UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Búsqueda de inhibidores del transportador de membrana CtpF de *Mycobacterium tuberculosis* mediante screening virtual basado en farmacóforo y determinación *in vitro* de la actividad

Henry Andrés Varón Vega

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá D.C, Colombia

2022

Búsqueda de inhibidores del transportador de membrana CtpF de *Mycobacterium tuberculosis* mediante screening virtual basado en farmacóforo y determinación *in vitro* de la actividad

Henry Andrés Varón Vega
Químico

Tesis presentada como requisito parcial para optar por el título de:
Magister 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
2022

Agradecimientos

Agradezco a Dios por darme la fortaleza y ayuda necesaria para culminar esta etapa.

Agradezco especialmente a mis padres Yanet y Henry, sin su increíble apoyo no hubiese sido posible terminar este proyecto, por su amor y dedicación para ayudarme a llegar un poco más lejos. Agradezco a mis hermanos Paola, Sergio, Mónica y Daniela, a mi tío Álvaro y a mi familia en general por ser una fuente de motivación inagotable.

Agradezco al profesor Carlos Yesid Soto por motivarme a entrar al mundo de la microbiología, por su guía y apoyo en mi proceso de formación, y darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación.

Agradezco al profesor Fabián López Vallejo por abrirme las puertas de su laboratorio, y que con gran amabilidad y paciencia me orientó y ayudó a conocer un poco del vasto mundo de la quimioinformática.

Agradezco al grupo de investigación de Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias, a las profesoras Martha Nancy Calderón y Luz Mary Salazar por su instrucción y colaboración en los ensayos que necesité. Un especial agradecimiento a Paola, por ser una de mis mayores guías durante este proceso. Agradezco a Marcela, Milena y Vanesa por su gran disposición para resolver cualquiera de mis inquietudes o dudas.

Agradezco a la profesora Diana Diaz (FIDIC), que amablemente me permitió hacer los ensayos necesarios en su laboratorio.

Agradezco a mis compañeros del grupo MDML Felipe, Laura y Alberto que durante mi estancia en el laboratorio me ayudaron, acompañaron y compartieron su conocimiento para poder llegar a este punto.

Agradezco mis amigos Jafet, Laura, Carlos, Alejandra, Luisa, Fernanda, Martha, Mariana, Ruby, familia Cáceres y todos los demás que me han acompañado y apoyado hasta el día de hoy en diferentes momentos de mi vida.

Finalmente, agradezco a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron directa o indirectamente a la culminación satisfactoria de este trabajo.

Resumen

Búsqueda de inhibidores del transportador de membrana CtpF de *Mycobacterium tuberculosis* mediante screening virtual basado en farmacóforo y determinación *in vitro* de la actividad

La aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), multirresistente y extremadamente resistente a los fármacos, y la coinfección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), han aumentado dramáticamente la mortalidad por tuberculosis (TB) en el mundo. Esta situación obliga a la necesidad de encontrar dianas terapéuticas alternativas y la identificación de nuevos fármacos más efectivos contra la TB. En este sentido, las proteínas de membrana ATPasas tipo P, podrían ser blancos relevantes, toda vez que se conoce son relevantes en la homeostasis iónica y en la supervivencia de *Mtb* durante la infección. CtpF, una Ca^{2+}-ATPasa de membrana plasmática, es una proteína que se activa en condiciones de hipoxia, estrés oxidativo e infección, sugiriendo qué este transportador hace parte de las estrategias usadas por el bacilo tuberculoso para evadir la respuesta inmune. Considerando la importancia de CtpF en la viabilidad del bacilo tuberculoso, en el presente trabajo se planteó la búsqueda de nuevos compuestos con potencial actividad inhibitoria del transporte de Ca^{2+} mediado por CtpF.

En el presente trabajo se partió del análisis *in silico* de los modos de unión y las interacciones con los residuos funcionalmente activos entre CtpF y el ácido ciclopiazónico (CPA, un reconocido inhibidor de la actividad Ca^{2+} ATPasa en eucariotas) además de tres compuestos adicionales que en un estudio previo mostraron inhibición del crecimiento de

Mtb y de la actividad ATPasa mediada por CtpF. Para la identificación de los nuevos inhibidores se llevó a cabo un cribado virtual basado en diferentes métodos quimioinformáticos que incluyeron: dinámica molecular, modelado del farmacóforo, huellas digitales moleculares, acoplamiento molecular automatizado y cálculos de energía de libre de unión.

La estrategia propuesta en este trabajo permitió identificar once compuestos con potencial actividad inhibitoria de CtpF, los que se probaron *in vitro*. Ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) permitieron seleccionar cuatro nuevos inhibidores del crecimiento de *Mtb* (ZINC57418826, ZINC12547355, ZINC09731847 y ZINC04030361). Experimentos para determinar el efecto de dos de estos compuestos sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa de vesículas de membrana, mostraron que los ligandos ZINC09731847 (IC_{50} = 7,6 µM) y ZINC04030361 (IC_{50} = 3,3 µM) inhiben de manera efectiva la actividad de CtpF en membrana plasmática. Los resultados de CMI (25,0 µg/mL) actividad Ca^{2+}-ATPasa, actividad citotóxica (27,2, %) sobre células vero y hemólisis sobre glóbulos rojos humanos (0,2 %), ayudaron a seleccionar el compuesto ZINC04030361 como el candidato más activo contra la ATPasa CtpF de membrana plasmática.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo representan un avance en la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos anti-TB dirigidos a dianas alternativas, como son las proteínas de membrana involucradas en la homeóstasis iónica de *Mtb*.

Palabras clave: tuberculosis, fármaco-resistencia, ATPasas tipo P, acoplamiento molecular, cribado virtual, CtpF.

Abstract

Search for *Mycobacterium tuberculosis* membrane transporter CtpF inhibitors by pharmacophore-based virtual screening and *in vitro* activity determination

The appearance of multidrug-resistant and extremely drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) strains, and co-infection with the human immunodeficiency virus (HIV), have dramatically increased mortality from tuberculosis (TB) in the world. This situation forces the need to find alternative therapeutic targets and the identification of new and more effective drugs against TB. In this way, P-type ATPase membrane proteins are known to be relevant in ionic homeostasis and in the survival of *Mtb* during infection. CtpF, a Ca^{2+}-ATPase, is a protein whose encoding gene is activated under conditions of hypoxia, oxidative stress, and infection, suggesting that this transporter is part of the strategies used by the tubercle bacillus to evade the immune response. Considering the importance of CtpF in the viability of the tubercle bacillus, was proposed in the present work the search for new compounds with potential inhibitory activity of Ca^{2+} transport mediated by CtpF.

