestos candidatos sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa

Los seis compuestos seleccionados desde el protocolo de cribado virtual y cálculos de energía de mecánica molecular (DBVS + MM-GBSA) fueron evaluados para determinar su capacidad para alterar la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de *Mtb* WT en comparación con la cepa mutante *Mtb* Δ *ctpF*.

Los resultados indican que los seis compuestos seleccionados evaluados causaron inhibición de la actividad de Ca²⁺-ATPasa en la membrana celular de *Mtb* WT, de acuerdo con los valores de IC₅₀ indicados en la tabla 6-4. Tres de estos compuestos ZINC63908257, ZINC55090623 y ZINC45605493, tuvieron valores de IC₅₀ mejores que CPA (IC₅₀ = 7,2 μM). Como se esperaba, al no estar presente CtpF en *Mtb*Δ*ctpF*, los compuestos seleccionados no tuvieron un efecto mayor sobre esta actividad enzimática en las vesículas de membrana de las células mutantes.

Tabla 6-4. Efecto de los compuestos seleccionados sobre la actividad enzimática.

Compuesto	Actividad enzimática IC ₅₀ (μM) ± SEM	
	<i>Mtb</i> WT	<i>Mtb</i> Δ <i>ctpF</i>
ZINC63908257	4.4 ± 0.3	100.5 ± 1.9
ZINC55090623	4.2 ± 0.2	96.9 ± 2.4
ZINC45605493	4.1 ± 0.2	76.1 ± 1.9
ZINC14541509	8.0 ± 0.6	38.4 ± 1.1
ZINC09787234	11.8 ± 0.6	101.9 ± 1.6
ZINC12584082	35.9 ± 0.5	109.4 ± 2.3

La actividad enzimática representa el efecto de los compuestos sobre la actividad Ca²⁺-ATPasa, determinada como el IC₅₀. Todas las evaluaciones se obtuvieron de tres experimentos independientes, se indican los resultados de la Media ± SEM.

En la figura 6-10, se compara el efecto de los tres compuestos con mayor actividad de acuerdo al IC₅₀: ZINC63908257, ZINC55090623 y ZINC45605493, a una concentración de 100 μM. Se observa que causaron significativa inhibición de la actividad Ca²⁺-ATPasa normalizada de las vesículas de membrana de *Mtb* WT en un 45 %, 47 % y 48 %, respectivamente, en comparación con el control sin compuesto. Esta actividad fue mayor a la estimada para CPA que fue del 25.5 % a la misma concentración. En todos los casos se encontró diferencia significativa al comparar el efecto de los compuestos entre las cepas *Mtb* WT y la mutante *Mtb*Δ*ctpF*, lo que sugiere que el efecto de los compuestos es dirigido sobre la actividad Ca²⁺-ATPasa de CtpF.

Los resultados presentados, demuestran una relación entre la afinidad de los compuestos por el sitio de unión, con un mayor efecto sobre la actividad Ca²⁺-ATPasa de CtpF. Los tres compuestos con el menor IC₅₀ también presentaron la mejor energía de unión de mecánica molecular (MM-GBSA). El éxito en hallar compuestos activos, indica que la estrategia de la hipótesis de farmacóforo fue apropiada y útil para la identificación de compuestos activos, cuya actividad puede ser optimizada.

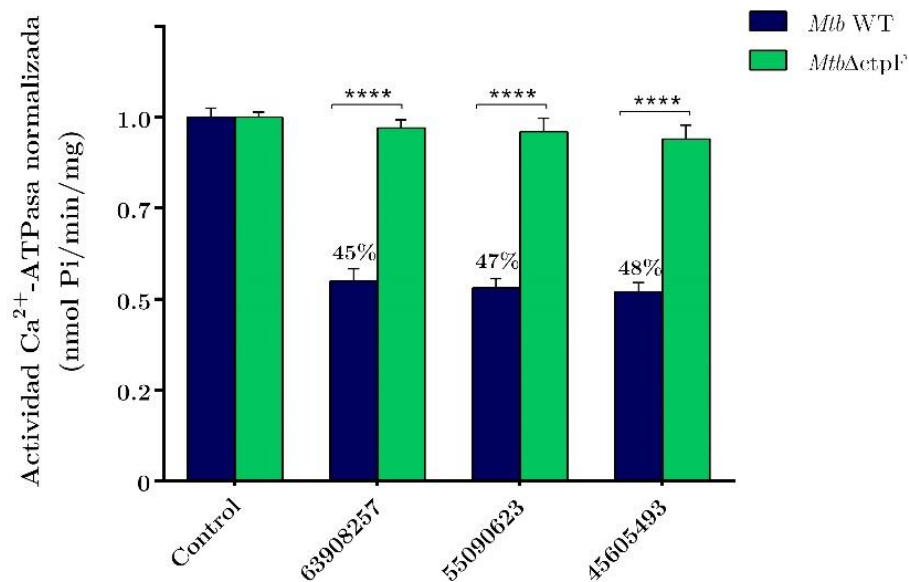


Figura 6–10. Efecto los compuestos seleccionados sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa normalizada de *Mtb* WT y *Mtb*Δ*ctpF*.

La actividad se muestra a una concentración de 100 μM . Los resultados representan la media \pm SEM ($n = 3$). Las diferencias significativas (**** $p < 0.0001$) indican el resultado de una prueba de comparación t-student entre el efecto de los compuestos para la cepa *Mtb* WT y la cepa *Mtb*Δ*ctpF*. El control representa el 100 % de actividad Ca^{2+} -ATPasa normalizada, en ausencia de compuesto.

Estudios realizados con PfATP6 de *P. falciparum*, una proteína homóloga a SERCA1a, demostraron que PfATP6 es considerablemente inhibida por CPA, lo que sugeriría en este caso, que el mecanismo molecular y el sitio de unión de CPA se conservan en ambas proteínas. (Di Marino et al., 2015). De acuerdo con estos hallazgos, podemos concluir que las proteínas Ca^{2+} -ATPasas sensibles al CPA, como CtpF, pueden ser dianas para el desarrollo de fármacos anti-TB.

6.6.2 Inhibición del crecimiento de *Mtb* por los compuestos candidatos

Los seis compuestos seleccionados mediante el cribado virtual con la base de datos ZINC fueron evaluados por su actividad antimicobacteriana contra la cepa virulenta *Mtb* H37Rv (Tabla 6-5). La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) usando resazurina como indicador de viabilidad mostró que casi todos los compuestos evaluados, excepto ZINC12584082, inhiben el crecimiento de *Mtb* H37Rv. La CMI para ZINC63908257

y ZINC14541509 fue de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta CMI fue la mitad de la obtenida para los demás compuestos evaluados incluido CPA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tabla 6-5. Actividad antimicobacteriana de los seis compuestos seleccionados.

Actividad antimicobacteriana		
Compuesto	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Inhibición del crecimiento (%)
ZINC63908257	50	64.0
ZINC55090623	100	52.9
ZINC45605493	100	29.5
ZINC14541509	50	60.7
ZINC09787234	100	57.3
ZINC12584082	> 200	N/A

La CMI es reportada según el cambio de color por el método resazurina y expresada en $\mu\text{g}/\text{mL}$. El % de inhibición del crecimiento, se estimó a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todas las evaluaciones se obtuvieron de tres experimentos independientes.

Los resultados del efecto de los compuestos sobre la viabilidad de *Mtb* H37Rv a partir del recuento de UFCs/mL, evaluado a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{dL}$, destacan la actividad de ZINC63908257 y ZINC14541509 cuya inhibición fue de 64.0 % y 60.7 %, respectivamente. Si bien las CMI de estos compuestos son superiores a los fármacos actualmente usados en el tratamiento de la TB, es de resaltar que causaron un porcentaje de inhibición del crecimiento de *Mtb* superior al 60 %, lo que puede considerarse como una actividad antimicobacteriana significativa, dado que los compuestos antimicobacterianos deben atravesar la compleja pared celular de las micobacterias para alcanzar su diana y causar con ello alteración de la viabilidad celular (Aguilar-Ayala et al., 2018; Kana et al., 2014; Zhu and Wang, 2013)

Al analizar estos resultados junto con los valores de hidrofobicidad (coeficiente de partición octanol-agua o LogP) de los compuestos evaluados, se encuentra que el compuesto ZINC63908257, que demostró la mayor inhibición del crecimiento de *Mtb* (64.0 %), tiene un bajo valor de LogP = 1.68 comparado con el menos activo ZINC12584082, el cual tiene mayor LogP = 4.08 (Tabla 6-3). Estos valores son similares a los reportados de la evaluación de los fármacos anti-TB actualmente en uso, los cuales tienen un valor de LogP bajo, lo que significa que son más bien hidrofílicos (O'Shea and Moser, 2008; Santos et al., 2017). Lo anterior sugiere que los compuestos activos podrían seguir una vía diferente a la difusión pasiva para alcanzar su blanco, que es el mecanismo que dirige el transporte de los fármacos hidrofóbicos.

En cambio, para cruzar la envoltura particular de las células micobacterianas podrían hacer uso de sistemas mediados por transportadores de membrana o *carrier* como difusión facilitada o transporte activo (Beutler, 2009; Clardy et al., 2006; O'Shea and Moser, 2008; Santos et al., 2017).

En el descubrimiento de nuevos fármacos, el relacionar la actividad en células completas con la alteración de un blanco específico es un desafío, ya que la acción encontrada en estas es el resultado de varios factores como las propiedades farmacocinéticas de los compuestos, la afinidad con el blanco molecular, la permeabilidad celular, los sistemas de eflujo y modificaciones intracelulares. La estrategia desarrollada en este trabajo de investigación, al realizar el cribado basado en el receptor (PBVS + DBVS) para la identificación de moléculas activas, tiene la ventaja de no solo identificar moléculas con propiedades fisicoquímicas adecuadas, sino también de ser activos frente a la diana seleccionada, bajo las condiciones experimentales establecidas, o sea identificar el mecanismo de acción (Murima et al., 2013).

Sobre la evaluación biológica de los seis compuestos seleccionados, se puede concluir que ZINC63908257 es el compuesto que presentó la mayor actividad inhibitoria de la actividad Ca^{2+} -ATPasa ($\text{IC}_{50} = 4.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$) y del crecimiento de *Mtb* H37Rv (64 %). Estos resultados sugieren una fuerte correlación entre la inhibición de la actividad de CtpF y la viabilidad micobacteriana.

6.6.3 Evaluación de la toxicidad de los compuestos candidatos

La actividad citotóxica y hemolítica de los seis compuestos seleccionados fue determinada *in vitro*, para estimar el potencial efecto adverso de los compuestos candidatos sobre las células eucariotas. Para poder comparar la bioseguridad de estas moléculas las evaluaciones se realizaron a la misma concentración 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo en algunos casos al doble de la CMI. Los resultados de estas evaluaciones se describen en la tabla 6-6.

El ensayo de actividad citotóxica en la línea celular MH-S de macrófagos murinos, demostró que todos los compuestos evaluados a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentaron actividad citotóxica, con valores inferiores al 40 %, con respecto al control (sin compuestos). Se resalta que los compuestos más activos contra las células micobacterianas, a saber, ZINC63908257 y ZINC14541509, mostraron las actividades citotóxicas más bajas en las células MH-S (12.9 % y 19.8 %, respectivamente). Los resultados son expresados en términos de porcentaje de citotoxicidad con respecto a las células no tratadas o células control.

Tabla 6–6. Citotoxicidad y actividad hemolítica de los seis compuestos seleccionados.

Compuesto	Evaluación de toxicidad	
	Citotoxicidad (%)	Actividad hemolítica (%)
ZINC63908257	12.9	2.0
ZINC55090623	21.4	1.2
ZINC45605493	30.0	2.4
ZINC14541509	19.8	0.6
ZINC09787234	31.6	2.1
ZINC12584082	39.5	39.5

El % de citotoxicidad y % de hemólisis fue calculado a una concentración de 100 µg/mL. Los resultados representan el promedio de dos ensayos independientes realizados por triplicado. Los resultados son expresados en términos de porcentaje de citotoxicidad con respecto a las células no tratadas o células control.

La evaluación de la actividad hemolítica reveló que ningún compuesto evaluado a 100 µg/mL causó hemólisis superior al 2,5 % y en todos los casos fue menor a la ocasionada por CPA (6,6 %) a la misma concentración. Los resultados se expresan en términos de porcentajes de hemólisis, respecto a eritrocitos no expuestos a los compuestos, o sea eritrocitos en solución salina al 0.9 % y respecto a un 100 % de hemólisis que corresponde a eritrocitos en agua destilada. Estos resultados demuestran que los compuestos tienen características de seguridad hemolítica, teniendo en cuenta que porcentajes de hemólisis inferiores al 10 %, valor máximo permisible, para que un compuesto con actividad biológica probada sea considerado inocuo (El-Elimat et al., 2015).

La estrategia implementada en este trabajo de investigación para la búsqueda de compuestos con actividad anti-TB, permitió identificar a partir de una robusta biblioteca de compuestos, seis moléculas con diversidad estructural y un perfil farmacocinético (*drug-like*) adecuado. Si bien, los compuestos evaluados presentan citotoxicidad *in vitro* mayor al 12.9 % es de destacar que su actividad antimicobacteriana es importante. A demás, la concentración a la que se determinó la citotoxicidad para los dos compuestos más activos es el doble al de la MIC.

En el proceso de diseño de fármacos, la identificación de compuestos activos es un muy buen punto de inicio para continuar con estudios de relación estructura-actividad (SAR) en una fase de optimización farmacodinámica. Estos estudios buscan relacionar modificaciones estructurales y la modulación de la actividad buscando mejorar la actividad biológica, las propiedades farmacocinéticas y el perfil de bioseguridad validado *in vivo*, de esta manera asegurar el éxito de un nuevo anti-TB para ser usado preferiblemente en combinación de

fármacos contra TB resistente.

En conclusión, se destaca la seguridad del compuesto ZINC63908257, que mostró la mayor actividad antimicobacteriana y la menor toxicidad en las células eucariotas; demostrando ser un candidato con alta actividad y un adecuado perfil farmacocinético (*drug-like*).

6.7 Los compuestos seleccionados inhiben el crecimiento intracelular de *Mtb* H37Rv en macrófagos, pero no tienen efecto sobre la fagocitosis.

En una respuesta inmune adecuada contra la TB, los macrófagos alveolares cumplen un papel central a través de mecanismos como la fagocitosis, muerte intracelular bacteriana y presentación de antígenos a los linfocitos (Orme et al., 2015; Pieters, 2008). Teniendo en cuenta lo anterior, esta aproximación permitió estimar la actividad anti-TB de los compuestos frente a *Mtb* en las condiciones enfrentadas, una vez ocurrida la infección.

La evaluación del efecto de los compuestos sobre el ensayo de fagocitosis se realizó con los dos compuestos que demostraron la mayor actividad de inhibición del crecimiento de *Mtb* H37Rv, utilizando CPA como referencia, y a la concentración CMI obtenida experimentalmente: ZINC63908257 = 50 µg/mL; ZINC14541509 = 50 µg/mL y CPA = 100 µg/mL. El compuesto ZINC63908257 a demás, demostró causar una importante inhibición de la actividad Ca²⁺-ATPasa de CtpF, por lo que su efectividad en este modelo aporta evidencias para su elección como compuesto líder.

El efecto de los compuestos sobre la capacidad fagocítica de las células MH-S pudo ser evaluada en el tiempo de incubación **D0** (día 0), es decir a una hora de incubación de las células infectadas en presencia de los compuestos.

Los resultados en la figura 6-11, indican que no se observa diferencia estadísticamente significativa en el recuento de UFCs/mL en presencia de los compuestos, con respecto al control sin estímulo (sin compuestos). Lo anterior permite evidenciar que los tres compuestos evaluados no tuvieron efecto sobre la fagocitosis de *Mtb* H37Rv por parte de los macrófagos.