In the present work, we started from the *in silico* analysis of the binding modes and the interactions with the functionally active residues between CtpF and cyclopiazonic acid (CPA, a recognized inhibitor of Ca^{2+} ATPase activity in eukaryotes) and three additional compounds, which in a previous study showed inhibition of *Mtb* growth, as well as of CtpF mediated ATPase activity. For the identification of the new inhibitors, a virtual screening was carried out based on different chemoinformatic methods that included: molecular

dynamics, pharmacophore modeling, molecular fingerprinting, automated molecular docking, and binding free energy calculations.

The strategy proposed in this work allowed the identification of eleven compounds with potential CtpF inhibitory activity, these compounds were tested *in vitro*. Minimum inhibitory concentration (MIC) assays allowed the selection of four new *Mtb* growth inhibitors (ZINC57418826, ZINC12547355, ZINC09731847 and ZINC04030361). Experiments to determine the effect of two of these compounds on the Ca^{2+}-ATPase activity of membrane vesicles, showed that the ligands ZINC09731847 (IC_{50} = 7,6 µM) and ZINC04030361 (IC_{50} = 3,3 µM) effectively inhibit CtpF activity. The results of MIC (25,0 µg/mL) Ca^{2+}-ATPase activity, in addition to cytotoxic activity assays on Vero cells (27,2 %) and hemolysis on human red blood cells (0,2%), helped to select the compound ZINC04030361 as the most active candidate against the plasma membrane ATPase CtpF.

Finally, the results obtained represent an advance in the search and development of new anti-TB compounds directed at alternative targets, such as the membrane proteins involved in the ionic homeostasis of *Mtb*.

Keywords: tuberculosis, drug-resistance, P-type ATPases, molecular docking, virtual screening, CtpF.

Contenido

Resumen VII
Abstract IX
Lista de figuras XIII
Lista de tablas XV
Abreviaturas XVII
Introducción 1
1. Marco teórico 5
1.1. Tuberculosis 5
1.2. *Mycobacterium tuberculosis* 7
1.3. Patogénesis 9
1.4. Tratamiento 11
1.5. Transporte a través de la membrana plasmática 13
1.6. ATPasas tipo P 14
1.7. Clasificación de ATPasas tipo P 17
1.8. ATPasas tipo P de *Mtb* 19
1.9. CtpF 20
1.10. DosR 23
1.11. Estrategias para la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos 24
1.11.1. Estrategias no racionales 24
1.11.2. Estrategias racionales. 26
1.11.2.1. Diseño basado en la estructura del ligando 26
1.11.2.2. Diseño basado en la estructura del receptor 28
1.11.2.3. Acoplamiento molecular. 28
2. Justificación 31

3. Hipótesis experimental 33
4. Objetivos 35
5. Metodología 37
5.1. Estudios computacionales 39
5.1.1. Dinámica molecular (DM) 39
5.1.2. Cribado virtual basado en farmacóforo 40
5.1.3. Preparación de ligandos, acoplamiento molecular y *rescoring* 41
5.1.4. Huella digital molecular de interacción P-L 42
5.2. Ensayos biológicos 43
5.2.1. Cepas de micobacterias y condiciones de cultivo 43
5.2.2. Compuestos seleccionados 43
5.2.3. Ensayo de actividad antimicobacteriana de los compuestos seleccionados 44
5.2.4. Efecto de los compuestos seleccionados sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa en vesículas de membrana de *Mtb*. 45
5.2.5. Actividad citotóxica 47
5.2.6. Actividad hemolítica 48
6. Resultados y discusión 49
6.1. Dinámica molecular de los complejos CtpF – CPA, ligando A, B y C 49
6.2. Modelado de farmacóforos 51
6.3. Cribado virtual 56
6.4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) 60
6.5. Efecto de los compuestos seleccionados sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa de CtpF 63
6.6. Actividad citotóxica y hemolítica de los compuestos evaluados 67
6.7. Modos de unión de los compuestos activos 70
7. Conclusiones 75
8. Recomendaciones y perspectivas 77
9. Bibliografía 79

Lista de figuras

Figura 1-1. Tasas reportadas de incidencia de TB en el año 2020[1]. 6

Figura 1-2. Representación de la envoltura celular de *Mtb*. La envoltura celular de *Mtb* posee tres componentes bien diferenciados: la membrana plasmática, la pared celular y la cápsula. Se representan residuos de arabinosa (pentágonos de color azul), galactosa (pentágonos de color rojo), manosa (pentágonos de color café) y glucosa (pentágonos de color negro) y cadenas de ácidos micólicos (AM, de color verde oscuro)[25]. 9

Figura 1-3. Infección por *Mtb*. **A.** Infección latente: El ingreso de la bacteria se da a través de la vía respiratoria hasta los alveolos. Si la primera línea de defensa no elimina a la bacteria, se da posteriormente un reclutamiento de células inmunes para formar el granuloma. **B.** Enfermedad activa: diseminación de la micobacteria debido a la ruptura del granuloma al fallar en contener la infección[2]. 11

Figura 1-4. Blancos moleculares y mecanismos de acción de algunos de los actuales anti-TB en uso. Se muestran los blancos moleculares de fármacos de primera y segunda línea[32]. 12

Figura 1-5. Representación de los dominios estructurales y funcionales típicos de las ATPasas tipo P. **A.** Vista esquemática general de la organización estructural de las ATPasas tipo P. **B.** Modelo de cintas de la estructura cristalina de Ca^{2+}-ATPasa SERCA1a[41]. 15

Figura 1-6. Mecanismo de transporte putativo de Zn^{2+} en una ATPasa tipo P[42]. 17

Figura 1-7. Esquema general de los comportamientos transcripcionales de las ATPasa tipo P de *Mtb* bajo condiciones de estrés. Dentro de las condiciones de estrés se encuentran exposición a sustancias tóxicas, latencia e infección[12]. 20

Figura 1-8. Ensayos de acumulación en *M. smegmatis* WT y recombinante (WT + CtpF). **A.** representación del modelo para el funcionamiento de CtpF, la ATPasa transporta Ca^{2+} contra el gradiente de concentración para mantener los niveles de este catión en el citosol de la bacteria. **B.** Acumulación de Ca^{2+} en *M. smegmatis* WT y recombinante (WT + CtpF)[11]. 22

Figura 1-9. Acumulación de Ca^{2+} en vesículas de membrana de *M. smegmatis* WT y recombinante (WT + CtpF). A. representación del modelo de vesículas de membrana en donde se favorece la configuración invertida de los dominios citoplasmáticos de CtpF, de forma que quedan expuestos al medio de reacción. B. Acumulación de Ca^{2+} en vesícula de membrana de *M. smegmatis* WT y recombinantes (WT + CtpF)[11]. 22

Figura 1-10. Actividad Ca^{2+}-ATPasa mediada por CtpF en vesículas de membrana de *Mtb* WT y *MtbΔctpF*. La actividad Ca^{2+}-ATPasa corresponde a la actividad resultante por la adición de

Ca^{2+} al medio de reacción, la actividad del vanadato corresponde a la inhibición de la actividad Ca^{2+} por la adición de VO_4^{3-} al medio de reacción, un conocido inhibidor de ATPasas tipo P[11]. 23

Figura 5-1. Representación esquemática de las etapas que conforman la metodología utilizada en el presente estudio para la búsqueda de nuevos inhibidores del crecimiento de *Mtb* y la actividad de CtpF. 38

Figura 6-1. Variación del RMSD de CtpF y los respectivos ligandos durante 50 ns de simulación. **A.** RMSD de CtpF - CPA. **B.** RMSD de CtpF - A. **C.** RMSD de CtpF - B. **D.** RMSD de CtpF - C. ... 51

Figura 6-2. Interacciones P-L formadas durante la simulación de dinámica molecular entre CtpF y **A.** CPA; **B.** Ligando A; **C.** Ligando B; **D.** Ligando C 53

Figura 6-3. Modelos farmacofóricos propuestos a partir de las interacciones P-L más importantes obtenidas durante el tiempo de simulación por dinámica molecular. Las etiquetas A, D, H y Ar hacen referencia a grupos aceptores, donadores, hidrofóbicos y aromáticos respectivamente. **A.** Modelo CPA. **B.** Modelo 1. **C.** Modelo 2. **D.** Modelo 3 55

Figura 6-4. Actividad ATPasa basal y estimulada por la adición de Ca^{2+} de vesículas de membrana de las cepas *Mtb* WT y *MtbΔctpF*. La actividad Ca^{2+} se estimuló mediante la adición de Ca^{2+}-libre (30 µM). Estos valores se comparan con la actividad obtenida en presencia de VO_4^{-3} (50 µM). Los valores presentados corresponden a la media ± SEM (n = 3). Las diferencias significativas están descritas por asteriscos como **, P < 0,01. 64

Figura 6-5. Efecto de los compuestos ZINC0430361 y ZINC09731847 sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa normalizada. Se muestra el efecto de los compuestos (0,1 – 200 µM) sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa de *Mtb* WT y *MtbΔctpF*. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las mediciones de vesículas de membrana de las dos cepas desde 1,0 µM, se indican como *, P < 0,05; ** P < 0,001. Los valores corresponden a la media ± SEM (n = 3). 65

Figura 6-6. Efecto de los compuestos ZINC0430361 y ZINC09731847 sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa normalizada de vesículas de membrana de *Mtb* WT y *MtbΔctpF*. Se muestra la actividad a una concentración de 100,0 µM. Los resultados corresponden a la media ± SEM (n = 3). Se estimaron diferencias estadísticamente significativas en entre la actividad Ca^{2+}-ATPasa de las vesículas de membrana de las cepas *Mtb* WT y *MtbΔctpF,* en donde **, P < 0,01. El control corresponde al 100 % de actividad Ca^{2+}-ATPasa normalizada, en donde no hay presencia de los compuestos. 66

Figura 6-7. Modos de unión 3D y 2D a CtpF de los compuestos activos. **A.** ZINC04030361. **B.** ZINC09731847..... 73

Lista de tablas

Tabla 6-1. Resumen de propiedades *drug-like*, energías libres de unión *ΔG* MMGBSA, Glide score y similitud (basada en el coeficiente de Tanimoto) de las moléculas seleccionadas del cribado virtual basado en farmacóforo de la base de datos ZINC. Se muestran las moléculas seleccionadas para cada modelo, los modelos CPA, 1, 2 y 3 están basados en características farmacofóricas de los ligandos CPA, A, B y C respectivamente 57

Tabla 6-2. Resultados de CMI de las moléculas evaluadas sobre *Mtb;* los resultados corresponden al triplicado de dos ensayos independientes 61

Tabla 6-3. Efecto sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa de los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847 66

Tabla 6-4. Efecto citotóxico de los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847 sobre células Vero 68

Tabla 6-5. Actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos O Rh (+) de los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847 69

Tabla 6-6. Residuos de CtpF con los que interactúan los compuestos activos, todos los residuos se encuentran a una distancia máxima de 4,0 Å 71

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ADMET	Absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad
AG	Arabinogalactano
AM	Ácidos micólicos
Anti-TB	Antituberculosos
ATP	Adenosín trifosfato
BCG	bacilo de Calmette-Guérin
BHQ	2,5-di(t-butil) hidroquinona
CL	Cardiolipina
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CPA	ácido ciclopiazónico
DAT	Diaciltrehalosas
DFBE	Diseño de fármacos basado en la estructura del receptor
DFBL	Diseño de fármacos basado en la estructura del ligando
DiFAC	Diseño de fármacos asistido por computadora
DM	Dinámica molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMB	Etambutol
IC_{50}	Concentración inhibitoria media
INH	Isoniazida
LM	Lipomanano
ManLAM	Lipoarabinomanano
MM-GBSA	Mecánica molecular con área de superficie generalizada Born
Mtb	*Mycobacterium tuberculosis*
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
OMS	Organización mundial de la salud
PAT	Poliaciltrehalosa (PAT)
PDIM	Dimicocerosato de tiocerol
PE	fosfatidiletanolamina
PG	Peptidoglicano
PGL	Glicolípidos fenólicos
PIM	Fosfatidilinositol manósido

P-L	proteína-Ligando
PLIF	*Protein Ligand Interaction Fingerprint*
PZA	Pirazinamida
QSAR	Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad
RIF	Rifampicina
RMSD	*Root Mean Square Deviation*
SERCA	Bomba de calcio de retículo sarcoendoplásmico
SL	Sulfolípidos
TB	Tuberculosis
TB-MDR	Tuberculosis multirresistente
TB-XDR	Tuberculosis extremadamente-resistente
TDM	Dimicolatos de trehalosa
TMD	Segmentos transmembranales
TMM	Monomicolatos de trehalosa
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

Introducción

Hasta la llegada de la pandemia de COVID 19, la tuberculosis (TB) era la principal causa de muerte producida por un agente infeccioso; sin embargo, la TB continúa siendo un problema grave de salud pública a nivel mundial; por ejemplo, para el año 2021 se presentaron 1,5 millones de muertes por TB[1]. La incidencia de la TB aumenta por la dificultad de acceder a un tratamiento efectivo, y un diagnóstico apropiado, en parte consecuencia de la misma pandemia del COVID 19. A este preocupante panorama se suma el surgimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) multirresistentes y extremadamente resistentes a los fármacos, la baja efectividad de la vacuna BCG (bacilo de Calmette-Guérin), y el alto porcentaje de pacientes coinfectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)[2,3].