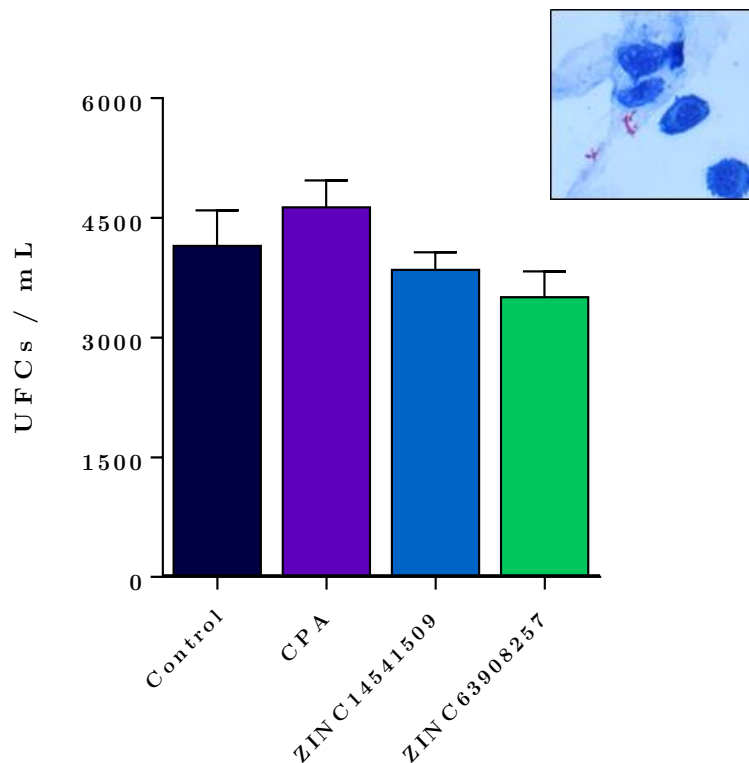


Figura 6–11. Efecto de los compuestos seleccionados sobre la fagocitosis de *Mtb* H37Rv.

Se indica el número de UFC/mL de *Mtb* H37Rv en presencia de los compuestos con respecto al control sin estímulo al tiempo D0 de infección. Los resultados corresponden a la media \pm D.E ($n = 2$). No hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias. En el recuadro superior derecho se ilustra con una fotografía de tinción de Ziehl-Neelsen la fagocitosis de *Mtb* por los macrófagos MH-S en el control.

El proceso de fagocitosis está mediado por la intervención de proteínas de superficie de *Mtb* con receptores del macrófago, como receptores tipo Toll, receptores manosa, receptores scavenger, receptores del complemento 1, 3 y 4, entre otros (Rooyackers and Stokes, 2005).

Estudios que han evaluado el efecto de compuestos sobre la respuesta inmune de la TB, han demostrado que, por ejemplo, péptidos de unión de alta actividad (HABPs) derivados de la proteína de membrana Rv3166c de *Mtb* causan disminución de la invasión bacteriana, ya que al unirse a la superficie de los macrófagos, inducen una respuesta inmune que inhibe la entrada de *Mtb* H37Rv a la célula hospedera (Ocampo et al., 2012). En otro estudio se evaluó el efecto de esteroides adrenales como el cortisol y dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre macrófagos infectados con *Mtb*, demostrando que DHEA tiene un efecto inmuno-modulador de la TB al incrementar la fagocitosis y disminuir el crecimiento intracelular bacteriano a través de un mecanismo de autofagia de los macrófagos infectados. A diferencia, el cortisol causó disminución del nivel de citoquinas implicadas en la respuesta del macrófagos contra *Mtb*,

como TNF- α , IL-6, IL-1 β y la IL-10 (Bongiovanni et al., 2015). Comparando los resultados obtenidos con estos estudios, se sugiere que los compuestos evaluados en este ensayo no tienen efecto sobre la expresión de proteínas de superficie de *Mtb*, ni de receptores de membrana de los macrófagos, por cuanto no se observa efecto sobre la fagocitosis con respecto al control, sin embargo, las determinaciones de estos marcadores quedan por establecerse.

La tasa de supervivencia de *Mtb* en el interior de los macrófagos alveolares es un sello distintivo de patogénesis persistente (TB) (Sasindran and Torrelles, 2011; Weiss and Schaible, 2015). La evaluación de los resultados de este ensayo en los días D1, D3 y D6, permitió estimar el efecto de los compuestos sobre la supervivencia y capacidad de multiplicación de *Mtb* H37Rv una vez ocurrida la fagocitosis.

Los resultados representados en la figura 6-12 demuestran que los compuestos ZINC14541509 y ZINC63908257 inhiben el crecimiento intracelular de *Mtb* H37Rv, pero a diferente potencia, de acuerdo con la disminución del número de UFC/mL con respecto al control sin estímulo (100 % crecimiento) en los diferentes tiempos de incubación.

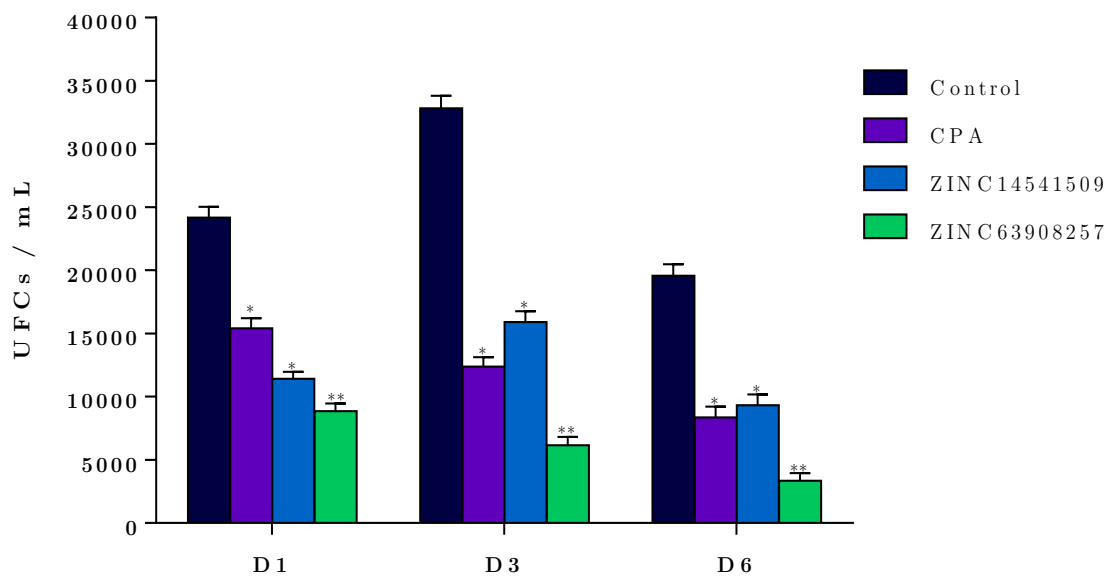


Figura 6-12. Efecto de los compuestos seleccionados sobre la viabilidad intracelular de *Mtb* H37Rv. Se indica el número de UFC/mL de *Mtb* H37Rv en presencia de los compuestos con respecto al control sin estímulo en los días D1, D3 y D6 posterior a la fagocitosis. Los valores representan la media \pm DE ($n = 3$). Diferencias significativas observadas son marcadas con asteriscos como ** $P < 0.001$ y * $P < 0.005$.

Como se observa en la Figura 6-12, en el tiempo de incubación **D1**, en el control se observó un incremento bacteriano a las 24 horas de incubación. Con respecto a este control, los cultivos en presencia de los compuestos presentaron una disminución del recuento de UFC/mL en todos los casos, donde ZINC14541509 causó una inhibición del 52.8 %, siendo mayor la actividad encontrada con ZINC63908257 con una disminución del 63.4 % del número de bacterias intracelulares.

La evaluación en el tiempo **D3** de incubación, indica que el número de bacterias en el control de fagocitosis continuó incrementando con respecto al **D0** y en este caso el efecto de los compuestos sobre la supervivencia y replicación de *Mtb* H37Rv es mayor. Como se observa en la figura, el compuesto ZINC14541509 redujo en un 55.5 % el número de UFC/mL, mientras que ZINC63908257 causó un efecto mayor al inhibir en un 81.2 %.

En el tiempo **D6** de incubación se observó igual tendencia (Figura 6-12), donde con respecto al control, los compuestos causaron disminución significativa del crecimiento y replicación de *Mtb*. En este caso ZINC14541509 causó inhibición del 52.4 % y ZINC63908257 del 82.9 %.

Si bien, CPA demostró inhibir la viabilidad intracelular de *Mtb* H37Rv de manera similar a ZINC14541509 y ZINC63908257, su actividad no fue considerada, teniendo en cuenta esta micotoxina causó una citotoxicidad del 50 % en las evaluaciones realizadas sobre de los macrófagos MH-S. Por lo tanto, la disminución del recuento bacteriano registrada sería causada por el daño celular más que por un efecto directo sobre las bacterias.

De acuerdo con las imágenes obtenidas al evaluar la integridad de las células con el microscopio de luz invertido al día seis **D6** (Figura 6-13), se observa que en presencia de CPA ocurre desprendimiento y alteración celular en comparación con el control sin compuesto (estímulo). Por otra parte, se observa que las células MH-S en presencia de ZINC63908257 y ZINC14541509, no sufren un daño celular considerable. Estudios similares en células MH-S, que busquen evaluar el efecto de CPA frente a microorganismos intracelulares en ensayos con macrófagos no han sido reportados previamente, posiblemente por la toxicidad celular que este compuesto causa. Podría ser interesante evaluar su efecto citotóxico en otras líneas celulares empleadas en estos tipos de ensayos como macrófagos derivados de monocitos humanos THP-1, macrófagos U937, células de riñón embrionario humano (HEK), macrófagos murinos RAW264.7, etc.

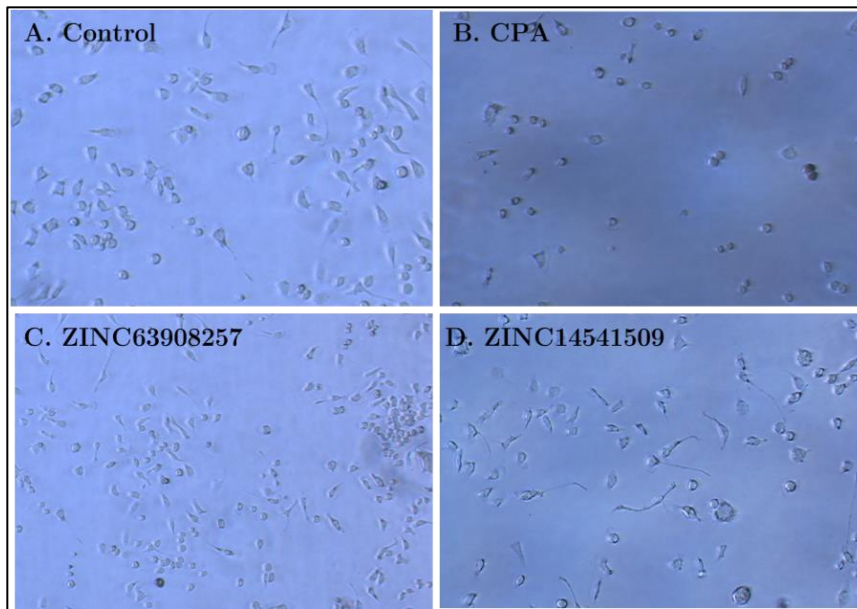


Figura 6–13. Evaluación de la morfología de las células MH-S bajo el microscopio de luz invertida. **A.** Control de fagocitosis en ausencia de compuestos. **B.** CPA. **C.** ZINC63908257. **D.** ZINC14541509.

Los resultados presentados en este ensayo de modelo de infección en macrófagos, demuestran que los dos compuestos evaluados además de causar inhibición del crecimiento de *Mtb* H37Rv, también tiene un efecto en la sobrevivencia del bacilo dentro del macrófago una vez ocurrida la fagocitosis. Adicionalmente, encontramos que no afectan la capacidad fagocítica de los macrófagos y tampoco la viabilidad de las células MH-S de manera importante.

De los dos compuestos evaluados se destaca la efectividad de ZINC63908257, que a diferencia de ZINC14541509, causó además importante inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de CtpF, lo que permite sugerir que, en este caso, el efecto en la replicación intracelular de *Mtb* puede ser producido por la acción directa sobre la diana.

En los macrófagos alveolares se ha identificado la expresión de sistemas de transporte como canales y ATPasas, que buscan asegurar la homeostasis iónica en estas células. Durante la infección micobacteriana, los macrófagos sobreexpresan la ATPasa tipo P transportadora de cobre ATP7A, incrementando la concentración de cobre en los fagosomas, como una toxina microbiana (Achard et al., 2012; Neyrolles et al., 2015; Wiemann et al., 2017). De igual manera cuentan con una ATPasa transportadora de protones vacuolar o tipo V (V-ATPasa), cuya función es acidificar el compartimiento citosólico del fagosoma y por ende asegurar la capacidad bactericida del macrófago alveolar (Bidani et al., 2000; Slomianny et al., 2006). Estudios en endosomas de macrófagos han identificado presencia de transportadores implicados en el flujo de iones como cloruro, potasio y calcio, sin embargo, la presencia y

papel de estos transportadores es tema de debate (Jentsch, 2007; Soldati and Neyrolles, 2012; Steinberg et al., 2010).

Una pregunta que surge es si CPA o los compuestos evaluados causan inhibición de las ATPasas propias del macrófago. Para evaluar que tan cercanos son estos transportadores a CtpF se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de estos transportadores, que incluyó la subunidad **a** isoforma **1** de la V-ATPasa (V_0), TP7A y otros transportadores iónicos identificados en macrófagos alveolares. En la tabla 6-7 se describen las proteínas incluidas en el estudio y el porcentaje de identidad obtenido en el alineamiento múltiple usando el programa Clustal Omega (Sievers and Higgins, 2014).

Tabla 6–7. Transportadores iónicos en macrófagos alveolares

Proteína	Gen	Identificador	% Identidad
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa tipo P	ATP1A1	P05023	25.1
ATPasa transportadora de cobre	ATP7A	Q04656	23.1
V-ATPasa subunidad a1 (V_0)	ATP6V0A1	Q93050	15.3
Canal de cloruro	CFTR	P13569	11.1
Canal de cloruro	Clic1	O00299	8.1

Transportadores iónicos descritos en macrófagos alveolares en orden descendente de acuerdo con el porcentaje de identidad en el alineamiento múltiple. El gen e identificador fue obtenido de Uniprot.

Los resultados de esta evaluación indican que el transportador más cercano a CtpF es una Na⁺/K⁺ ATPasa con un porcentaje de identidad del 25 %. Estos porcentajes de identidad relativamente bajos, sugieren que la mayoría de las secuencias de los transportadores incluidos es divergente y por lo tanto es poco probable que sean inhibidas por CPA y los compuestos evaluados. El alineamiento completo se detalla en el Anexo D.

Estudios de la patogénesis durante la infección tuberculosa indican que aun cuando *Mtb* puede bloquear proteínas importantes como calmodulina y CaMKII involucradas en reclutar hidrolasas lisosomales e inhibiendo la acidificación del fagosoma (Malik et al., 2000), se ve expuesto a una alta concentración citosólicas de Ca²⁺ por lo tanto, los mecanismos que regulan la concentración de estos cationes, por ejemplo, mediados por CtpF, deben tener un papel importante para asegurar la viabilidad dentro de los macrófagos.

Diferentes estudios demuestran que compuestos anti-TB que interfieren con proteínas de *Mtb* implicadas en importantes procesos de regulación, señalización y evasión de la respuesta inmune, afectan por ende la viabilidad intracelular micobacteriana (Beresford et al., 2009;

Paolino et al., 2018; Singh et al., 2015). Similar a estas investigaciones el presente trabajo plantea que, como consecuencia de la inhibición de la actividad de eflujo de Ca^{2+} de CtpF por ZINC63908257, la viabilidad de *Mtb* en el macrófago una vez fagocitada es disminuida. Por lo tanto, el funcionamiento de la proteína CtpF es importante para la supervivencia del bacilo dentro de la célula hospedera, siendo de este modo un importante blanco terapéutico para el desarrollo de compuestos anti-TB que apoyen el tratamiento de la TB persistente.

6.8 Análisis del sitio de unión de los compuestos con mayor actividad biológica

Mediante el estudio del sitio de unión, se evaluaron las interacciones más importantes formadas en el acoplamiento molecular de los tres compuestos que demostraron mayor actividad en la evaluación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa e inhibición del crecimiento de *Mtb*. Los compuestos ZINC63908257, ZINC55090623 y ZINC45605493, demostraron no solo mejor valor de IC_{50} que CPA, en el rango 4.1 a 4.4 μM , sino también mayores porcentajes de inhibición del crecimiento de *Mtb* H37Rv. En todos los casos, se describen los modos de unión en el acoplamiento molecular, en comparación con CPA, en el bolsillo de unión formado por los TMDs M1 - M4 de CtpF.

Dado que las áreas de superficie de estos tres compuestos son mayores que las de CPA, como se esperaba, éstos ocuparon el canal de acceso al calcio y además un sitio de unión extendido hacia una región más polar de los TMDs M1, M2 y M4. Cabe mencionar que este surco es un sitio de unión inexplorado que no hace contactos cortos con CPA. Todos los contactos cortos entre CtpF y estos compuestos analizados (CPA y los tres compuestos más activos) se resumen en la tabla 6-8.