El tratamiento contra la TB activa consiste en la administración hasta por 12 meses, de una combinación de cuatro fármacos denominados de primera línea, que incluyen rifampicina (RIF), isoniazida (INH), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA)[2]; sin embargo, la resistencia frente a los fármacos anti-TB de primera línea se ha incrementado. Por otra parte, la TB multirresistente (TB-MDR) consiste en la resistencia simultánea a la INH y la RIF[1]. Contra la TB-MDR existen fármacos de segunda línea como capreomicina, kanamicina, amikacina y fluoroquinolonas, que hacen parte de un tratamiento más largo y tóxico para los pacientes. También es posible encontrar cepas de *Mtb* resistentes a fármacos de segunda línea, y algunas fluoroquinolonas, lo que se conoce como TB extremadamente-resistente (TB-XDR)[1,2]. La constante capacidad de *Mtb* para generar resistencia a los diferentes anti-TB, obliga a la búsqueda de blancos terapéuticos alternativos, y nuevos compuestos anti-TB

para, entre otros, puedan por ejemplo ser a futuro administrados en combinación con los anti-TB tradicionales[4].

En este sentido, nuestro grupo de investigación (**BBMM**, Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias, del Departamento de Química, de la Universidad Nacional de Colombia) se ha interesado en la búsqueda de nuevos compuestos anti-TB, utilizando como blanco los transportadores de membrana ATPasas tipo P. Las ATPasas tipo P forman parte de los mecanismos de *Mtb* para mantener la homeostasis iónica y garantizar su supervivencia intrafagosomal[5–7]. El genoma de *Mtb* contiene once ATPasas tipo P clasificadas de acuerdo a la especificidad del transporte: i) transportadores de metales pesados (CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpG, CtpJ, CtpV) y ii) transportadores de metales alcalino/alcalinotérreos (CtpE, CtpF, CtpH, CtpI)[8]. La función de estas ATPasas se ha asociado con el eflujo de cationes como Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Na^{+}, K^{+} y Ca^{2+} [5,9–11].

Entre las ATPasas tipo P de *Mtb* se destaca CtpF, un transportador implicado en el eflujo de Ca^{2+} y su respuesta al estrés oxidativo. *ctpF* es el gen entre los que codifican para ATPasas tipo P de *Mtb*, que muestra mayor activación bajo condiciones de estrés similares a las del ambiente intrafagosomal[12]. Este gen hace parte del regulón DosR, importante para la adaptación de *Mtb* a las condiciones de baja disponibilidad de oxígeno y la entrada al estado de latencia[13]. Todo esto sugiere que CtpF es importante para viabilidad del bacilo tuberculoso.

Con anterioridad, las ATPasas tipo P ya han sido usadas como blancos en el desarrollo de compuestos antimicrobianos exitosos, como es el caso de la artemisinina, un antimalárico que inhibe la actividad de la proteína PfATP6, una Ca^{2+}-ATPasa de *Plasmodium falciparum*[14].

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación se desarrolló un cribado virtual basado en farmacóforo, para identificar compuestos que bloquean la actividad de CtpF y disminuyen la viabilidad de *Mtb*[15]. En ese trabajo se modeló la estructura 3D de CtpF basada en datos experimentales, toda vez que no se ha descrito la estructura

tridimensional de ninguna ATPasa tipo P de *Mtb*. Para ello, se utilizó como plantilla la estructura cristalográfica de SERCA1a, una Ca^{2+}-ATPasa ampliamente estudiada de la que se si conoce su estructura 3D en diferentes estados conformacionales. La estructura de SERCA1a se reportó unida al ácido ciclopiazónico (CPA), un metabolito de *Penicillium* y *Aspergillus* que al unirse a los segmentos transmembranales (TMDs) de SERCA1a bloquea el transporte de Ca^{2+} [16,17]. Se conoce que CPA afecta el transporte de calcio mediado por la proteína PfATP6 de *P. falciparum*, homóloga de SERCA1a.

Nuestros estudios previos lograron establecer que CPA además de inhibir el crecimiento de *Mtb*, también inhibe el trasporte de Ca^{2+} mediado por CtpF. Este resultado permitió utilizar a CPA para modelar un farmacóforo a ser usado en un cribado virtual. El objetivo del cribado virtual fue el de encontrar compuestos inhibidores del crecimiento y la actividad Ca^{2+}-ATPasa mediada por CtpF de *Mtb*. El desarrollo de esa estrategia permitió mostrar que, entre tres ligandos seleccionados, uno de ellos era el más activo, obteniendo una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 50,0 µg/mL, una inhibición de la actividad Ca^{2+}-ATPasa del 45 % (IC_{50} = 4,4 µM), una citotoxicidad del 12,9 % y una actividad hemolítica de 2 % en células eucariotas[15].

Aunque positivos, los resultados previos animaron a una nueva búsqueda de inhibidores de la actividad ATPasa tipo P mediada por CtpF más activos. Para ello, se tuvo como punto de partida CPA y los tres ligandos que mostraron mejores resultados *in vitro* en el estudio descrito anteriormente (ZINC55090623, ZINC63908257 y ZINC45605493), además del modelo 3D de CtpF previamente desarrollado en ese mismo estudio. Por lo tanto, mediante simulaciones de dinámica molecular, se permitió la evolución de los cuatro complejos (CtpF con cada uno de los ligandos antes mencionados) a través del tiempo, de manera que se logró simular las interacciones proteína-ligando (P-L) que se forman en cada complejo. Esta información fue usada para modelar cuatro farmacóforos derivados de cada complejo, los que fueron exportados a la plataforma web ZINCPharmer para identificar potenciales moléculas inhibidoras de CtpF. Mediante un refinamiento de los modos de unión de estos candidatos por acoplamiento molecular, cálculos de energía MM-GBSA,

huella digital de interacción P-L, se seleccionaron once compuestos que mostraron los mejores resultados teóricos.

La actividad de los once compuestos identificados se probó experimentalmente, identificando entre ellos cuatro nuevos inhibidores del crecimiento de *Mtb*. También se evaluó el efecto de los compuestos sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa mediada por CtpF en vesículas de membrana, lo que permitió identificar que los compuestos ZINC09731847 y ZINC04030361 inhiben específicamente la actividad de CtpF.

El compuesto ZINC04030361 fue el candidato más activo en este estudio, con una CMI de 25,0 µg/mL (la mitad de la CMI del mejor candidato del estudio previo[15]), y una inhibición del 50 % la actividad Ca^{2+}-ATPasa mediada por CtpF (IC_{50} = 3,3 µM). Ensayos adicionales mostraron que ZINC04030361 posee una actividad citotóxica y hemolítica de 27,2 % y 0,2 % respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que la estrategia de cribado virtual basado en farmacóforo utilizada en el presente trabajo fue exitosa en la búsqueda de nuevos y mejores inhibidores de CtpF.

1. Marco teórico

1.1. Tuberculosis

Hasta la llegada de la pandemia de COVID 19, la tuberculosis (TB) fue la primera causa de muerte por una enfermedad infecciosa, aun sobre el VIH. En el año 2020 la TB continuó siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad principalmente en países de bajos y medianos ingresos (**Figura 1-1**). Según la organización mundial de la salud (OMS), la pandemia de COVID-19 produjo efectos negativos sobre la reducción de la TB. El impacto más evidente se refleja en el subdiagnóstico; durante la pandemia en 2020 se reportaron menos casos de TB (5,8 millones) comparado con el 2019 (7,1 millones)[1]. Entre tanto, la dificultad para acceder a diagnósticos y tratamientos ha provocado el aumento de muertes por TB, para el año 2020 se reportaron 1,5 millones de muertes a nivel mundial (incluyendo coinfecciones con VIH) frente a los 1,4 millones de muertes reportadas para el año 2019.

En Colombia, para el año 2020 se reportaron 13.037 nuevos casos, lo cual representa una disminución del 12,4 % respecto al año anterior, que, según el Ministerio de Salud, el seguimiento y el diagnóstico adecuado también fue menos efectivo debido a los efectos de la pandemia COVID-19. Antioquia, Cali, Bogotá D.C, Valle del Cauca, Santander, Barranquilla, Norte de Santander y Risaralda agrupan la mayor carga de casos a nivel nacional.

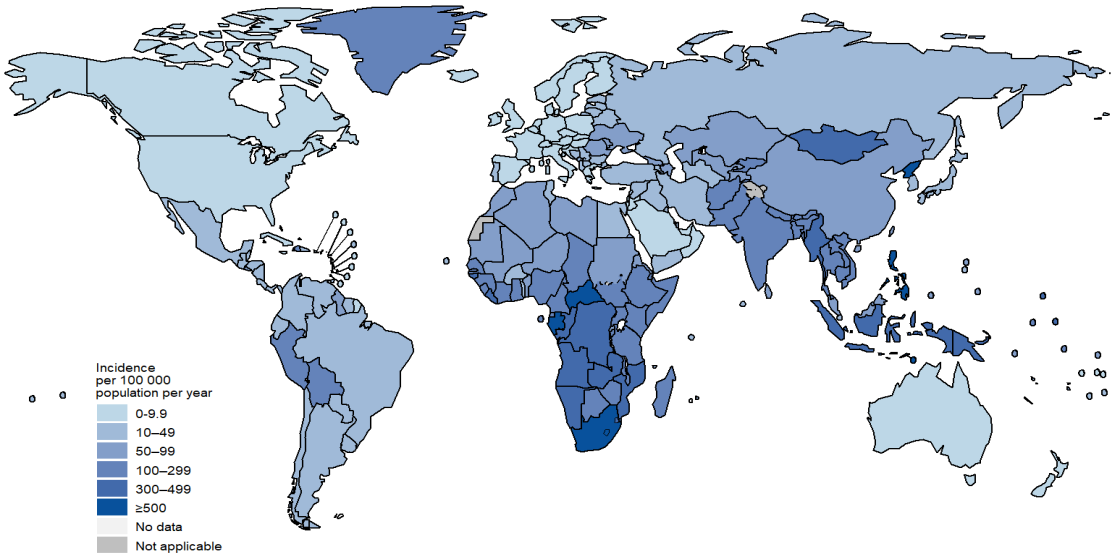


Figura 1-1. Tasas reportadas de incidencia de TB en el año 2020[1].

La TB puede presentarse como una enfermedad de espectro dinámico, desde una infección asintomática, hasta casos mortales. Desde una perspectiva clínica, la TB se clasifica en **TB latente** (un estado asintomático y no transmisible) y **TB activa** (que es transmisible en TB pulmonar activa). En la TB activa los pacientes presentan síntomas generales como fiebre, fatiga, falta de apetito y pérdida de peso, en los casos con la enfermedad pulmonar pueden presentar tos persistente (más de 15 días), mientras que en una enfermedad avanzada se puede presentar hemoptisis. En los casos de enfermedad avanzada se opta por métodos moleculares o cultivos para un diagnóstico[2].

La resistencia de la TB a la INH y RIF (dos de los fármacos de primera línea anti-TB más efectivos) se denomina TB multi-resistente (**TB-MDR**). La resistencia a RIF, a alguna fluoroquinolona y a bedaquilina o linezolid se denomina TB extremadamente-resistente (**TB-XDR**). Para el 2020, 132.222 casos corresponden a TB-MDR, mientras para la TB-XDR se detectaron 25.681 casos[1].

1.2. *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) fue identificado como un patógeno por primera vez por Robert Koch en 1882[18]. *Mtb* es una bacteria con morfología bacilar, es acido alcohol resistente y además posee un tiempo de generación lento, cercano a las 24 horas. Su habilidad para entrar en estados de latencia (estado no replicativo en donde los bacilos son viables pero no se dividen) dificulta la acción terapéutica dirigida a su metabolismo activo[6].

Mtb es capaz de adaptarse a diferentes cambios ambientales, como baja disposición de nutrientes y condiciones de estrés como hipoxia, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno[19]. La envoltura celular del bacilo es altamente hidrofóbica debido a su gran contenido de lípidos, los cuales pueden representar hasta el 40 % del peso en seco de la célula. Además, la envoltura celular es dinámica e inmunomoduladora, pues cambia su estructura y su función dependiendo de las condiciones ambientales, lo que le otorga la capacidad de manipular el sistema inmune y adaptarse el entorno del huésped[20].

La envoltura celular la componen esencialmente la capsula, la pared celular y la membrana plasmática. Esta envoltura le confiere forma, la protege y provee mecanismos para el tránsito de sustancias desde y hacia el exterior de la célula, además de ser esencial para la supervivencia y las interacciones huésped-patógeno[21].

Cápsula: corresponde a la capa más externa de la envoltura celular de las micobacterias, compuesta por polisacáridos, proteínas, y trazas de lípidos cuya síntesis se presume está controlada por mecanismos dependientes del huésped en micobacterias patógenas[22]. Estudios estructurales han permitido establecer que los polisacáridos que se presentan con mayor frecuencia son el glucano, D-arabino-manano y D-manano, implicados en procesos de unión e interacción con la célula hospedera durante la infección (**Figura 1-2**)[21].