Con respecto a ZINC63908257 (Figura 6-14), se observa que este compuesto ocupa el canal de acceso al calcio, similar a CPA y hace contactos cortos con residuos de M1 (Gln63, His66 e Ile69); M2 (Gly102, Gln105 y Glu106) y M3 (Thr242, Leu245 y Ala246). Este compuesto es ligeramente más hidrofílico que CPA, tiene un valor de LogP de 1.68, presentó inhibición de la actividad Ca^{2+} -ATPasa ($\text{IC}_{50} = 4,4 \mu\text{M}$) y causó inhibición del crecimiento de *Mtb* del 64.0%.

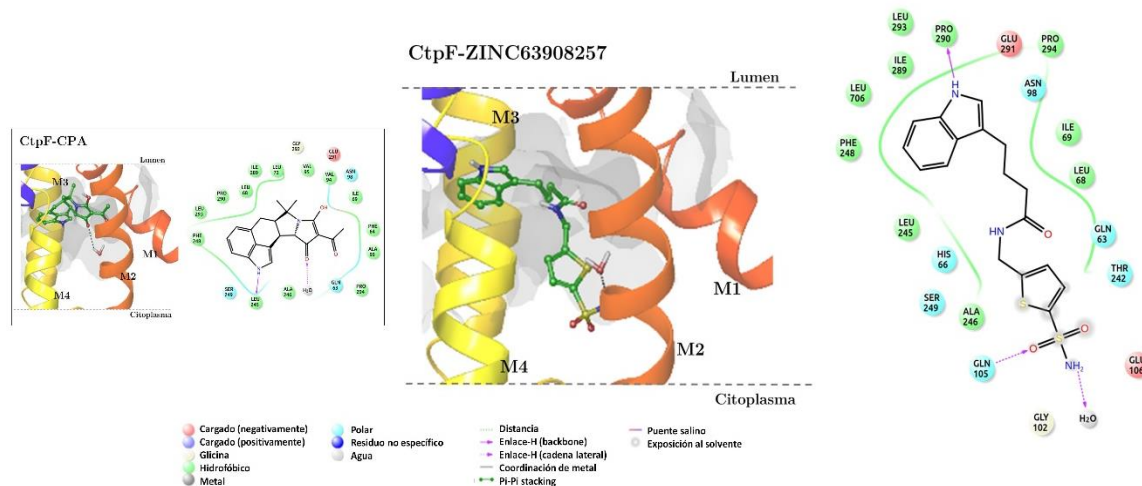


Figura 6–14. Representación 3D y 2D de los modos de unión de ZINC63908257 en CtpF.

En el recuadro pequeño a la izquierda se indica el modo de unión de CPA en CtpF. Se muestran los residuos a 4 Å del ligando y se indican los TMDs del M1 al M4.

El compuesto ZINC45605493 (Figura 6-15), posee un anillo imidazol que se orienta principalmente hacia la región citoplasmática del canal de acceso al calcio, haciendo contactos cortos con residuos hidrofílicos de los segmentos TMDs M1 (Arg62), M2 (Glu106) formando un enlace de hidrógeno con Arg317 que hace parte de un segmento corto en *random-coil* junto al M3. También forma contactos cortos con residuos de los segmentos M1 - M4 que forman el bolsillo de unión de CPA.

Este compuesto demostró el mayor efecto contra la actividad Ca^{2+} -ATPasa $\text{IC}_{50} = 4.1 \mu\text{M}$, aunque con respecto a la actividad enzimática de ZINC63908257, no hay diferencia significativa. Sin embargo, al analizar junto a la actividad antimicrobiana, presenta el porcentaje más bajo de inhibición del crecimiento de *Mtb* (29.5 %), lo que se puede relacionar con la hidrofobicidad o LogP que es de 3.34. Lo anterior sugiere que para que los compuestos tengan mayor efecto anti-TB deberían tener valores de LogP más bajos (como en el caso de ZINC63908257).

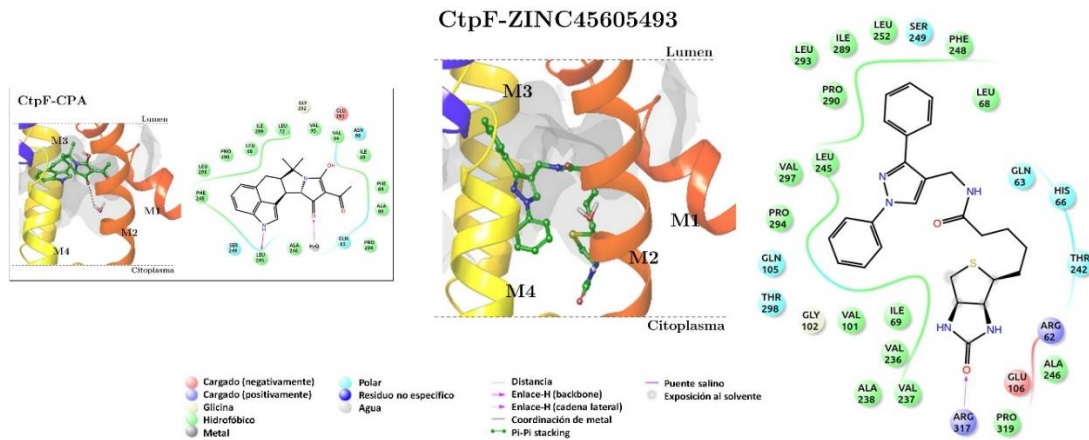


Figura 6–15. Representación 3D y 2D de los modos de unión de ZINC45605493 en CtpF. En el recuadro pequeño a la izquierda se indica el modo de unión de CPA en CtpF. Se muestran los residuos a 4 Å del ligando y se indican los TMDs del M1 al M4.

Finalmente, el compuesto ZINC55090623 (Figura 6-16) tiene un área de superficie mayor a CPA, se pliega para unirse de manera similar e interactúa principalmente con los residuos de los segmentos M1 (Gln63, His66, Leu68, Ile69), M2 (Val95, Asn98, Ala99 y Gly102), M3 (Leu245, Ala246, Phe248 y Ser249) y M4 (Ile289, Glu291, Pro290, Leu293 y Pro294). Forma un enlace de hidrógeno con Pro290, pero no hace contactos cortos hacia la región polar citoplasmática como los otros dos compuestos ya discutidos. La afinidad de este compuesto por el sitio de unión a CtpF es mayor que CPA (ΔG MM-GBSA = -8.04) muestra una IC_{50} importante de 4,2 μM , un porcentaje de inhibición del crecimiento del 52.9 % y un valor intermedio de LogP de 2.91.

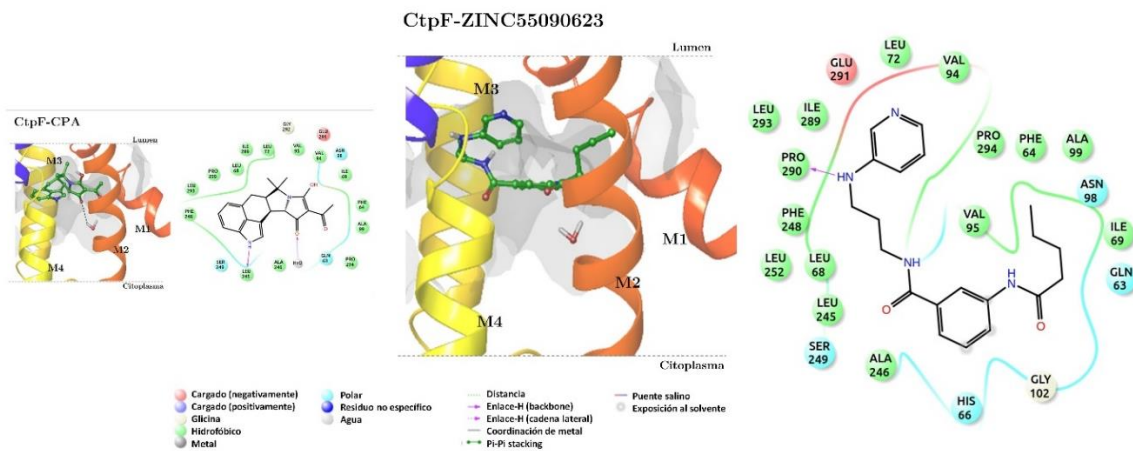


Figura 6–16. Representación 3D y 2D de los modos de unión de ZINC55090623 en CtpF. En el recuadro pequeño a la izquierda se indica el modo de unión de CPA en CtpF. Se muestran los residuos a 4 Å del ligando y se indican los TMDs del M1 al M4.

Con el propósito de calcular cuantitativamente la similitud del modo de unión de los tres compuestos más activos (ZINC63908257, ZINC55090623 y ZINC45605493) y CPA como referencia, se determinaron *fingerprints* de interacción ligando-proteína (en inglés: PLIF). Estos *fingerprints* buscan codificar los contactos 3D proteína-ligando en cadenas de bits derivadas del número de residuos/átomos en la cavidad de unión de la proteína. Cada bit denota la presencia (1) o ausencia (0) de una interacción particular: enlace de hidrógeno, contacto hidrofóbico o de van der Waals. La similitud de los modos de unión mediante estos *fingerprints* se determinó mediante el coeficiente de Tanimoto.

Como se indica en la tabla 6-8, ZINC63908257 muestra el modo de unión más similar al CPA, con un 88,2 % de similitud (coeficiente de Tanimoto = 0.88). Este compuesto comparte residuos similares que componen el sitio de unión de CPA. Por el contrario, ZINC45605493, con el mayor valor IC₅₀, tiene la similitud más baja, con 0.33 o 33.3 %. Esto puede explicarse por las interacciones con los residuos ubicados hacia la región citoplasmática del canal de acceso al calcio.

Tabla 6–8. Aminoácidos del bolsillo de unión (TMDS M1 - M4) para CPA y los compuestos más activos.

Compuesto	Aminoácidos a 4Å desde el ligando	Similitud de Tanimoto
CPA	M1 (Gln63, Leu 68, Ile69, Leu72); M2 (Val95, Asn98, Ala99, Gly102); M3 (Leu245, Phe248, Ser 249); M4 (Ile289, Pro290, Leu293, Pro294)	1.00
ZINC63908257	M1 (Gln63, Hys66, Leu68, Ile69); M2 (Asn98, Ala99, Gly102, Gln105, Glu106); M3 (Thr242, Leu245, Ala246, Phe248, Ser 249); M4 (Ile289, Pro290, Glu291, Leu293, Pro294)	0.88
ZINC55090623	M1 (Gln63, Hys66, Leu68, Ile69, Leu72); M2 (Val95, Asn98, Ala99, Gly102); M3 (Leu245, Ala246, Phe248, Ser 249); M4 (Ile289, Pro290, Glu291, Leu293, Pro294)	0.38
ZINC45605493	M1 (Gln63, Hys66, Leu68, Ile69); M2 (Ala99, Val101, Gly102, Gln105, Glu106); M3 (Thr242, Leu245, Ala246, Phe248, Ser 249, Leu252); M4 (Ile289, Pro290, Pro294, Val297)	0.33

Todos los residuos se muestran a 4 Å desde el ligando. Se indica el resultado de las similitudes mediante el cociente de Tanimoto.

Como los resultados discutidos previamente, CPA se une a CtpF en el bolsillo y con un modo de unión muy similar a SERCA1a con la mayoría de los aminoácidos conservados. Ahora, con

los compuestos seleccionados por el PBSV y que tienen una importante actividad frente a la viabilidad de *Mtb* y frente a CtpF, encontramos según estas evaluaciones de acoplamiento molecular, que ocupan el mismo sitio de unión a CPA, pero se extienden a un espacio mayor, debido a que su área de superficie es mayor. Estos compuestos se desplazan hacia una región formada por un surco de unión ubicado hacia la región citoplasmática del canal de acceso al calcio, entre los TMDs M1, M2, M3 y M4. Esta nueva región o surco de unión no ha sido explorado previamente para CtpF, inclusive para SERCA1a.

Los compuestos que se extienden en este bolsillo forman interacciones más fuertes, como enlaces de hidrógeno con los residuos de estos segmentos, generando mayor afinidad de unión y por lo tanto se incrementa la bioactividad. Como se observa en la representación 2D de ZINC63908257 (Figura 6-14), se forman tres enlaces de hidrógeno con Pro290 (M4), Gln105 (M2) y con un agua del modelo. Estas interacciones favorecen la unión estable del compuesto e incrementan la afinidad, lo que se evidencia en el ΔG MM-GBSA = -59.28, siendo este el valor de mejor energía de unión entre todos los compuestos seleccionados y menor que CPA (ΔG MM-GBSA = -47.09). Las interacciones con estos residuos podrían estar mejorando la actividad biológica.

Son pocos los estudios hasta fecha sobre la evaluación de los modos de unión y bioactividad de análogos de CPA. Un estudio previamente reportó la síntesis y actividad de análogos simplificados de CPA, demostrando la importancia del motivo ácido tetrámico de CPA para la inhibición de SERCA (Yao et al., 2011). En este caso las moléculas sintetizadas al ser modelos simplificados estructurales de CPA ocupan el mismo sitio de unión y a excepción de ZINC45605493 forman interacciones cortas con la mayoría de residuos que interaccionan con el motivo de ácido tetrámico en CPA.

Los resultados presentados sugieren que sería importante explorar la región de unión en CtpF entre los TMDs M1, M2, M3 y M4 hacia el borde citoplasmático, con el objetivo de identificar inhibidores más potentes.

7. Observaciones finales y conclusiones

En este trabajo de investigación se utilizó un enfoque basado en modelado molecular para identificar con éxito nuevos inhibidores de CtpF.

Fue construido un modelo 3D por homología de CtpF una Ca^{2+} -ATPasas tipo P adecuado, el cual pudo ser empleado para el desarrollo de una estrategia de búsqueda de compuestos anti-TB basados en su estructura.

Estudios de acoplamiento molecular permitieron identificar que el modo de unión del ácido ciclopiazónico (CPA), un inhibidor conocido de la Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarcoplásmico (SERCA), es similar entre las dos proteínas y que la mayoría de los aminoácidos que coordinan las interacciones con CPA se encuentran conservados.

Se determinó por primera vez el efecto de CPA sobre CtpF encontrándose que esta proteína es una Ca^{2+} -ATPasa tipo P homóloga a SERCA1a sensible a CPA en similares concentraciones.

Se evidenció que la capacidad de CPA de inhibir la actividad Ca^{2+} -ATPasa mediada por CtpF está correlacionada con la inhibición del crecimiento de las micobacterias. El análisis de expresión de genes en respuesta a CPA, definió una respuesta positiva de *ctpF* en comparación a otras ATPasas tipo P2. Estos resultados permitieron proponer a CtpF como blanco para el diseño de compuestos anti-TB.

Empleando una estrategia combinatoria de cribado virtual basado en farmacóforo con la base de datos ZINC, acoplamiento molecular y cálculos de MM-GBSA se identificaron seis compuestos con la mejor energía libre de unión para ser evaluados *in vitro*.

El compuesto ZINC63908257 fue el candidato más activo con una CMI de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, disminución de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de 45 % ($\text{IC}_{50} = 4.4 \mu\text{M}$) e inhibición de la replicación intracelular *Mtb* H37Rv en un 81,3 % una vez ocurrida la fagocitosis por los macrófagos. Este compuesto demostró un efecto citotóxico del 12,9 % y hemólisis del 2.0 %, además de presentar propiedades farmacocinéticas adecuadas (*drug-like*).

Los resultados presentados sugieren una conexión entre la actividad Ca^{2+} -ATPasa y la supervivencia micobacteriana, demostrando que CtpF es una diana para el diseño de nuevos compuestos anti-TB.

Las diferencias puntuales en los sitios de unión a CPA entre mamíferos y bacterias fueron por primera vez explotadas en la búsqueda de compuestos basados en el motivo CPA específicos para micobacterias.

El análisis del sitio de unión de los compuestos con mayor actividad biológica permitió identificar una nueva región o surco de unión que no ha sido explorado previamente para CtpF, inclusive para SERCA1a. Esta región entre los TMDs M1, M2, M3 y M4 hacia el borde citoplasmático, podría ser de gran interés en el objetivo de identificar inhibidores más potentes.

8. Recomendaciones

Sería de muchísima utilidad evaluar si los compuestos más activos tienen efecto inmunomodulador de la TB. Específicamente si afectan el nivel de citoquinas implicadas en la respuesta del macrófago contra *Mtb*, como TNF- α , IL-6, IL-1 β y la IL-10 o si podrían desencadenar un mecanismo de autofagia de los macrófagos infectados.