Pared celular: similar a la de bacterias gran positivas, pero inusual al presentar una capa de lípidos probablemente dispuesta para formar una barrera de permeabilidad a moléculas polares. La pared está formada por la unión covalente entre péptidoglicano (PG),

arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos (AM) que corresponden a ácidos grasos α-ramificados-β-hidroxilados de cadena larga. En la región más externa de la pared se encuentran lípidos unidos de forma no covalente, tales como: fosfatidilinositol manósido (PIM), dimicocerosato de tiocerol (PDIM), glicolípidos fenólicos (PGL), sulfolípidos (SL), dimicolatos de trehalosa (TDM), monomicolatos de trehalosa (TMM), diaciltrehalosas (DAT), poliaciltrehalosa (PAT) y lipoarabinomanano unido a manosa (ManLAM)[23–25], los que conforman una especie de membrana externa.

Membrana citoplasmática: es la capa más interna de la envoltura celular, su composición es similar a la de otras bacterias, constituida por una bicapa lipídica en donde se encuentran algunas proteínas y liposacáridos como ManLAM y lipomanano (LM), los mayores constituyentes de las membranas aisladas son el ácido palmítico y el ácido oleico. Dentro de los principales fosfolípidos se encuentra PIM, fosfatidilglicerol, cardiolipina (CL) y la fosfatidiletanolamina (PE). La membrana proporciona una barrera de permeabilidad selectiva, además de participar en la síntesis de ATP y la biosíntesis de componentes de la envoltura celular[25].

La estructura lipídica de la pared celular de *Mtb* hace que esta sea una bacteria, desde el punto de vista fisiológico, de difícil acceso para la mayoría de los fármacos. Los compuestos que poseen naturaleza hidrofílica presentan dificultades para atravesar la pared celular debido a la poca disponibilidad de porinas, baja fluidez de los ácidos micólicos y el espesor total de la pared celular[26].

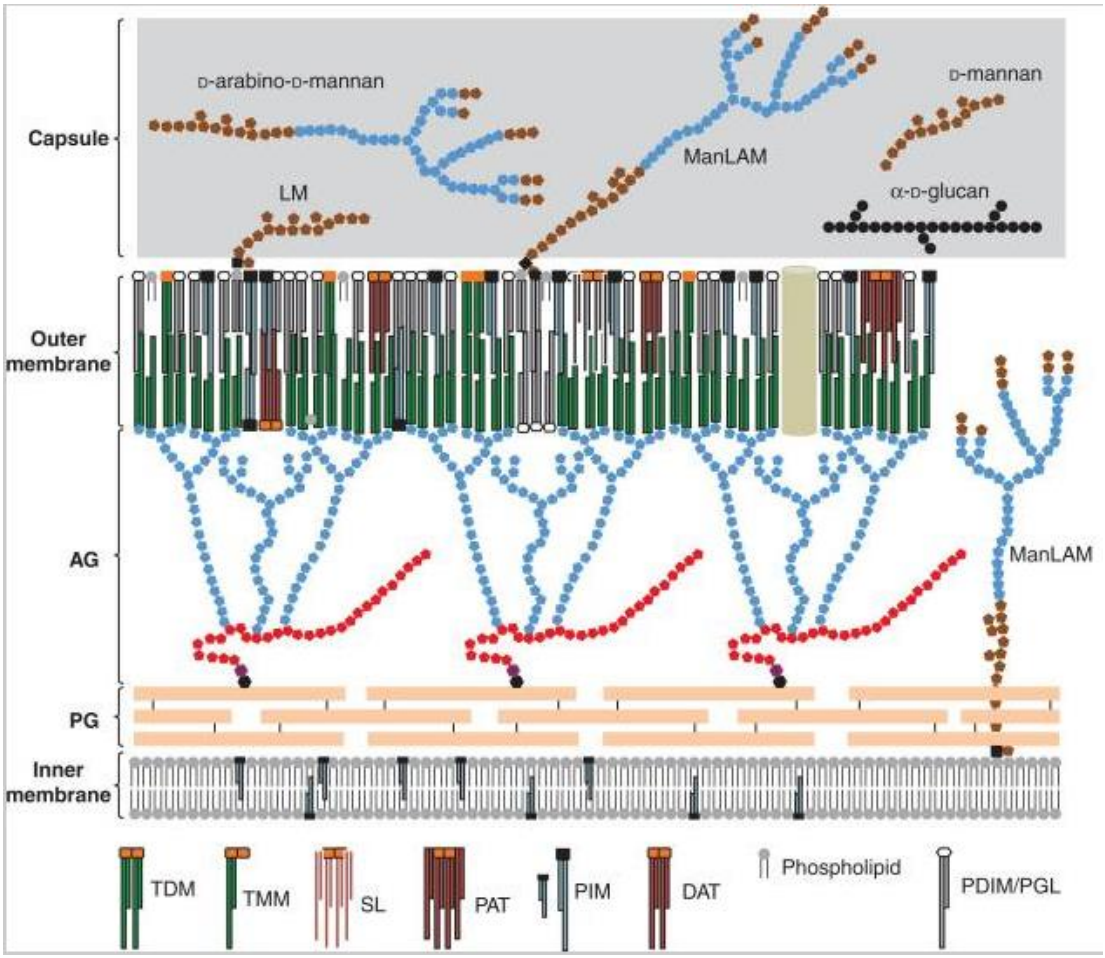


Figura 1-2. Representación de la envoltura celular de *Mtb*. La envoltura celular de *Mtb* posee tres componentes bien diferenciados: la membrana plasmática, la pared celular y la cápsula. Se representan residuos de arabinosa (pentágonos de color azul), galactosa (pentágonos de color rojo), manosa (pentágonos de color café) y glucosa (pentágonos de color negro) y cadenas de ácidos micólicos (AM, de color verde oscuro)[25].

1.3. Patogénesis

La TB se transmite por vía aérea mediante la inhalación de pequeñas gotas de aerosol conteniendo micobacterias, suspendidas en el aire, y expulsadas cuando un paciente infectado tose o estornuda (**Figura 1-3A**). Luego de la inhalación, *Mtb* se transloca al tracto respiratorio inferior en donde es reconocida por los macrófagos alveolares residentes, internalizando la bacteria mediante fagocitosis. Si esta primera línea de defensa

(macrófagos alveolares) no consigue eliminar la bacteria en las vías respiratorias, *Mtb* accede al intersticio pulmonar, en donde el proceso de infección evoluciona. Posteriormente, las células dendríticas o monocitos inflamatorios transportan a *Mtb* a los ganglios linfáticos pulmonares para la activación de las células T. Este evento promueve el reclutamiento de células inmunes (células T y B) al parénquima para formar un granuloma[27]. Desde el puno de vista del huésped el granuloma se puede definir como una "prisión" bacteriana con potencial de aislar la infección del resto del cuerpo. Sin embargo, para la micobacteria, esta puede verse como una agrupación creciente de células fagocíticas para infectar en su interior[2]. *Mtb* reside en los fagosomas dentro de los macrófagos, allí se enfrenta a un complejo y dinámico sistema de defensas del huésped, que incluyen acidificación, intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, péptidos antimicrobianos y altas concentraciones de metales pesados, principalmente Zn y Cu.

En la mayoría de los casos (es decir en la TB latente) la combinación de macrófagos, células dendríticas y células T son suficientes para mantener una infección asintomática controlada; sin embargo, en un subconjunto de huéspedes la infección puede progresar hasta la enfermedad activa. Este progreso puede tomar semanas o décadas debido a que la integridad del granuloma puede verse comprometida resultando en necrosis o caseificación de la estructura, lo que expone a la micobacteria a un ambiente extracelular hipóxico, rico en lípidos[28,29]. Posterior al daño inicial, la integridad del granuloma puede verse comprometida, liberando miles de bacterias que estuvieron en un estado de replicación lenta (**Figura 1-3B**). Una vez liberada en las vías respiratorias, *Mtb* completa la etapa final de su ciclo de vida formando aerosoles infecciosos que permiten su transmisión a un nuevo huésped.

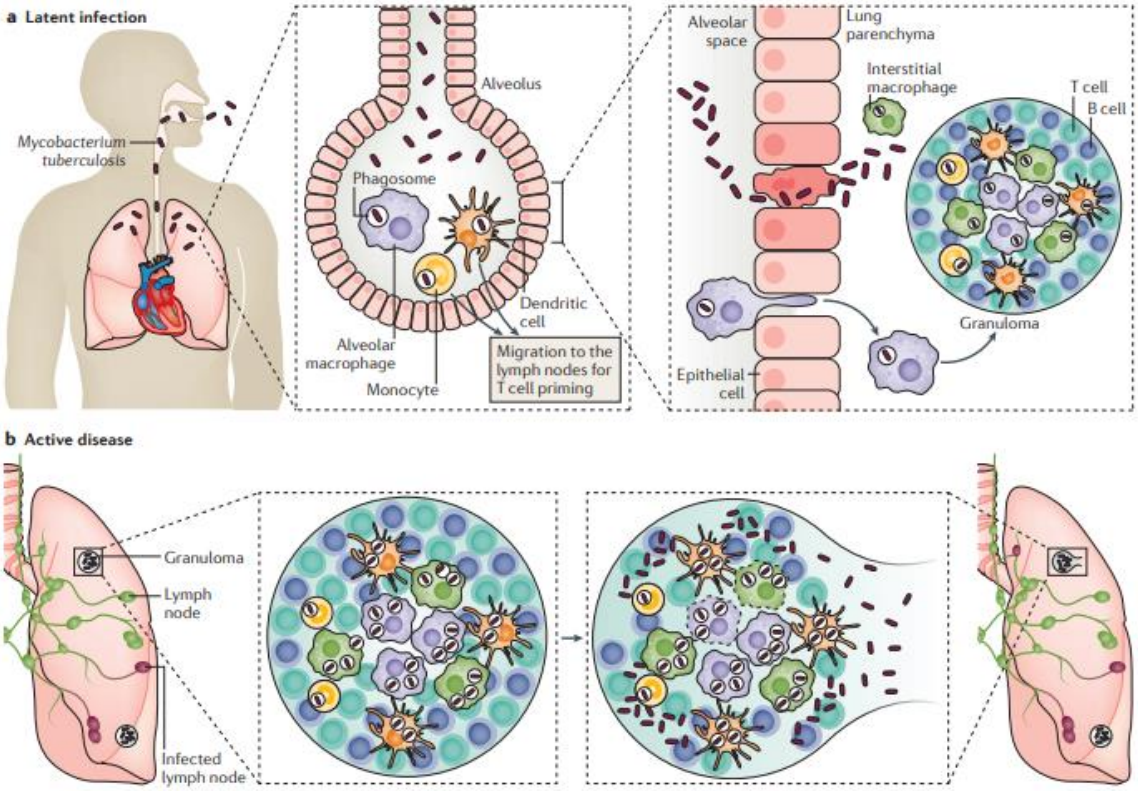


Figura 1-3. Infección por *Mtb*. **A.** Infección latente: El ingreso de la bacteria se da a través de la vía respiratoria hasta los alveolos. Si la primera línea de defensa no elimina a la bacteria, se da posteriormente un reclutamiento de células inmunes para formar el granuloma. **B.** Enfermedad activa: diseminación de la micobacteria debido a la ruptura del granuloma al fallar en contener la infección[2].

.

1.4. Tratamiento

El tratamiento contra la TB activa se basa en la combinación de fármacos anti-TB, conocidos como de primera y de segunda línea, dependiendo del grado de resistencia bacteriana. Inicialmente el tratamiento requiere de un periodo de 6 a 12 meses en un régimen estricto de administración de los cuatro fármacos de primera línea (**Figura 1-4**)[30]. El tratamiento de primera línea consiste en la administración durante dos meses con INH, RIF y PZA. Ante la resistencia a alguno de estos tres primeros medicamentos el tratamiento se complementa con etambutol. Posteriormente, para evitar recaídas y consolidar el tratamiento se

administra INH y RIF durante cuatro meses más. El régimen descrito es el indicado tanto para la TB pulmonar como para la mayoría de las formas de TB extrapulmonar[31].