Las propiedades farmacocinéticas y la toxicidad de los compuestos se debería evaluar *in vivo* utilizando modelos de ratones, teniendo en cuenta que se ha visto que los puntos de referencia de reglas de Lipinski no son en todos los casos reales.

La evaluación de la actividad antimicobacteriana del compuesto que demostró la mayor actividad biológica, ZINC63908257, en un modelo *in vivo* en ratones, permitirá comparar su efectividad con los fármacos en uso clínico, así como evaluar la toxicidad y selectividad, temas trascendentales para el desarrollo de nuevos fármacos contra la tuberculosis.

Se debería realizar simulaciones de dinámica molecular con el complejo CtpF y el compuesto más activo ZINC63908257, lo que permitiría realizar el cálculo de la energía con mayor estabilidad del ligando en unión, y además evaluar nuevas interacciones moleculares formadas durante la simulación.

Se propone la realización cambios estructurales al hit inicial ZINC63908257 de modo que se pueda optimizar la potencia, eficacia y seguridad en etapas posteriores de desarrollo.

A. Evaluación y comparación de las estructuras cristalográficas de SERCA1a-CPA disponibles en el PDB

Evaluación y matriz de comparación del valor RMSD (en Å) de las ocho estructuras cristalográficas disponibles en el PDB, así como de los residuos más importantes en la coordinación de CPA.

A.

Crystal structures of SERCA1a in complex with CPA deposited in the PDB				
PDB code	Res	Author	Ions	Other ligands
4BEW	2.5 Å	Mattie, D.	K, Mg, Mn	ACP, ACT, MGF
3FGO	2.5 Å	Lausen, M.	K, Mg, Mn	ACP, ACT, MF4
3FPB	2.55 Å		K, Mg	ATP, MF4
3FPS	3.2 Å		Mg	ADP, MG
2EAT	2.9 Å	Takahashi, M.	-	ACE, TG1
2EAU	2.8 Å		-	ACE, PTY
4YCL	3.25 Å		K, Mg	ACE
2O9J	2.65 Å	Moncoq, K.	Na, Mg	MF4
2OA0	3.4 Å		Mg	ADP

B.

	2O9J	2OA0	3FPB	3FGO	3FPS	2EAT	4YCL	2EAU
2O9J	0.00							
2OA0	3.63	0.00						
3FPB	0.20	3.63	0.00					
3FGO	0.84	3.48	0.87	0.00				
3FPS	3.74	0.15	3.69	3.93	0.00			
2EAT	3.72	0.55	3.70	3.47	0.54	0.00		
4YCL	3.68	0.50	3.73	3.66	0.48	0.52	0.00	
2EAU	3.98	0.66	4.02	4.11	0.72	0.78	0.73	0.00

C.

Glu 56 / 63		Leu 61 / 68		Asn 101 / 98		Ala 102 / 99		Phe 256 / 248		Pro 312 / 294	
	CtpF		CtpF		CtpF		CtpF		CtpF		CtpF
CtpF	0.00	CtpF	0.00	CtpF	0.00	CtpF	0.00	CtpF	0.00	CtpF	0.00
2O9J	0.88	2O9J	3.58	2O9J	4.31	2O9J	4.77	2O9J	3.60	2O9J	3.92
2OA0	2.29	2OA0	1.23	2OA0	3.24	2OA0	3.54	2OA0	3.87	2OA0	3.52
3FPB	3.57	3FPB	3.47	3FPB	4.14	3FPB	5.14	3FPB	3.57	3FPB	3.63
3FGO	0.36	3FGO	1.39	3FGO	0.65	3FGO	0.11	3FGO	1.89	3FGO	1.99
3FPS	0.69	3FPS	1.31	3FPS	2.91	3FPS	3.36	3FPS	3.77	3FPS	3.41
2EAT	2.19	2EAT	0.98	2EAT	3.63	2EAT	3.22	2EAT	4.36	2EAT	3.47
4YCL	1.44	4YCL	1.81	4YCL	3.27	4YCL	3.45	4YCL	3.63	4YCL	3.28
2EAU	3.06	2EAU	3.12	2EAU	2.92	2EAU	4.29	2EAU	3.21	2EAU	3.15

Se compararon las estructuras 3D de SERCA1a en complejo con CPA. **A.** Tabla de resumen de estructuras 3D de SERCA1a disponibles en el PDB (<https://www.rcsb.org>). **B.** Matriz de comparación de las estructuras cristalizadas de SERCA1a-CPA. **C.** Matriz de comparación de los residuos del sitio de unión de. Los menores valores de RMSD son representados en color verde.

B. Alineamiento de las secuencias 3FGO y CtpF

3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	-----MEAAHSKSTEECLAYFGVSETTGLTPDQVKRHLKYGHNELPAEEGKSLWELV MSASVSATTAHHLPAHEVLLLESDDPYHGLSDGEAAQRLERFGPNTLAVVTRASLLARI	53 60
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	I E Q F E D L V R I L L L A A C I S F V L A N F E E G E T I T A F V E P F V I L L I T A N I L V G V W Q E R N A E L R G F H L L V Y L L V A G T I T A -----G L K E F V D A A I F G V V I N I L V G F I Q E S K A E	113 110
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	N A I E A L K E Y E P E M G K V Y R A D R K S V Q R I K A R D I V P G D I V E V A V G D K V P A D I R I L S I K S T T L A A L Q G L R S M V H T H A K V V R E G H -- E H T M P S E E L V P G D L V L L A A G D K V P A D L R L V R -- Q T G L	173 166
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	R V D Q S I L T G E S V S V I K H T E P V P D P R A V N Q D K K N M L F S G T N I A A G K A L G I V A T T G V S T E I G S V N E S A L T G E S T P V H K D E V A L P E G T P - V A D R R N I A Y S G L V T A G H G A G I V V A T G A E T E L G	233 225
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	K I R D Q M A A T E Q D K T P L Q N L D E F G E Q L S K V I S L I C V A V W L I N I G H F N D P V H G G S W I R G A I E I H R L V G A A E V V A T P L T A K L A H S K F L T I A I L G L -- A A L T F G V G L L -----R R Q D A V	293 275
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	Y Y F K I A V A L A V A T P E G L P A V I T T C L A L G R R M A K K N A I V R S L P S V E T L G C T S V I C S D K T E T F T A A I A L A V G A I P E G L P T A V T I T L A I G M A R M A K R R A V R R L P A V E T L G S T T V C A D K T	353 335
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	G T L T T N Q S V C K M F I I D K V D G F C S L N E F S I T G S T Y A P E G E V L K N D K P I R S G Q F D G L V E L G T L T E N Q M T V Q S I W T P -----H G E I R A T G T G Y A P D V L L C D T D D A P V P V N A A A L R W	413 386
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	A T I C A L C N D S S L D F N E T K G V Y E K V G E A T E T A L T T L V E K M N V F N T E V R N L S K V E R A N A C N S S L L A G A C S N D A A - L V R D G T R W Q I V G D P T E G A M L V V A A K A G - F N P E R L -----	473 431
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	V I R Q L M K K E F T L E F S R D R K S M S V Y C S P A K S S R A A V G N K M F V K G A P E G V I D R C N Y V R V G T T --A T T L P Q V A A T P F S S E R Q Y M A T L -----H R D G T D H V L A K G A V E R M L D L C E T M G A D G	533 483
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	R V P M T G P V K F K T I S V T K F W G T R D T I R C I A I ---A T R D T P P K R F F M V I D D S S R F M F Y E T D A I ---R P I D R A T V I R A T E M I T -S R G L R V I A T G M G A G A G T P D D F D E N -----V T P G S	590 530
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	L I T F V G V V G M L D P P R K E V M G S T Q L C R D A G T R V I M T I G D N K G T A T A T C R R I G T F G E N F E V A D L A L T G I Q A M S D P P R A A A A S A V A A C H S A G T A V K M T I G D H A G T A T A T I E V G L L D N I E P A A G	650 590
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	R A Y T G R E F D D L P L A E Q R E A C R R A C C F A R V E P S H K S K I V E Y L Q S Y D E I T A M T I G D G V N D A P A S V L T G A E L A A L S A D Q Y P E A V D T A S V F A R V S P E Q K L R L V Q A L Q A R G H V V A M T I G D G V N D A P A	710 650
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	L K K A E I G I A M G S G - T A V A K T A S E M V L A D D N F S T I V A A V E E G R A I Y N N M K Q F I R Y L I S S N V L R Q A N I G V A M G R G G T E V A K D A A D M V L T D D D F A T I E A A V E E G R G V F D N L T K F I T W T L P T N L	769 710
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	G E V V C I F L T A A L G L P E A L I P V Q L L W N L V T D G L P A T A L G F N P P D L I M D R P P R S P K E P L I G E G L V I L A A I A V G V A L P I L P T Q I L W I N M T T A I A L G L M A F E P K E A G I M T R P R P D P Q P L L	829 770
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	S G N L F F R Y M A I G G V V G A A T V G A A A W F M Y A E D G P G V T Y H Q L T H F M Q C T E D H P H F E G L D C E T G W L V R R T L L V S T L -----L V A S A W L F A W E L D N G A G L H E A R -----	889 807
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	I F E A P E P M T M A L S V L V T I E M C N A L N S L S E N Q S L M R M P P W N I W L L G S I C L S M S L H F L I L Y -----T A A L N L F V V E A F Y L F S C R S L T R S A W R L G M F A N R W I I L G V S A Q A I A Q F A I T Y	949 859
3FGO:A PDBID CHAIN gi P-type	V D P L P M I F K L K A L D L T Q W L M V L K I S L P V I G ---L D E I L K F I A R N Y L E G L P A M N M V F D T A P I D I G V W R I F A V A T A I T I V V A T D T L L P R I R A Q P P --	994 905

Alineamiento pareado: 3FGO (994 residuos) y CtpF (905 residuos). Programa: ClustalO versión 1.2.4. Porcentaje de identidad: 35.5 %. Residuos que son parte del sitio de unión de CPA son identificados con cajas negras y las flechas indican los residuos que no están conservados en el alineamiento.

C. Alineamiento múltiple de Ca²⁺-ATPasas tipo P de algunas eucariotas y procariotas



Alineamiento múltiple: Alineamiento múltiple de Ca²⁺-ATPasas tipo P de algunas eucariotas y procariotas. Programa: ClustalO versión 1.2.4. Residuos que son parte del sitio de unión de CPA son identificados con cajas negras.

D. Alineamiento múltiple de algunos transportadores del macrófago alveolar y CtpF

sp Q93050 V-type-proton-ATPase sp P20020 AT2B1_HUMAN sp P9WPS9 CtpF sp P05023 Na/K-ATPase sp Q04656 ATP7A_HUMAN sp P13569 CFTR_HUMAN sp O00299 CLIC1_HUMAN	<pre> -----QKNENEMFSTVFSGRYIILLMGVF--SMYTGLIYNDCFKSLNIFGSSNSVRP -----LKEANHDGDF-----GITLAEALRALMELRSTDALRKIQESYGDVYGICT -----MS-ASVSATTAHH-----GLPAH-----EVLV KKDRDMDELKKEVSMDDH-----KLSLD-----ELHR HHNQMSKEEMINLHSSMFLERQILPLGLSVMNLLSFLLCV-----PVQFFGGWYFYI- THSRNNSYAVIITSTSSYYVF-YIYVGVA-----TLL-----AMGFFRGLPLVHT ----- </pre>	483 61 21 53 733 940 148
sp Q93050 V-type-proton-ATPase sp P20020 AT2B1_HUMAN sp P9WPS9 CtpF sp P05023 Na/K-ATPase sp Q04656 ATP7A_HUMAN sp P13569 CFTR_HUMAN sp O00299 CLIC1_HUMAN	<pre> MFTYNW-----TEETLRGNPVLQLNPA---LPGVFGGYPYFGIDPIWNIATNKLTFILNS -----KLKTSNEGLSGNPA-----DLERREAVFGKN-FI-----PP-KKPK-TFLQL -----LLESDPYHGLSDGEA-----AQRLERFGPN-TL-----AV-VTRASLLARI -----KYGTDLRSLGTSARA-----AEILARDGPN-AL-----TP-PPTTPEWIKF --QAYKALKHK-----TANMDVLIV-LATTIAFAY- LITVSKILHMKMLHSLVQLQAPHSTLNTLKAGGILNRFSDK-IAILDDLLP--LTIQDFIQ- ----- </pre>	534 101 60 92 760 996 148
sp Q93050 V-type-proton-ATPase sp P20020 AT2B1_HUMAN sp P9WPS9 CtpF sp P05023 Na/K-ATPase sp Q04656 ATP7A_HUMAN sp P13569 CFTR_HUMAN sp O00299 CLIC1_HUMAN	<pre> --FHKMS--ILGIIHMLFGVSLFLFNHIYFKKPLNIYFGFIP-----EIIF--- VHEALQDVTLILEIAAIV-----SLGLSFYQPPE----- LKQFHPLIVLLVA----- CFQLFGGFSLLWIGAIL-----CF- -----SIIILLVAMYE--RAKVNPIFFDTPMPLFVFIALGRWLEH- -----LLIVIGAIIV--VAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLE ----- </pre>	578 131 75 112 799 1044 148
sp Q93050 V-type-proton-ATPase sp P20020 AT2B1_HUMAN sp P9WPS9 CtpF sp P05023 Na/K-ATPase sp Q04656 ATP7A_HUMAN sp P13569 CFTR_HUMAN sp O00299 CLIC1_HUMAN	<pre> ---MTSLFGYLVILIFYKWTAY-----DAHTSENAPSLLIHFINMFLFSYPESGY --GDNALCGEV-----SVGEEEGE-----GETGWI- -----GTI-----TAG-----LKEFV----- -----LAYS-----QAATEEEP-----QNONLY----- SEGRSPIFTHLVTSKGLWTLRAFGRQPYFETLFHKALNL-----HTANWFLVYST- ----- </pre>	625 154 86 131 799 1095 148
sp Q93050 V-type-proton-ATPase sp P20020 AT2B1_HUMAN sp P9WPS9 CtpF sp P05023 Na/K-ATPase sp Q04656 ATP7A_HUMAN sp P13569 CFTR_HUMAN sp O00299 CLIC1_HUMAN	<pre> SMLYSQKGIQCFVWVALLVWPWMLLFPVLRQY----- -----EGAAILSVWCWVTA--FNDWSKEQFRGLQSRIEQEQKFTVI----R -----DAAVIFVWVINA VGF--IQESKAEAAALQGLRSMVH--THAKVV----R -----LGVVLSVWVITGFSY--YQEAKSSKIMESFKNMVP--QQALVI----R -----IAGKTSALAKLISLQA--TEATIVTLSDNI ---LRWFQMRIEMFVIFFIIVTFISILTTGEGEGRVGIILTAM--NIMSTLQW---- ----- </pre>	662 198 128 173 830 1145 148
sp Q93050 V-type-proton-ATPase sp P20020 AT2B1_HUMAN sp P9WPS9 CtpF sp P05023 Na/K-ATPase sp Q04656 ATP7A_HUMAN sp P13569 CFTR_HUMAN sp O00299 CLIC1_HUMAN	<pre> -----LRRKHLGTLNFGGIRV-----GNGPTEEDA GGQVIQIPVADITVGDIAQVKYGDLLPADGILIQ-----GNDLKIDES EGHEHTMPSEELVPGDLVLLAAGDKVPADLRLLV-----QTGLSVNES NGEKMSINAEVVGDLVEVKGDRIPADLRIS-----ANGCKVDNS LLSEEQVDVELVQRGDIKVVPGGKFPVDGRVIE-----GHSMDVES -AVNSSIDVDSLMSR-SRVRFKFIDMPTGKPTKSTKPKYKNGQLSKVMIENSHVKKDDI ----- </pre>	687 241 171 216 872 1203 148

sp Q93050 V-type-proton-ATPase	EIIQHDLSTHSEDADEPSED-----EVFDFGDTMVHQAI-HTIEYCLGCISNTASYL--	739
sp P20020 AT2B1_HUMAN	SLTGESDHHVKKSLD-----KDPLLLSGTHVMEGSGRMVVAVGVNSQTGIIFTL	290
sp P9WPS9 CtpF	ALTGESTPVHKDEV-ALPEGTPVADRRIAYSGLVTAGHGAGIVVATGAETELGELHRL	230
sp P05023 Na/K-ATPase	SLTGESEPQTRSPD-FT-NENP-LETRNIAFFSTNCVEGTARGIVVYTGDRVTMGRIATL	273
sp Q04656 ATP7A_HUMAN	LITGEAMPVAKK-----PGSTVIAGSIN-----QN-GSLICATHVGADTTLSQIVKL	919
sp P13569 CFTR_HUMAN	WPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENISFSIS--PGQRVGLLGRGTSGKSTLLSAFLRL	1260
sp 000299 CLIC1_HUMAN	-----	148
sp Q93050 V-type-proton-ATPase	-----RLWA-----	743
sp P20020 AT2B1_HUMAN	LGAGGEEEEKKDEKKKKNKKQDGAIEENRNKAKAQDGAAMEMQPLKSEEGDGDEKDKK	350
sp P9WPS9 CtpF	VGAAEVV-----	237
sp P05023 Na/K-ATPase	ASGLEGG-----	280
sp Q04656 ATP7A_HUMAN	VEEAQT-----SKAPIQQFA-----DK	936
sp P13569 CFTR_HUMAN	LNTEGEIQID-----GVSWDSITLQQNR-----KA	1285
sp 000299 CLIC1_HUMAN	-----	148
sp Q93050 V-type-proton-ATPase	-----LSLHAQL-----EVLWMTVIHIGLSVKS LAGGLV-----	774
sp P20020 AT2B1_HUMAN	KANLPKKE--KSVLQGLTKLAVIGKALLMSAITVILVLYFVIDTFWQKRPLWAE	407
sp P9WPS9 CtpF	-----ATPLTALAWFKFLTIAILGLAALTFGVGL--LRR-----	271
sp P05023 Na/K-ATPase	-----QTPIAAIEHFHIITGVAVFLGVSFILSL--ILE-----	314
sp Q04656 ATP7A_HUMAN	L-----SGYFVPFIVSIALLLVWIVIGFLNF--EIVETYFPGYNRSISR	980
sp P13569 CFTR_HUMAN	FGVIPQKVFIFSGTFRKNLDPY--EQWSQEIWKVADEVGL--RSVIEQFPQKL-----	1335
sp 000299 CLIC1_HUMAN	-----PEE-----	151
sp Q93050 V-type-proton-ATPase	-----LFFFFTAFATLTVAILTMEGLSFLHALRLHWVEFQNKFYSGTGFKFLPFSFE	828
sp P20020 AT2B1_HUMAN	CTPIYIQYFVKFFIIGVTVLVVAVPEGLP AVTISL-----AYSVKMKMKDNN	455
sp P9WPS9 CtpF	-----QDAVEFTAAIALAVGATPEGLP AVTITL-----AIGMARMAKRRA	313
sp P05023 Na/K-ATPase	-----YTWLEAVIFLIGIIVAVPEGLLTVTVCL-----TLTAKRMARKNC	356
sp Q04656 ATP7A_HUMAN	TET---IIRFAFAQASITVLCIAPCSLGA TPPTAV-----MVGTVGVAQNGI	1024
sp P13569 CFTR_HUMAN	-----DFV-----	1338
sp 000299 CLIC1_HUMAN	-----	151
sp Q93050 V-type-proton-ATPase	HIREGKFEE-----	837
sp P20020 AT2B1_HUMAN	LVRHLD-----ACETMGNATAICSDKTGTLTMNRMTVVQAYINEKHYKVPPEP	503
sp P9WPS9 CtpF	VIRRLP-----AVETLGSTTVICADKTGTLTENQMTVQSIWTPHGEIRATGTG	361
sp P05023 Na/K-ATPase	LVKNLE-----AVETLGSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMMFDNQIHEADTTE	404
sp Q04656 ATP7A_HUMAN	LKGGGEPLMAHKV-----KVVVFDKTGITHTGTPVNVQVKVLTESNRISHH-	1071
sp P13569 CFTR_HUMAN	LVDGGCVLSHGKQLMCLARSVLSKAKILLLDEPS--AHLDPVTYQIIRRT-----	1387
sp 000299 CLIC1_HUMAN	-----VDETS--AEDEGVSQRKFLDG-----	170
sp Q93050 V-type-proton-ATPase	-----	837
sp P20020 AT2B1_HUMAN	-----EAIPPNILSYLV-TGISVNCAYTSKILPPEKEGGLP-RHVGNKTECAL	549
sp P9WPS9 CtpF	YAPDVLLCOTDDAPVPVNAANAALRWSLLAGACSNDAALVRD--GTRWQIVGDPTEGAM	417
sp P05023 Na/K-ATPase	NQSGVSFDKT-----SATWLALSRIALGNRAVFQANQENLPIKRAVAGDASESAL	456
sp Q04656 ATP7A_HUMAN	-----KIL--AIVGTA-----ESNSEHPL	1088
sp P13569 CFTR_HUMAN	-----LKQAF-----	1392
sp 000299 CLIC1_HUMAN	-----NELTL-----	175

Alineamiento múltiple: Alineamiento múltiple siete (7) ATPasas tipo P reportadas en macrófagos alveolares, se incluye CtpF en la comparación. Se indica el alineamiento desde el residuo 21 al 417 de CtpF, de manera que se incluyan los residuos implicados en la interacción con CPA. Programa: ClustalO versión 1.2.4. Residuos que son parte del sitio de unión de CPA son identificados con cajas negras.

E. Producción Académica

Publicaciones incluidas en esta Tesis:

1. Revisión: *In silico* approaches and chemical space of anti-P-type ATPase compounds for discovering new antituberculous drugs. Paola Santos, Fabián López-Vallejo, Carlos-Y. Soto. Chem Biol Drug Des. **2017**; 90:175–187. DOI: 10.1111/cbdd.12950.

2. Artículo de Investigación: Identification of *Mycobacterium tuberculosis* CtpF as a target for designing new antituberculous compounds. Paola Santos, Fabián López-Vallejo, David Ramírez, Julio Caballero, Dulce Mata Espinosa, Rogelio Hernández-Pando, Carlos Y. Soto. Bioorganic & Medicinal Chemistry. **2020**; 28:115256. DOI: 10.1016/j.bmc.2019.115256.

Divulgación en eventos científicos:

1. Paola Santos, Fabián López-Vallejo and Carlos Yesid Soto. CtpF: a potential target for anti-tubercular drugs discovery. Presentación Poster en XXIV congreso de la Asociación Latinoamericana de Microbiología (ALAM), la Sociedad de Microbiología de Chile (SOMICH), la Asociación Chilena de Inmunología y la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis. Chile 2018.

2. Paola Santos, Fabián López-Vallejo and Carlos Yesid Soto. Drug design of antituberculous agents based on P-type ATPases as potential therapeutic targets. Presentación oral en Congreso Iberoamericano de Biotecnología. España, 2016

3. Paola Santos, Fabián López-Vallejo and Carlos Yesid Soto. Drug design of antituberculous agents based on P-type ATPases as potential therapeutic targets. Presentación Póster en 37th meeting of the European Society of Mycobacteriology. Italia, 2016.

4. Paola Santos, Ivan Duque, Luz Mary Salazar, Carlos Yesid Soto. Evaluation *in silico* of the CtpF structure as therapeutic target for antituberculous compounds design. Presentación oral en el III Congreso Colombiano de Biología computacional y Bioinformática. Colombia, 2015.

Referencias

- Achard, M.E.S., Stafford, S.L., Bokil, N.J., Chartres, J., Bernhardt, P. V., Schembri, M.A., Sweet, M.J., Mcewan, A.G., 2012. Copper redistribution in murine macrophages in response to Salmonella infection. *Biochem. J.* 444, 51–57. <https://doi.org/10.1042/BJ20112180>
- Aguilar-Ayala, D.A., Cnockaert, M., Vandamme, P., Palomino, J.C., Martin, A., Gonzalez-Y-Merchand, J., 2018. Antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis under in vitro lipid-rich dormancy conditions. *J. Med. Microbiol.* 67, 282–285. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000681>
- Ahmad, S., 2011. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 814943. <https://doi.org/10.1155/2011/814943>
- Almerico, A.M., Tutone, M., Lauria, A., 2012. Receptor-guided 3D-QSAR approach for the discovery of c-kit tyrosine kinase inhibitors. *J. Mol. Model.* <https://doi.org/10.1007/s00894-011-1304-0>
- Andersen, P., Doherty, T.M., 2005. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 656–662. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1211>
- Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Göhlmann, H.W.H., Neefs, J.-M., Winkler, H., Van Gestel, J., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., Williams, P., de Chaffoy, D., Huitric, E., Hoffner, S., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Lounis, N., Jarlier, V., 2005. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis., *Science (New York, N.Y.)*. <https://doi.org/10.1126/science.1106753>
- Aparna, V., Dineshkumar, K., Mohanalakshmi, N., Velmurugan, D., Hopper, W., 2014. Identification of natural compound inhibitors for multidrug efflux pumps of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa using in silico high-throughput virtual screening and in vitro validation. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101840>
- Axelsen, K.B., Palmgren, M.G., 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* 46, 84–101. <https://doi.org/10.1007/PL00006286>
- Ayala-Torres, C., Novoa-Aponte, L., Soto, C.Y., 2015. Pma1 is an alkali/alkaline earth metal cation ATPase that preferentially transports Na⁺ and K⁺ across the Mycobacterium smegmatis plasma membrane. *Microbiol. Res.* 176, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.04.004>
- Basu, J., Chattopadhyay, R., Kundu, M., Chakrabarti, P., 1992. Purification and partial characterization of a penicillin-binding protein from Mycobacterium smegmatis. *J. Bacteriol.* 174,

- 4829–4832. <https://doi.org/10.1128/jb.174.14.4829-4832.1992>
- Beresford, N.J., Mulhearn, D., Szczepankiewicz, B., Liu, G., Johnson, M.E., Fordham-Skelton, A., Abad-Zapatero, C., Cavet, J.S., Taberner, L., 2009. Inhibition of MptpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 928–936. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp031>
- Bers, D.M., Patton, C.W., Nuccitelli, R., 2010. A practical guide to the preparation of Ca²⁺-buffers. *Methods Cell Biol.* 99, 1–26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374841-6.00001-3>
- Betts, J.C., McLaren, A., Lennon, M.G., Kelly, F.M., Lukey, P.T., Blakemore, S.J., Duncan, K., 2003. Signature gene expression profiles discriminate between isoniazid-, thiolactomycin-, and triclosan-treated *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2903–2913. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2903-2913.2003>
- Beutler, J. a., 2009. Natural products as a foundation for drug discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 1–30. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0911s46>
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T.G., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T., 2014. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 42, 252–258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>
- Bidani, A., Reisner, B.S., Haque, A.K., Wen, J., Helmer, R.E., Tuazon, D.M., Heming, T.A., 2000. Bactericidal activity of alveolar macrophages is suppressed by V-ATPase inhibition. *Lung* 178, 91–104. <https://doi.org/10.1007/s004080000012>
- Bongiovanni, B., Mata-Espinosa, D., D’Attilio, L., Leon-Contreras, J.C., Marquez-Velasco, R., Bottasso, O., Hernandez-Pando, R., Bay, M.L., 2015. Effect of cortisol and/or DHEA on THP1-derived macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 95, 562–569. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.05.011>
- Botella, H., Peyron, P., Levillain, F., Poincloux, R., Poquet, Y., Brandli, I., Wang, C., Tailleux, L., Tilleul, S., Charrire, G.M., Waddell, S.J., Foti, M., Lugo-Villarino, G., Gao, Q., Maridonneau-Parini, I., Butcher, P.D., Castagnoli, P.R., Gicquel, B., De Chastellier, C., Neyrolles, O., 2011. Mycobacterial P 1-Type ATPases mediate resistance to Zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host Microbe* 10, 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.006>
- Botella, H., Stadthagen, G., Lugo-Villarino, G., de Chastellier, C., Neyrolles, O., 2012. Metallobiology of host-pathogen interactions: An intoxicating new insight. *Trends Microbiol.* 20, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.01.005>
- Bowers, K.J., Sacerdoti, F.D., Salmon, J.K., Shan, Y., Shaw, D.E., Chow, E., Xu, H., Dror, R.O., Eastwood, M.P., Gregersen, B.A., Klepeis, J.L., Kolossvary, I., Moraes, M.A., 2006. Molecular dynamics---Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters, in: *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing - SC '06*. p. 84. <https://doi.org/10.1145/1188455.1188544>

- Braga, A.A., e Lacerda, R.R., de Vasconcelos Medeiros, G.K.V., Gonçalves, G.F., de Luna Freire Pessoa, H., Cardoso, J.D., de Almeida Gadelha, C.A., da Silva, B.A., Santi-Gadelha, T., 2014. Antibacterial and Hemolytic Activity of a new Lectin Purified from the Seeds of *Sterculia Foetida* L. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 1689–1699. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1390-4>
- Bublitz, M., Morth, J.P., Nissen, P., 2012. P-type ATPases at a glance. *J. Cell Sci.* 124, 2515–2519. <https://doi.org/10.1242/jcs.102921>
- Bublitz, M., Poulsen, H., Morth, J.P., Nissen, P., 2010. In and out of the cation pumps: P-type ATPase structure revisited. *Curr. Opin. Struct. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.06.007>
- Burger, A., 2003. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Drug Discovery (Volume 1), in: Abraham, D.J. (Ed.), . USA, p. 932. <https://doi.org/0471270903, 9780471270904>
- Burns, D.A., Minton, N.P., 2011. Sporulation studies in *Clostridium difficile*. *J. Microbiol. Methods.* <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.07.017>
- Caballero, J., Alzate-Morales, J.H., Vergara-Jaque, A., 2011. Investigation of the Differences in Activity between Hydroxycycloalkyl N1 Substituted Pyrazole Derivatives As Inhibitors of B-Raf Kinase by Using Docking, Molecular Dynamics, QM/MM, and Fragment-Based De Novo Design: Study of Binding Mode of Diastereomer . *J. Chem. Inf. Model.* 51, 2920–2931. <https://doi.org/10.1021/ci200306w>
- Cambier, C.J., Falkow, S., Ramakrishnan, L., 2014. Host Evasion and Exploitation Schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 159, 1497–1509. <https://doi.org/Doi.10.1016/J.Cell.2014.11.024>
- Camirero, J.A., 2006. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis: evidence and controversies. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 10, 829–37.
- Campbell, A.K., 2015. *Intracellular Calcium*, 1st ed. John Wiley & Sons.
- Cariani, L., Thomas, L., Brito, J., Castillo, J.R., 2004. Bismuth citrate in the quantification of inorganic phosphate and its utility in the determination of membrane-bound phosphatases 324, 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.09.008>
- Caroni, P., Carafoli, E., 1981. The Ca²⁺-pumping ATPase of heart sarcolemma. Characterization, calmodulin dependence, and partial purification. *J. Biol. Chem.* 256, 3263–3270.
- Cassir, N., Rolain, J.-M., Brouqui, P., Balganesch, M., Dinesh, N., Sharma, S., Kuruppath, S., Nair, A. V., Sharma, U., Zoraghi, R., Reiner, N.E., Anishetty, S., Pulimi, M., Pennathur, G., Huitric, E., Verhasselt, P., Koul, A., Andries, K., Hoffner, S., Andersson, D.I., Haagsma, A.C., Abdillahi-Ibrahim, R., Wagner, M.J., Krab, K., Vergauwen, K., Guillemont, J., Andries, K., Lill, H., Koul, A., Bald, D., Mowbray, S., Kathiravan, M., Pandey, A., Odell, L., Goldman, R.C., Padhi, A., Sengupta, M., Sengupta, S., Roehm, K.H., Sonawane, A., du Preez, I., Loots, D.T., Tuberculosis, O., Jana, T., Dulakakhoria, S., Ley, S.D., Harino, P., Vanuga, K., Kamus, R., Carter, R., Coulter, C., Pandey, S., Feldmann, J., Ballif, M., Siba, P.M., Phuanukoonnon, S., Gagneux, S., Beck, H.-P., Barry, C.E., Badiola, K. a., Quan, D.H., Triccas, J. a., Todd, M.H., Cheng, N., Porter, M. a., Frick, L.W., Nguyen, Y., Hayden, J.D., Young, E.F., Braunstein, M.S., Hull-Ryde, E. a., Janzen,

- W.P., Pereira, L., Diogo, J., Mateus, R., Pimentel, M., Videira, M., Baugh, L., Phan, I., Begley, D.W., Clifton, M.C., Armour, B., Dranow, D.M., Taylor, B.M., Muruthi, M.M., Abendroth, J., Fairman, J.W., Fox III, D., Dieterich, S.H., Staker, B.L., Gardberg, A.S., Choi, R., Hewitt, S.N., Napuli, A.J., Myers, J., Barrett, L.K., Zhang, Y., Ferrell, M., Mundt, E., Thompkins, K., Tran, N., Lyons-Abbott, S., Abramov, A., Sekar, A., Serbzhinskiy, D., Lorimer, D., Buchko, G.W., Stacy, R., Stewart, L.J., Edwards, T.E., Van Voorhis, W.C., Myler, P.J., Khoshkholgh-Sima, B., Sardari, S., Izadi Mobarakeh, J., Ali Khavari-Nejad, R., Diagnostics, T.B., Analysis, M., A, A.G.G., Carlos, A., Lemos, M., Dias, E., Zumla, A.I., Gillespie, S.H., Hoelscher, M., Philips, P.P.J., Cole, S.T., Abubakar, I., McHugh, T.D., Schito, M., Maeurer, M., Nunn, A.J., Leibert, E., Danckers, M., Rom, W.N., Story, C., Rustomjee, R., Lockhart, S., Shea, J., Fourie, P.B., Hindle, Z., Steel, G., Hussey, G., Ginsberg, A., Brennan, M.J., Business, B.I.O., Sekhon, B.S., Poce, G., Cocozza, M., Consalvi, S., Biava, M., Donnell, P.O., Moraes, G.L., Gomes, G.C., Monteiro de Sousa, P.R., Alves, C.N., Govender, T., Kruger, H.G., Maguire, G.E.M., Lamichhane, G., Lameira, J., Wallis, R.S., Saifullah, B., Hussein, M.Z., Hussein-Al-Ali, S.H., Arulselvan, P., Fakurazi, S., Vashisht, R., Bhat, A.G., Kushwaha, S., Bhardwaj, A., Brahmachari, S.K., Rienksma, R. a., Suarez-Diez, M., Spina, L., Schaap, P.J., Martins dos Santos, V. a. P., Koul, A., Arnoult, E., Lounis, N., Guillemont, J., Andries, K., 2014. A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Tuberculosis* 14, 178–182. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00551>
- Chan, H., Babayan, V., Blyumin, E., Gandhi, C., Hak, K., Harake, D., Kumar, K., Lee, P., Li, T.T., Liu, H.Y., Lo, T.C.T., Meyer, C.J., Stanford, S., Zamora, K.S., Saier, M.H., 2010. The P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1159/000319588>
- Chan, P.F., Macarron, R., Payne, D.J., Zalacain, M., Holmes, D.J., 2002. Novel antibacterials: A genomics approach to drug discovery. *Curr. Drug Targets - Infect. Disord.* <https://doi.org/10.2174/1568005023342227>
- Chang, Y., Bruni, R., Kloss, B., Assur, Z., Kloppmann, E., Rost, B., Hendrickson, W.A., Liu, Q., 2014. Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes. *Science* (80-.). 344, 1131–1135. <https://doi.org/10.1126/science.1252043>
- Chen, J., De Raeymaecker, J., Hovgaard, J.B., Smaardijk, S., Vandecaetsbeek, I., Wuytack, F., Møller, J.V., Eggermont, J., De Maeyer, M., Christensen, S.B., Vangheluwe, P., 2017. Structure/activity relationship of thapsigargin inhibition on the purified Golgi/secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-transport ATPase (SPCA1a). *J. Biol. Chem.* 292, 6938–6951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.778431>
- Chène, P., 2002. ATPases as drug targets: learning from their structure. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 665–73. <https://doi.org/10.1038/nrd894>
- Chomczynski, P., 1987. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Chourasia, M., Sastry, G.N., 2012. The Nucleotide, Inhibitor, and Cation Binding Sites of P-type II ATPases. *Chem. Biol. Drug Des.* 79, 617–627. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01334.x>

- Clardy, J., Fischbach, M.A., Walsh, C.T., 2006. New antibiotics from bacterial natural products. *Nat. Biotechnol.* 24, 1541–1550. <https://doi.org/10.1038/nbt1266>
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V, Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544. <https://doi.org/10.1038/31159>
- Cui, R., Wang, Y., Wang, L., Li, G., Lan, K., Altmeyer, R., Zou, G., 2016. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of calcium-dependent ATPases with antiviral activity against human respiratory syncytial virus. *Antiviral Res.* 132, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.05.010>
- Curvo-Semedo, L., Teixeira, L., Caseiro-Alves, F., 2005. Tuberculosis of the chest. *Eur. J. Radiol.* 55, 158–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2005.04.014>
- Daffé, M., Draper, P., 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39, 131–203. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60016-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60016-8)
- De Knecht, G.J., Bruning, O., Ten Kate, M.T., De Jong, M., Van Belkum, A., Endtz, H.P., Breit, T.M., Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., De Steenwinkel, J.E.M., 2013. Rifampicin-induced transcriptome response in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 93, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2012.10.013>
- Dheda, K., Gumbo, T., Maartens, G., Dooley, K.E., McNerney, R., Murray, M., Furin, J., Nardell, E.A., London, L., Lessem, E., Theron, G., van Helden, P., Niemann, S., Merker, M., Dowdy, D., Van Rie, A., Siu, G.K.H., Pasipanodya, J.G., Rodrigues, C., Clark, T.G., Sirgel, F.A., Esmail, A., Lin, H.H., Atre, S.R., Schaaf, H.S., Chang, K.C., Lange, C., Nahid, P., Udwadia, Z.F., Horsburgh, C.R., Churchyard, G.J., Menzies, D., Hesselting, A.C., Nuermberger, E., McIlleron, H., Fennelly, K.P., Goemaere, E., Jaramillo, E., Low, M., Jara, C.M., Padayatchi, N., Warren, R.M., 2017. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. *Lancet Respir. Med.* [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30079-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30079-6)
- Di Marino, D., D’Annessa, I., Coletta, A., Via, A., Tramontano, A., 2015. Characterization of the differences in the cyclopiazonic acid binding mode to mammalian and *P. Falciparum* Ca²⁺ pumps: A computational study. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 83, 564–574. <https://doi.org/10.1002/prot.24734>
- Domínguez, D.C., Guragain, M., Patrauchan, M., 2015. Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. *Cell Calcium.* <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.12.006>
- Dupont, C., Viljoen, A., Thomas, S., Roquet-Banères, F., Herrmann, J.L., Pethe, K., Kremer, L., 2017. Bedaquiline inhibits the ATP synthase in mycobacterium abscessus and is effective in infected zebrafish. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, 1. <https://doi.org/10.1128/AAC.01225-17>

- Ehrt, S., Schnappinger, D., 2009. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: Defence against host stresses. *Cell. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01335.x>
- Ekins, S., Freundlich, J.S., Hobrath, J. V., Lucile White, E., Reynolds, R.C., 2014. Combining computational methods for hit to lead optimization in mycobacterium tuberculosis drug discovery. *Pharm. Res.* 31, 414–435. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1172-7>
- El-Elimat, T., Raja, H.A., Figueroa, M., Swanson, S.M., Falkinham, J.O., Lucas, D.M., Grever, M.R., Wani, M.C., Pearce, C.J., Oberlies, N.H., 2015. Sorbicillinoid analogs with cytotoxic and selective anti-*Aspergillus* activities from *Scytalidium album*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 68, 191–196. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.125>
- Espinoza-Moraga, M., Njuguna, N.M., Mugumbate, G., Caballero, J., Chibale, K., 2013. In silico comparison of antimycobacterial natural products with known antituberculosis drugs. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 649–660. <https://doi.org/10.1021/ci300467b>
- Esposito, E.X., Hopfinger, A.J., Madura, J.D., 2004. Methods for applying the quantitative structure-activity relationship paradigm. *Methods Mol. Biol.* 275, 131–214. <https://doi.org/10.1385/1-59259-802-1:131>
- Fabiato, A., 1988. Computer Programs for Calculating Total from Specified Free or Free from Specified Total Ionic Concentrations in Aqueous Solutions Containing Multiple Metals and Ligands. *Methods Enzymol.* 157, 378–417. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)57093-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)57093-3)
- Faraco, M., Li, Y., Li, S., Spelt, C., Di Sansebastiano, G. Pietro, Reale, L., Ferranti, F., Verweij, W., Koes, R., Quattrocchio, F.M., 2017. A Tonoplast P3B-ATPase Mediates Fusion of Two Types of Vacuoles in Petal Cells. *Cell Rep.* 19, 2413–2422. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.076>
- Faxén, K., Andersen, J.L., Gourdon, P., Fedosova, N., Morth, J.P., Nissen, P., Møller, J.V., 2011. Characterization of a *Listeria monocytogenes* Ca²⁺ pump: A SERCA-type ATPase with only one Ca²⁺-binding site. *J. Biol. Chem.* 286, 1609–1617. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.176784>
- Flannagan, R.S., Jaumouillé, V., Grinstein, S., 2012. The Cell Biology of Phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 7, 61–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445>
- Ford, C.B., Shah, R.R., Maeda, M.K., Gagneux, S., Murray, M.B., Cohen, T., Johnston, J.C., Gardy, J., Lipsitch, M., Fortune, S.M., 2013. Mycobacterium tuberculosis mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat. Genet.* 45, 784–90. <https://doi.org/10.1038/ng.2656>
- Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P., Shenkin, P.S., 2004. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* 47, 1739–1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>
- Friesner, R.A., Murphy, R.B., Repasky, M.P., Frye, L.L., Greenwood, J.R., Halgren, T.A., Sanschagrin, P.C., Mainz, D.T., 2006. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.*

<https://doi.org/10.1021/jm051256o>

- Fu, L.M., 2006. Exploring drug action on *Mycobacterium tuberculosis* using affymetrix oligonucleotide genechips. *Tuberculosis* 86, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2005.07.004>
- Galagan, J.E., Minch, K., Peterson, M., Lyubetskaya, A., Azizi, E., Sweet, L., Gomes, A., Rustad, T., Dolganov, G., Glotova, I., Abeel, T., Mahwinney, C., Kennedy, A.D., Allard, R., Brabant, W., Krueger, A., Jaini, S., Honda, B., Yu, W.H., Hickey, M.J., Zucker, J., Garay, C., Weiner, B., Sisk, P., Stolte, C., Winkler, J.K., Van De Peer, Y., Iazzetti, P., Camacho, D., Dreyfuss, J., Liu, Y., Dorhoi, A., Mollenkopf, H.J., Drogaris, P., Lamontagne, J., Zhou, Y., Piquenot, J., Park, S.T., Raman, S., Kaufmann, S.H.E., Mohny, R.P., Chelsky, D., Branch Moody, D., Sherman, D.R., Schoolnik, G.K., 2013. The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia. *Nature* 499, 178–183. <https://doi.org/10.1038/nature12337>
- Gandhi, N.R.N.N.R., Nunn, P., Dheda, K., Schaaf, H.S., Zignol, M., van Soolingen, D., Jensen, P., Bayona, J., 2010. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet* 375, 1830–1843. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60410-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60410-2)
- Gangola, P., Rosen, B.P., 1987. Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262, 12570–12574.
- Gangopadhyay, A., Chakraborty, H.J., Datta, A., 2019. Employing virtual screening and molecular dynamics simulations for identifying hits against the active cholera toxin. *Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2019.09.005>
- Gengenbacher, M., Kaufmann, S.H.E., 2012. *Mycobacterium tuberculosis*: Success through dormancy. *FEMS Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x>
- Gilson, M.K., Zhou, H.-X., 2007. Calculation of Protein-Ligand Binding Affinities. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36, 21–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.36.040306.132550>
- Gordon, A.H., Hart, P.D., Young, M.R., 1980. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 286, 79–80. <https://doi.org/10.1038/286079a0>
- Gorocica, P., Jiménez-Martínez, M.D.C., Garfias, Y., Sada, I., Lascurain, R., 2005. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev. del Inst. Nac. Enfermedades Respir.* 18, 142–53.
- Greenwood, J.R., Calkins, D., Sullivan, A.P., Shelley, J.C., 2010. Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9349-1>
- Gutmann, M.J., Barends, T.R.M., Mattle, D., Robert, L., Messerschmidt, M., Marvin, M., 2015. Structural studies of P-type ATPase–ligand complexes using an X-ray free-electron laser. *IUCrL-Biology Med.* 1, 409–420. <https://doi.org/10.1107/S2052252515008969>
- Hameed, H.M.A., Islam, M.M., Chhotaray, C., Wang, C., Liu, Y., Tan, Y., Li, X., Tan, S., Delorme, V., Yew, W.W., Liu, J., Zhang, T., 2018. Molecular targets related drug resistance mechanisms

- in MDR-, XDR-, and TDR-*Mycobacterium tuberculosis* strains. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00114>
- Hertzberg, R.P., Pope, A.J., 2000. High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 445–451. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00110-1)
- Hoagland, D.T., Liu, J., Lee, R.B., Lee, R.E., 2016. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.026>
- Hofman, S., Segers, M.M., Ghimire, S., Bolhuis, M.S., Sturkenboom, M.G.G., Van Soolingen, D., Alffenaar, J.W.C., 2016. Emerging drugs and alternative possibilities in the treatment of tuberculosis. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 21, 103–116. <https://doi.org/10.1517/14728214.2016.1151000>
- Horsburgh, C.R., Barry, C.E., Lange, C., 2015. Treatment of Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 373, 2149–2160. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1413919>
- Hsieh, M.-H., Ou, C.-Y., Hsieh, W.-Y., Kao, H.-F., Lee, S.-W., Wang, J.-Y., Wu, L.S.H., 2018. Functional Analysis of Genetic Variations in Surfactant Protein D in *Mycobacterial* Infection and Their Association With Tuberculosis. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01543>
- Hu, G. Bin, Rice, W.J., Dröse, S., Altendorf, K., Stokes, D.L., 2008. Three-dimensional structure of the KdpFABC complex of *Escherichia coli* by electron tomography of two-dimensional crystals. *J. Struct. Biol.* 161, 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.09.006>
- Hu, Y., Zhang, X., Shi, Y., Zhou, Y., Zhang, W., Su, X.D., Xia, B., Zhao, J., Jin, C., 2011. Structures of anabaena calcium-binding protein CebP: Insights into CA²⁺ signaling during heterocyst differentiation. *J. Biol. Chem.* 286, 12381–12388. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.201186>
- Huang, N., Shoichet, B.K., Irwin, J.J., 2006. Benchmarking sets for molecular docking. *J. Med. Chem.* 49, 6789–801. <https://doi.org/10.1021/jm0608356>
- Hughes, J.P., Rees, S., Kalindjian, S.B., Philpott, K.L., 2011. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1239–49. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., SASAMOTO, K., OHKURA, Y., UENO, K., 1996. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 1518–1520. <https://doi.org/10.1248/bpb.19.1518>
- Izumizono, Y., Arevalo, S., Koseki, Y., Kuroki, M., Aoki, S., 2011. Identification of novel potential antibiotics for tuberculosis by in silico structure-based drug screening. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 1849–1856. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.02.047>
- Jaconi, M.E.E., Lew, D.P., Carpentier, J.L., Magnusson, K.E., Sjogren, M., Stendahl, O., 1990. Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J. Cell Biol.* 110, 1555–1564. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.5.1555>

- Jain, P.P., Degani, M.S., Raju, A., Ray, M., Rajan, M.G.R.G.R., 2013. Rational drug design based synthesis of novel arylquinolines as anti-tuberculosis agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 6097–6105. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.09.027>
- Jensen, A.M., Sorensen, T.L., Olesen, C., Moller, J. V, Nissen, P., 2006. Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump. *EMBO J.* 25, 2305–2314. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601135>
- Jentsch, T.J., 2007. Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: Emerging roles of CLC chloride transporters. *J. Physiol.* 578, 633–640. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124719>
- Johansson, F., Olbe, M., Sommarin, M., Larsson, C., 1995. Brij 58, a polyoxyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sidedness. A new tool to obtain inside-out (cytoplasmic side-out) plasma membrane vesicles. *Plant J.* 7, 165–173. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.07010165.x>
- Jones, H.E., Holland, I.B., Campbell, A.K., 2002. Direct measurement of free Ca²⁺ shows different regulation of Ca²⁺ between the periplasm and the cytosol of *Escherichia coli*. *Cell Calcium* 32, 183–192. <https://doi.org/10.1016/S0143416002001537>
- Jorgensen, W.L., 2016. QikProp. Schrödinger LLC, New York.
- Kana, B.D., Karakousis, P.C., Parish, T., Dick, T., 2014. Future target-based drug discovery for tuberculosis? *Tuberculosis* 94, 551–556. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.10.003>
- Kandasamy, S., Hassan, S., Gopaldaswamy, R., Narayanan, S., 2014. Homology modelling, docking, pharmacophore and site directed mutagenesis analysis to identify the critical amino acid residue of PknI from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Graph. Model.* 52, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2014.05.011>
- Kapetanovic, I.M., 2008. Computer-aided drug discovery and development (CADD): In silico-chemico-biological approach. *Chem. Biol. Interact.* 171, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.006>
- Kaufmann, S.H.E., McMichael, A.J., 2005. Annulling a dangerous liaison: Vaccination strategies against aids and tuberculosis. *Nat. Med.* 11, S33. <https://doi.org/10.1038/nm1221>
- Kerns, E.H., Di, L., 2008. Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods, Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods. <https://doi.org/10.1016/B978-012369520-8.50012-7>
- Khalifa, R.A., Nasser, M.S., Gomaa, A.A., Osman, N.M., Salem, H.M., 2013. Resazurin Microtiter Assay Plate method for detection of susceptibility of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* to second-line anti-tuberculous drugs. *Egypt. J. Chest Dis. Tuberc.* 62, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.ejcdt.2013.05.008>
- Kier, L.B., Hall, L.H., 1993. The Generation of Molecular Structures from a Graph-Based QSAR Equation. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 12, 383–388. <https://doi.org/10.1002/qsar.19930120406>

- Knight, G.M., McQuaid, C.F., Dodd, P.J., Houben, R.M.G.J., 2019. Global burden of latent multidrug-resistant tuberculosis: trends and estimates based on mathematical modelling. *Lancet Infect. Dis.* 19, 903–912. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(19\)30307-x](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(19)30307-x)
- Koes, D.R., Camacho, C.J., 2012. ZINCPharmer: Pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Res.* 40, 409–414. <https://doi.org/10.1093/nar/gks378>
- Koseki, Y., Aoki, S., 2014. Computational medicinal chemistry for rational drug design: Identification of novel chemical structures with potential anti-tuberculosis activity. *Curr. Top. Med. Chem.* 14, 176–188. <https://doi.org/10.2174/1568026613666131113155042>
- Kotšubei, A., Gorgel, M., Morth, J.P., Nissen, P., Andersen, J.L., 2013. Probing determinants of cyclopiazonic acid sensitivity of bacterial Ca²⁺-ATPasases, in: *FEBS Journal*. pp. 5441–5449. <https://doi.org/10.1111/febs.12310>
- Krishna, S., Pulcini, S., Fatih, F., Staines, H., 2010. Artemisinins and the biological basis for the PfATP6/SERCA hypothesis. *Trends Parasitol.* 26, 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.014>
- Kühlbrandt, W., 2004. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 282–295. <https://doi.org/10.1038/nrm1354>
- Kühlbrandt, W., Zeelen, J., Dietrich, J., 2002. Structure, mechanism, and regulation of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase. *Science* (80-). 297, 1692–1696. <https://doi.org/10.1126/science.1072574>
- Kumar, A., Casey, A., Odingo, J., Kesicki, E.A., Abrahams, G., Vieth, M., Masquelin, T., Mizrahi, V., Hipkind, P.A., Sherman, D.R., Parish, T., 2013. A High-Throughput Screen against Pantothenate Synthetase (PanC) Identifies 3-Biphenyl-4-Cyanopyrrole-2-Carboxylic Acids as a New Class of Inhibitor with Activity against *Mycobacterium tuberculosis* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072786>
- Kyaw, A., Maung-U, K., Toe, T., 1985. Determination of inorganic phosphate with molybdate and Triton X-100 without reduction. *Anal. Biochem.* [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90354-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90354-9)
- Lange, C., 2015. Treatment of Tuberculosis. *new Engl. J. o f Med.* 373, 2149–60. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1413919>
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>
- Laursen, M., Bublitz, M., Moncoq, K., Olesen, C., Møller, J.V., Young, H.S., Nissen, P., Morth, J.P., 2009. Cyclopiazonic acid is complexed to a divalent metal ion when bound to the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 284, 13513–13518. <https://doi.org/10.1074/jbc.C900031200>
- Leistikow, R.L., Morton, R.A., Bartek, I.L., Frimpong, I., Wagner, K., Voskuil, M.I., 2010. The *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid

- recovery from nonrespiring dormancy. *J. Bacteriol.* 192, 1662–1670. <https://doi.org/10.1128/JB.00926-09>
- León-Torres, A., Novoa-Aponte, L., Soto, C.-Y., 2015. CtpA, a putative *Mycobacterium tuberculosis* P-type ATPase, is stimulated by copper (I) in the mycobacterial plasma membrane. *BioMetals* 28, 713–724. <https://doi.org/10.1007/s10534-015-9860-x>
- Li, J., Abel, R., Zhu, K., Cao, Y., Zhao, S., Friesner, R.A., 2011. The VSGB 2.0 model: A next generation energy model for high resolution protein structure modeling. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* <https://doi.org/10.1002/prot.23106>
- Liang, J., Zeng, F., Guo, A., Liu, L., Guo, N., Li, L., Jin, J., Wu, X., Liu, M., Zhao, D., Li, Y., Jin, Q., Yu, L., 2011. Microarray analysis of the chelerythrine-induced transcriptome of *mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Microbiol.* 62, 1200–1208. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9837-5>
- Lin, P.L., Pawar, S., Myers, A., Pegu, A., Fuhrman, C., Reinhart, T.A., Capuano, S. V., Klein, E., Flynn, J.L., 2006. Early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection in cynomolgus macaques. *Infect. Immun.* 74, 3790–3803. <https://doi.org/10.1128/IAI.00064-06>
- Lipinski, C. a., 2000. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44, 235–249. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00107-6)
- Liu, D., Chan, B.C.L., Cheng, L., Tsang, M.S.M., Zhu, J., Wong, C.W., Jiao, D., Chan, H.Y.T., Leung, P.C., Lam, C.W.K., Wong, C.K., 2018. *Sophora flavescens* protects against mycobacterial Trehalose Dimycolate-induced lung granuloma by inhibiting inflammation and infiltration of macrophages. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22286-w>
- Liu, L., Ishida, Y., Okunade, G., Shull, G.E., Paul, R.J., 2006. Role of plasma membrane Ca²⁺-ATPase in contraction-relaxation processes of the bladder: Evidence from PMCA gene-ablated mice. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 290. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00440.2005>
- Lopez-Marques, R.L., Theorin, L., Palmgren, M.G., Pomorski, T.G., 2014. P4-ATPases: Lipid flippases in cell membranes. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1363-4>
- López, M., Quitian, L.V., Calderón, M.N., Soto, C.Y., 2018. The P-type ATPase CtpG preferentially transports Cd²⁺ across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Arch. Microbiol.* 200, 483–492. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1465-z>
- Lyne, P.D., Lamb, M.L., Saeh, J.C., 2006. Accurate prediction of the relative potencies of members of a series of kinase inhibitors using molecular docking and MM-GBSA scoring. *J. Med. Chem.* 49, 4805–4808. <https://doi.org/10.1021/jm060522a>
- M. P. Weinstein, B., 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standar- Ninth Edition. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.91790>
- MacroModel, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016., 2016. MacroModel.

- Maharaj, Y., Soliman, M.E.S., 2013. Identification of novel gyrase b inhibitors as potential Anti-TB drugs: Homology modelling, hybrid virtual screening and molecular dynamics simulations. *Chem. Biol. Drug Des.* 82, 205–215. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12152>
- Malik, Z.A., Denning, G.M., Kusner, D.J., 2000. Inhibition of Ca²⁺ signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J. Exp. Med.* 191, 287–302. <https://doi.org/10.1084/jem.191.2.287>
- Malik, Z.A., Thompson, C.R., Hashimi, S., Porter, B., Iyer, S.S., Kusner, D.J., 2003. Cutting Edge: *Mycobacterium tuberculosis* Blocks Ca²⁺ Signaling and Phagosome Maturation in Human Macrophages Via Specific Inhibition of Sphingosine Kinase. *J. Immunol.* 170, 2811–2815. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.2811>
- Malkhed, V., Mustyala, K.K., Potlapally, S.R., Vuruputuri, U., 2014. Identification of novel leads applying in silico studies for *Mycobacterium* multidrug resistant (MMR) protein. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 32, 1889–906. <https://doi.org/10.1080/07391102.2013.842185>
- Martin, A., Camacho, M., Portaels, F., Palomino, J.C., 2003. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3616–3619. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3616-3619.2003>
- Maya-Hoyos, M., Rosales, C., Novoa-Aponte, L., Castillo, E., Soto, C.Y., 2019. The P-type ATPase CtpF is a plasma membrane transporter mediating calcium efflux in *Mycobacterium tuberculosis* cells. *Heliyon* 5, e02852. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02852>
- Meena, L.S., 2015. An overview to understand the role of PE-PGRS family proteins in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and their potential as new drug targets. *Biotechnol. Appl. Biochem.* <https://doi.org/10.1002/bab.1266>
- Mena-Ulecia, K., Tiznado, W., Caballero, J., 2015. Study of the differential activity of thrombin inhibitors using docking, QSAR, molecular dynamics, and MM-GBSA. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142774>
- Miotto, P., Zhang, Y., Cirillo, D.M., Yam, W.C., 2018. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. *Respirology.* <https://doi.org/10.1111/resp.13393>
- Moncoq, K., Trieber, C. a, Young, H.S., 2007. The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J. Biol. Chem.* 282, 9748–9757. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611653200>
- Mondal, S., Upamanyu, N., Sen, D., 2013. Hybrid Computational Simulation and Modeling Assisted Structural Analysis of Anti-tubercular Molecules. *Procedia Technol.* 10, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2013.12.336>
- Mulakala, C., Viswanadhan, V.N., 2013. Could MM-GBSA be accurate enough for calculation of absolute protein/ligand binding free energies? *J. Mol. Graph. Model.* 46, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2013.09.005>

- Murima, P., de Sessions, P.F., Lim, V., Naim, A.N.M., Bifani, P., Boshoff, H.I.M., Sambandamurthy, V.K., Dick, T., Hibberd, M.L., Schreiber, M., Rao, S.P.S., 2013. Exploring the Mode of Action of Bioactive Compounds by Microfluidic Transcriptional Profiling in Mycobacteria. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069191>
- Musgaard, M., Thøgersen, L., Schiøtt, B., Tajkhorshid, E., 2012. Tracing cytoplasmic Ca²⁺ ion and water access points in the Ca²⁺-ATPase. *Biophys. J.* 102, 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.12.009>
- Naik, P.K., Srivastava, M., Bajaj, P., Jain, S., Dubey, A., Ranjan, P., Kumar, R., Singh, H., 2011. The binding modes and binding affinities of artemisinin derivatives with Plasmodium falciparum Ca²⁺-ATPase (PfATP6). *J. Mol. Model.* 17, 333–357. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0726-4>
- Naqvi, A., Malasoni, R., Srivastava, A., Pandey, R.R., Dwivedi, A.K., 2014. Design, synthesis and molecular docking of substituted 3-hydrazinyl-3-oxo-propanamides as anti-tubercular agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 5181–5184. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.09.080>
- Naseem, R., Wann, K.T., Holland, I.B., Campbell, A.K., 2009. ATP Regulates Calcium Efflux and Growth in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 391, 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.05.064>
- Nazarenko, L. V., Andreev, I.M., Lyukevich, A.A., Pisareva, T. V., Los, D.A., 2003. Calcium release from *Synechocystis* cells induced by depolarization of the plasma membrane: MscL as an outward Ca²⁺ channel. *Microbiology* 149, 1147–1153. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26074-0>
- Neyrolles, O., Wolschendorf, F., Mitra, A., Niederweis, M., 2015. Mycobacteria, metals, and the macrophage. *Immunol. Rev.* 264, 249–63. <https://doi.org/10.1111/imr.12265>
- Ng, V.H., Cox, J.S., Sousa, A.O., MacMicking, J.D., McKinney, J.D., 2004. Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: Countering the phagocyte oxidative burst. *Mol. Microbiol.* 52, 1291–1302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04078.x>
- Niederweis, M., Danilchanka, O., Huff, J., Hoffmann, C., Engelhardt, H., 2010. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol.* 18, 109–16. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.005>
- Novoa-Aponte, L., 2016. Potencial de las ATPasas tipo P como dianas terapéuticas o en el diseño de mutantes atenuados de *Mycobacterium Tuberculosis*. Universidad Nacional de Colombia.
- Novoa-Aponte, L., León-Torres, A., Patiño-Ruiz, M., Cuesta-Bernal, J., Salazar, L.-M., Landsman, D., Mariño-Ramírez, L., Soto, C.-Y., 2012. In silico identification and characterization of the ion transport specificity for P-type ATPases in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *BMC Struct. Biol.* 12, 25. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-12-25>
- Novoa-Aponte, L., Soto Ospina, C.Y., 2014. Mycobacterium tuberculosis P-type ATPases: Possible Targets for Drug or Vaccine Development. *Biomed Res. Int.* 2014, 296. <https://doi.org/10.1155/2014/296986>

- Novoa Aponte, L., 2017. Potencial de las ATPasas tipo P como dianas terapéuticas o en el diseño de mutantes atenuados de *Mycobacterium tuberculosis* 202.
- O'Shea, R., Moser, H.E., 2008. Physicochemical properties of antibacterial compounds: Implications for drug discovery. *J. Med. Chem.* 51, 2871–2878. <https://doi.org/10.1021/jm700967e>
- Ocampo, M., Aristizbal-Ramirez, D., Rodriguez, D.M., Muoz, M., Curtidor, H., Vanegas, M., Patarroyo, M.A., Patarroyo, M.E., 2012. The role of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3166c protein-derived high-activity binding peptides in inhibiting invasion of human cell lines. *Protein Eng. Des. Sel.* 25, 235–242. <https://doi.org/10.1093/protein/gzs011>
- Olesen, C., Picard, M., Winther, A.M.L., Gyruup, C., Morth, J.P., Oxvig, C., Møller, J.V., Nissen, P., 2007. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature* 450, 1036–1042. <https://doi.org/10.1038/nature06418>
- OPS-OMS, 2019. Tuberculosis en las Américas 2018.
- Orme, I.M., Robinson, R.T., Cooper, A.M., 2015. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nat. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/ni.3048>
- Osborne, R., 2013. First novel anti-tuberculosis drug in 40 years. *Nat. Biotechnol.* 31, 89–91. <https://doi.org/10.1038/nbt0213-89>
- Padilla-Benavides, T., Long, J.E., Raimunda, D., Sasseti, C.M., Argüello, J.M., 2013. A novel P(1B)-type Mn²⁺-transporting ATPase is required for secreted protein metallation in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 288, 11334–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448175>
- Pai, M., Behr, M.A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C.C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., Raviglione, M., 2016. Tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
- Palmgren, M.G., Nissen, P., 2011. P-Type ATPases. *Annu. Rev. Biophys.* 40, 243–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.093008.131331>
- Palomino, J.-C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., Portaels, F., 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2720–2. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720>
- Pandit, D., So, S.-S., Sun, H., 2006. Enhancing specificity and sensitivity of pharmacophore-based virtual screening by incorporating chemical and shape features—a case study of HIV protease inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* 46, 1236–44. <https://doi.org/10.1021/ci050511a>
- Paolino, M., Brindisi, M., Vallone, A., Butini, S., Campiani, G., Nannicini, C., Giuliani, G., Anzini, M., Lamponi, S., Giorgi, G., Sbardella, D., Ferraris, D.M., Marini, S., Coletta, M., Palucci, I., Minerva, M., Delogu, G., Peponi, I., Goletti, D., Cappelli, A., Gemma, S., Brogi, S., 2018. Development of Potent Inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* Virulence Factor Zmp1 and Evaluation of Their Effect on Mycobacterial Survival inside Macrophages. *ChemMedChem* 13, 422–430. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700759>

- Parrish, N.M., Dick, J.D., Bishai, W.R., 1998. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 6, 107–112. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01216-5](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01216-5)
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
- Pieters, J., 2008. *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host Microbe.* <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.006>
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., Pantosti, A., 2015. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathog. Glob. Health.* <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>
- Prosser, G., Brandenburg, J., Reiling, N., Barry, C.E., Wilkinson, R.J., Wilkinson, K.A., 2017. The bacillary and macrophage response to hypoxia in tuberculosis and the consequences for T cell antigen recognition. *Microbes Infect.* 19, 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.10.001>
- Pulido, P.A., Novoa-Aponte, L., Villamil, N., Soto, C.Y., 2014. The DosR Dormancy Regulator of *Mycobacterium tuberculosis* Stimulates the Na(+)/K (+) and Ca (2+) ATPase Activities in Plasma Membrane Vesicles of *Mycobacteria*. *Curr. Microbiol.* 69, 604–10. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0632-6>
- Quesada-Romero, L., Mena-Ulecia, K., Tiznado, W., Caballero, J., 2014. Insights into the interactions between maleimide derivatives and GSK3 β combining molecular docking and QSAR. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102212>
- Raimunda, D., Long, J.E., Sasseti, C.M., Argüello, J.M., 2012. Role in metal homeostasis of CtpD, a Co(2+) transporting P(1B4) -ATPase of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08082.x>
- Ramírez, D., Caballero, J., 2018. Is it reliable to take the molecular docking top scoring position as the best solution without considering available structural data? *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23051038>
- Ramírez, D., Caballero, J., 2016. Is it reliable to use common molecular docking methods for comparing the binding affinities of enantiomer pairs for their protein target? *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms17040525>
- Ramírez, D., Concha, G., Arévalo, B., Prent-Peñalosa, L., Zúñiga, L., Kiper, A.K., Rinné, S., Reyes-Parada, M., Decher, N., González, W., Caballero, J., 2019. Discovery of novel TASK-3 channel blockers using a Pharmacophore-Based Virtual Screening. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4014. <https://doi.org/10.3390/ijms20164014>
- Rehman, G., Ul-Islam, M., Khattak, W.A., Lee, Y.S., 2013. Challenges in the development of drugs for the treatment of tuberculosis. *Braz. J. Infect. Dis.* 17, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.009>
- Reusch, R.N., Huang, R., Bramble, L.L., 1995. Poly-3-hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form

- voltage-activated Ca²⁺ channels in the plasma membranes of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 69, 754–766. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)79958-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)79958-1)
- Rinder, H., Mieskes, K.T., Löscher, T., 2001. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5, 339–345.
- Robert Horsburgh, C., Barry, C.E., Lange, C., 2015. Treatment of tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMra1413919>
- Rodríguez, J., Ruiz, M., Climent, A., Royo, G., 2001. In vitro activity of four fluoroquinolones against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17, 229–231. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00337-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00337-X)
- Rooyakkers, A.W.J., Stokes, R.W., 2005. Absence of complement receptor 3 results in reduced binding and ingestion of *Mycobacterium tuberculosis* but has no significant effect on the induction of reactive oxygen and nitrogen intermediates or on the survival of the bacteria in resident and interfe. *Microb. Pathog.* 39, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2005.05.001>
- Russell, D.G., Mwandumba, H.C., Rhoades, E.E., 2002. *Mycobacterium* and the coat of many lipids. *J. Cell Biol.* 158, 421–426. <https://doi.org/10.1083/jcb.200205034>
- Rustad, T.R., Harrell, M.I., Liao, R., Sherman, D.R., 2008. The enduring hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 3, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001502>
- Saffioti, N.A., de Sautu, M., Ferreira-Gomes, M.S., Rossi, R.C., Berlin, J., Rossi, J.P.F.C., Mangialavori, I.C., 2019. E2P-like states of plasma membrane Ca²⁺-ATPase characterization of vanadate and fluoride-stabilized phosphoenzyme analogues. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1861, 366–379. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.001>
- Santos, P., Gordillo, A., Osses, L., Salazar, L.M., Soto, C.Y., 2012. Effect of antimicrobial peptides on ATPase activity and proton pumping in plasma membrane vesicles obtained from mycobacteria. *Peptides* 36, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.04.018>
- Santos, P., López-Vallejo, F., Soto, C.Y., 2017. In silico approaches and chemical space of anti-P-type ATPase compounds for discovering new antituberculous drugs. *Chem. Biol. Drug Des.* <https://doi.org/10.1111/cbdd.12950>
- Sarkar, S., Sarkar, D., 2012. Potential use of nitrate reductase as a biomarker for the identification of active and dormant inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* in a THP1 infection model. *J. Biomol. Screen.* 17, 966–73. <https://doi.org/10.1177/1087057112445485>
- Sasindran, S.J., Torrelles, J.B., 2011. *Mycobacterium tuberculosis* infection and inflammation: What is beneficial for the host and for the bacterium? *Front. Microbiol.* 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00002>
- Saxena, S., Devi, P.B., Soni, V., Yogeewari, P., Sriram, D., 2014. Identification of novel inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* l-alanine dehydrogenase (MTB-AlaDH) through structure-based virtual screening. *J. Mol. Graph. Model.* 47, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2013.08.005>

- Schaaf, K., Hayley, V., Speer, A., Wolschendorf, F., Niederweis, M., Kutsch, O., Sun, J., 2016. A Macrophage Infection Model to Predict Drug Efficacy Against Mycobacterium Tuberculosis. *Assay Drug Dev. Technol.* 14, 345–354. <https://doi.org/10.1089/adt.2016.717>
- Schaaf, K., Smith, S.R., Hayley, V., Kutsch, O., Sun, J., 2017. A high-throughput compatible assay to evaluate drug efficacy against macrophage passaged Mycobacterium tuberculosis. *J. Vis. Exp.* 2017. <https://doi.org/10.3791/55453>
- Schrödinger LLC, 2014. Prime, version 3.0. New York.
- Seidler, N.W., Jona, I., Vegh, M., Martonosi, A., 1989. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 264, 17816–17823.
- Seto, S., Tsujimura, K., Horii, T., Koide, Y., 2013. Mycobacterial Survival in Alveolar Macrophages as a Result of Coronin-1a Inhibition of Autophagosome Formation, in: *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*. Elsevier Inc., pp. 161–170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405877-4.00010-X>
- Sgobba, M., Caporuscio, F., Anighoro, A., Portioli, C., Rastelli, G., 2012. Application of a post-docking procedure based on MM-PBSA and MM-GBSA on single and multiple protein conformations. *Eur. J. Med. Chem.* 58, 431–440. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.024>
- Sharma, S., Meena, L.S., 2017. Potential of Ca²⁺ in Mycobacterium tuberculosis H 37 Rv Pathogenesis and Survival. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181, 762–771. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2247-9>
- Sheridan, R.P., Venkataraghavan, R., 1987. New methods in computer-aided drug design. *Acc. Chem. Res.* 20, 322–329. <https://doi.org/10.1021/ar00141a002>
- Sievers, F., Higgins, D.G., 2014. Clustal Omega. *Curr. Protoc. Bioinforma.* <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48>
- Sikdar, R., Ganguly, U., Pal, P., Mazumder, B., Sen, P.C., 1991. Biochemical characterization of a calcium ion stimulated-ATPase from goat spermatozoa. *Mol. Cell. Biochem.* 103, 121–130. <https://doi.org/10.1007/BF00227478>
- Simithy, J., Reeve, N., Hobrath, J. V., Reynolds, R.C., Calderón, A.I., 2014. Identification of shikimate kinase inhibitors among anti-Mycobacterium tuberculosis compounds by LC-MS. *Tuberculosis* 94, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.12.004>
- Singh, N., Tiwari, S., Srivastava, K.K., Siddiqi, M.I., 2015. Identification of Novel Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis PknG Using Pharmacophore Based Virtual Screening, Docking, Molecular Dynamics Simulation, and Their Biological Evaluation. *J. Chem. Inf. Model.* 55, 1120–1129. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00150>
- Singh, R., Dwivedi, S.P., Gaharwar, U.S., Meena, R., Rajamani, P., Prasad, T., 2019. Recent updates on drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/jam.14478>

- Sippl, M.J., 1993. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 17, 355–362. <https://doi.org/10.1002/prot.340170404>
- Skou, J.C., 1998. The Identification of the Sodium-Potassium Pump (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed.* 37, 2320–2328. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980918\)37:17<2320::AID-ANIE2320>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980918)37:17<2320::AID-ANIE2320>3.0.CO;2-2)
- Sloianianny, M.C., Dupont, A., Bouanou, F., Beseme, O., Guihot, A.L., Amouyel, P., Michalski, J.C., Pinet, F., 2006. Profiling of membrane proteins from human macrophages: Comparison of two approaches. *Proteomics* 6, 2365–2375. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500546>
- Smith, I., 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 463–96. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.463>
- Soldati, T., Neyrolles, O., 2012. Mycobacteria and the Intraphagosomal Environment: Take It With a Pinch of Salt(s)! *Traffic* 13, 1042–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01358.x>
- Soler, F., Plenge-Tellechea, F., Fortea, I., Fernandez-Belda, F., 1998. Cyclopiazonic acid effect on Ca²⁺-dependent conformational states of the sarcoplasmic reticulum ATPase. Implication for the enzyme turnover. *Biochemistry* 37, 4266–4274. <https://doi.org/10.1021/bi971455c>
- Steinberg, B.E., Huynh, K.K., Brodovitch, A., Jabs, S., Stauber, T., Jentsch, T.J., Grinstein, S., 2010. A cation counterflux supports lysosomal acidification. *J. Cell Biol.* 189, 1171–1186. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911083>
- Sterling, T., Irwin, J.J., 2015. ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone. *J. Chem. Inf. Model.* 55, 2324–2337. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00559>
- Tahlan, K., Wilson, R., Kastrinsky, D.B., Arora, K., Nair, V., Fischer, E., Whitney Barnes, S., Walker, J.R., Alland, D., Barry, C.E., Boshoff, H.I., 2012. SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1797–1809. <https://doi.org/10.1128/AAC.05708-11>
- Takahashi, M., Kondou, Y., Toyoshima, C., 2007. Interdomain communication in calcium pump as revealed in the crystal structures with transmembrane inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 5800–5805. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700979104>
- The Working Group for New TB, 2019. 2019 Global New TB Drug Pipeline [WWW Document]. Stop TB Partnersh. URL <https://www.newtbdrugs.org/pipeline/clinical> (accessed 11.4.19).
- Thomas, G., 2003. Fundamentals of medicinal chemistry, Biochemistry and Molecular Biology Education. <https://doi.org/10.1002/bmb.2004.494032039997>
- Toro, J.C., Hoffner, S., Linde, C., Andersson, M., Andersson, J., Grundström, S., 2006. Enhanced susceptibility of multidrug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* to granulysin peptides correlates with a reduced fitness phenotype. *Microbes Infect.* 8, 1985–93. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.02.030>

- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa, H., 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405, 647–655. <https://doi.org/10.1038/35015017>
- Trauner, A., Borrell, S., Reither, K., Gagneux, S., 2014. Evolution of drug resistance in tuberculosis: Recent progress and implications for diagnosis and therapy. *Drugs* 74, 1063–1072. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0248-y>
- Uhlemann, A.-C., Cameron, A., Eckstein-Ludwig, U., Fischbarg, J., Iserovich, P., Zuniga, F. a, East, M., Lee, A., Brady, L., Haynes, R.K., Krishna, S., 2005. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 628–629. <https://doi.org/10.1038/nsmb947>
- Vasava, M.S., Bhoi, M.N., Rathwa, S.K., Borad, M.A., Nair, S.G., Patel, H.D., 2017. Drug development against tuberculosis: Past, present and future. *Indian J. Tuberc.* 64, 252–275. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2017.03.002>
- Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.Y., Smith, B.R., Ward, K.W., Kopple, K.D., 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* 45, 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>
- Velázquez-Libera, J.L., Rossino, G., Navarro-Retamal, C., Collina, S., Caballero, J., 2019. Docking, Interaction Fingerprint, and Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationship (3D-QSAR) of Sigma1 Receptor Ligands, Analogs of the Neuroprotective Agent RC-33. *Front. Chem.* <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00496>
- Ventura, C., Latino, D. a. R.S.R.S., Martins, F., 2013. Comparison of Multiple Linear Regressions and Neural Networks based QSAR models for the design of new antitubercular compounds. *Eur. J. Med. Chem.* 70, 831–845. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.10.029>
- Vergne, I., Chua, J., Singh, S.B., Deretic, V., 2004. CELL BIOLOGY OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PHAGOSOME. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 367–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.114015>
- Vilchèze, C., Baughn, A.D., Tufariello, J.A., Leung, L.W., Kuo, M., Basler, C.F., Alland, D., Sacchettini, J.C., Freundlich, J.S., Jacobs, W.R., 2011. Novel inhibitors of InhA efficiently kill Mycobacterium tuberculosis under aerobic and anaerobic conditions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3889–3898. <https://doi.org/10.1128/AAC.00266-11>
- Villemagne, B., Crauste, C., Flipo, M., Baulard, A.R., Déprez, B., Willand, N., 2012. Tuberculosis: The drug development pipeline at a glance. *Eur. J. Med. Chem.* 51, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.02.033>
- Wagner, D., Maser, J., Moric, I., Boechat, N., Vogt, S., Gicquel, B., Lai, B., Reytrat, J.M., Bermudez, L., 2005. Changes of the phagosomal elemental concentrations by Mycobacterium tuberculosis Mramp. *Microbiology* 151, 323–332. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27213-0>
- Walters, W.P., 2012. Going further than Lipinski’s rule in drug design. *Expert Opin. Drug Discov.*

<https://doi.org/10.1517/17460441.2012.648612>

- Ward, S.K., Abomoelak, B., Hoye, E.A., Steinberg, H., Talaat, A.M., 2010. CtpV: A putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 77, 1096–1110. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07273.x>
- Warren, G.L., Andrews, C.W., Capelli, A.M., Clarke, B., LaLonde, J., Lambert, M.H., Lindvall, M., Nevins, N., Semus, S.F., Senger, S., Tedesco, G., Wall, I.D., Woolven, J.M., Peishoff, C.E., Head, M.S., 2006. A critical assessment of docking programs and scoring functions. *J. Med. Chem.* 49, 5912–5931. <https://doi.org/10.1021/jm050362n>
- Weiss, G., Schaible, U.E., 2015. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* 264, 182–203. <https://doi.org/10.1111/imr.12266>
- Wermuth, C.G., 2011. The Practice of Medicinal Chemistry, in: Wermuth, C.G. (Ed.), . USA, p. 982.
- Wermuth, C.G., Ganellin, C.R., Lindberg, P., Mitscher, L.A., 1998. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure Appl. Chem.* 70, 1129–1143. <https://doi.org/10.1351/pac197951081725>
- Wiederstein, M., Sippl, M.J., 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 35, W407–10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>
- Wiemann, P., Perevitsky, A., Lim, F.Y., Shadkchan, Y., Knox, B.P., Landero Figueora, J.A., Choera, T., Niu, M., Steinberger, A.J., Wüthrich, M., Idol, R.A., Klein, B.S., Dinauer, M.C., Huttenlocher, A., Oshero, N., Keller, N.P., 2017. *Aspergillus fumigatus* Copper Export Machinery and Reactive Oxygen Intermediate Defense Counter Host Copper-Mediated Oxidative Antimicrobial Offense. *Cell Rep.* 19, 1008–1021. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.019>
- Wolber, G., Langer, T., 2005. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J. Chem. Inf. Model.* 45, 160–169. <https://doi.org/10.1021/ci049885e>
- World Health Organization, 2019. Global tuberculosis report 2019. [https://doi.org/ISBN 978 92 4 156539 4](https://doi.org/ISBN%20978%2092%204156539%204)
- World Health Organization, 2018. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care [WWW Document]. URL <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255052/9789241550000-eng.pdf?sequence=1> (accessed 6.15.19).
- Yao, S., Gallenkamp, D., Wölfel, K., Lüke, B., Schindler, M., Scherckenbeck, J., 2011. Synthesis and SERCA activities of structurally simplified cyclopiiazonic acid analogues. *Bioorganic Med. Chem.* 19, 4669–4678. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.06.001>
- Yatime, L., Buch-Pedersen, M.J., Musgaard, M., Morth, J.P., Winther, A.M.L., Pedersen, B.P., Olesen, C., Andersen, J.P., Vilsen, B., Schiøtt, B., Palmgren, M.G., Møller, J. V, Nissen, P., Fedosova, N., 2009. P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. *Biochim. Biophys.*

- Acta - Bioenerg. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.12.019>
- Yuan, K., Huang, C., Fox, J., Latorius, D., Carlson, E., Zhang, B., Yin, Q., Gao, H., Wu, M., 2012. Autophagy plays an essential role in the clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages. *J. Cell Sci.* 125, 507–515. <https://doi.org/10.1242/jcs.094573>
- Zanotti, G., 2016. The Ca²⁺ ATPase of the Sarco-/Endoplasmic Reticulum (SERCA): Structure and Control, in: Chakraborti, S., Dhalla, N. (Eds.), *Regulation of Ca²⁺-ATPases, V-ATPases and F-ATPases*. Springer, pp. 137–151. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24780-9_9
- Zhu, W., Wang, J., 2013. Discovery of Novel Acetohydroxyacid Synthase Inhibitors as Active Agents against *Mycobacterium tuberculosis* by Virtual Screening and Bioassay.
- Zor, T., Selinger, Z., 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* 236, 302–308. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0171>
- Zumla, A., Nahid, P., Cole, S.T., 2013. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 388–404. <https://doi.org/10.1038/nrd4001>