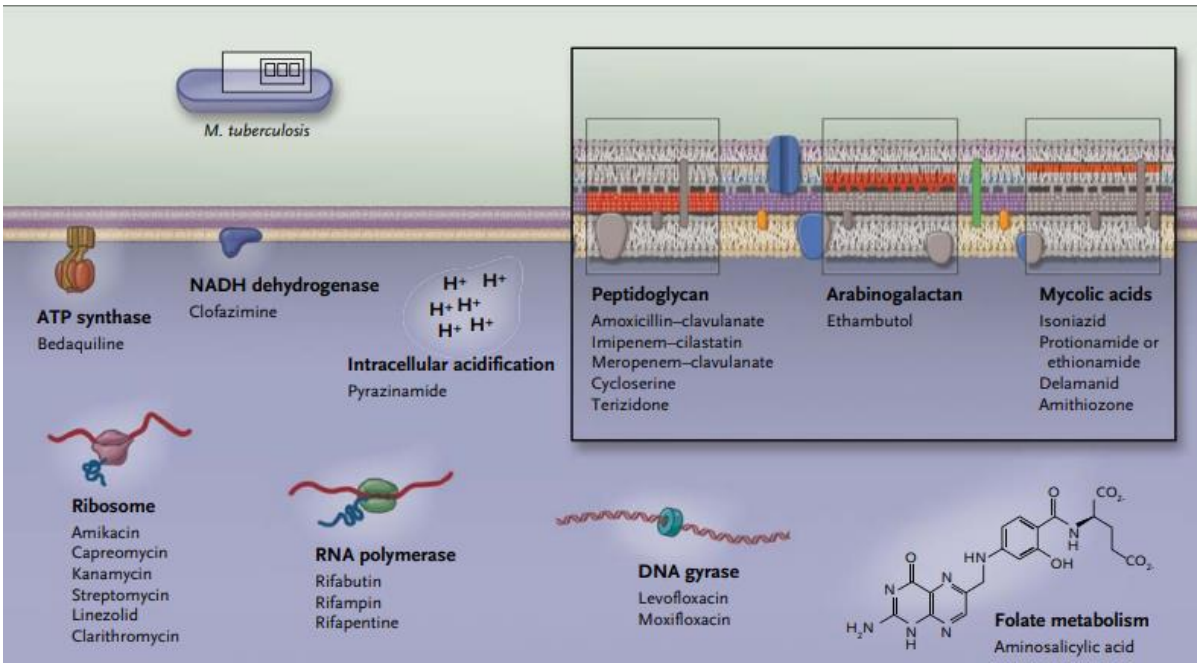


Figura 1-4. Blancos moleculares y mecanismos de acción de algunos de los actuales anti-TB en uso. Se muestran los blancos moleculares de fármacos de primera y segunda línea[32].

Sin embardo, ante cepas TB-MDR, es necesario acudir al uso de fármacos más costosos y tóxicos denominados de segunda línea, los que poseen menor efectividad comparados con los de primera línea. Los fármacos de segunda línea incluyen: amikacina, kanamicina y capreomicina y fluoroquinolonas como ofloxacina y moxifloxacina[33]. El tratamiento de TB-MDR indicado por la OMS consiste de una fluoroquinolona como la moxifloxacina y lavofloxacina, además de bedaquilina, linezolid y alguno de los siguientes agentes: clofazimina, cicloserina/terizidona en periodos de entre 18 y 24 meses, dependiendo de la evolución del paciente[31,34].

Por otra parte, para hacer frente a las cepas resistentes a los fármacos de primera línea, se han desarrollado compuestos como la bedaquilina y el delamanid. La bedaquilina funciona inhibiendo la ATP sintasa de *Mtb*, mientras que el delamanid inhibe la síntesis de ácidos

micólicos en la micobacteria[35]. En el año 2021, un total de 26 fármacos se encontraban en diferentes fases de ensayos clínicos. Entre ellos se hallan inhibidores de DprE1, que resulta fundamental para la síntesis de componentes como lipoarabinomanano y arabinogalactano, importantes para la pared de la micobateria[1].

1.5. Transporte a través de la membrana plasmática

La membrana plasmática es una barrera natural que impide el paso libre de solutos desde y hacia el exterior celular. Su carácter hidrofóbico hace que las moléculas polares tengan especial resistencia para atravesarla, una propiedad que hace que la membrana sea impermeable a los iones; por el contrario, las moléculas apolares poseen menor resistencia para atravesar la membrana. Sin embargo, es claro que dentro de la célula existe un control en la concentración de distintos cationes, aniones y solutos polares, considerando su naturaleza y baja capacidad de difusión a través de la membrana, por lo tanto, su transporte a través de la membrana plasmática es ejecutado mayoritariamente por proteínas embebidas en la membrana. La diferencia de concentración específica de un soluto entre el ambiente exterior y el interior da lugar a un gradiente con potencial químico y potencial eléctrico, en el caso de solutos cargados. Estas variables establecen la dirección que resulta favorable para el transporte del soluto. La proteína especializada en el transporte de un soluto lo transporta en una dirección u otra, por lo que este mecanismo de acción se denomina transporte pasivo o difusión facilitada (a favor del gradiente) o transporte activo (cuando sucede en contra del gradiente). La difusión facilitada no requiere energía, por el contrario, el transporte activo requiere de la transducción de energía almacenada en forma de ATP, la luz o el gradiente electroquímico de alguna otra especie[36].

Las proteínas implicadas en el transporte de solutos pueden clasificarse de forma general como transportadores y canales. Los canales no poseen gran afinidad por su soluto, y a

diferencia de los transportadores, no disponen de un sitio de unión y su estructura se asemeja más a un poro que atraviesa completamente a la membrana. La apertura del canal da paso a solutos a velocidades mayores que la de los transportadores. Los canales transportan agua, iones específicos y pequeñas moléculas hidrofílicas a favor de su gradiente electroquímico. La estructura de los canales les permite la difusión de solutos a altas velocidades, 10^7 y 10^8 iones/s[37].

Los transportadores se unen de forma específica a un soluto y mediante cambios conformacionales exponen los sitios de unión al exterior y al interior de la membrana. Los cambios conformacionales también están acompañados de cambios en la afinidad por el sustrato; es decir, aumentando la afinidad del sustrato con la región transportadora y disminuyendo la misma con la región hacia donde se transporta. Durante el proceso de transporte, los transportadores se unen a sus sustratos con una alta estéreo-especificidad. La velocidad de transporte mediada por trasportadores es notablemente menor que la de los canales, entre 10^0 y 10^4 iones/s.

Los transportadores se clasifican según la fuente de energía que utilizan: i) transportadores activos primarios si hidrolizan ATP o si aprovechan la energía de fotones, y ii) de tipo activo secundario (o cotransporte) si hacen uso de la energía almacenada en el gradiente electroquímico de otra especie[38].

1.6. ATPasas tipo P

Las adenosín trifosfatasas tipo P (ATPasas tipo P) son una extensa familia que catalizan el transporte activo selectivo de iones como H^+, Na^+, K^+; Ca^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} a través de las membranas celulares. Se dividen en subfamilias con diferentes especificidades de transporte, sin embargo, no se limitan al transporte exclusivo de metales alcalino/alcalinotérreos y pesados, pues también se incluyen fosfolípidos[17]. Son un conjunto de transportadores esenciales para casi todas las formas de vida, debido a su rol

fundamental en el mantenimiento de los gradientes adecuados de iones esenciales a través de la membrana celular[39].

Las ATPasas tipo P forman un intermediario covalente de aspartil-fosfato por autofosforilación de la bomba en un residuo aspártico conservado en la secuencia consenso DKTGTLT[40], siendo este un distintivo de este tipo de ATPasas. Las ATPasas tipo P poseen 5 dominios, funcional y estructuralmente diferenciados. Tres dominios citoplasmáticos: dominio actuador (**A**), dominio de unión a los nucleótidos (**N**), y de fosforilación (**P**); los otros son dominios transmembranales: dominios de transporte (**T**) y de soporte (**S**) (**Figura 1-5**). Durante el ciclo catalítico el ATP se une al dominio N que a su vez sirve como una proteína quinasa incorporada, que fosforila al dominio P, el dominio A es más parecido a una proteína fosfatasa intrínseca que desfosforila al dominio P durante el ciclo. Los iones transportados se unen al dominio T y se alternan entre la exposición al citoplasma y la región extracitoplasmática[41].

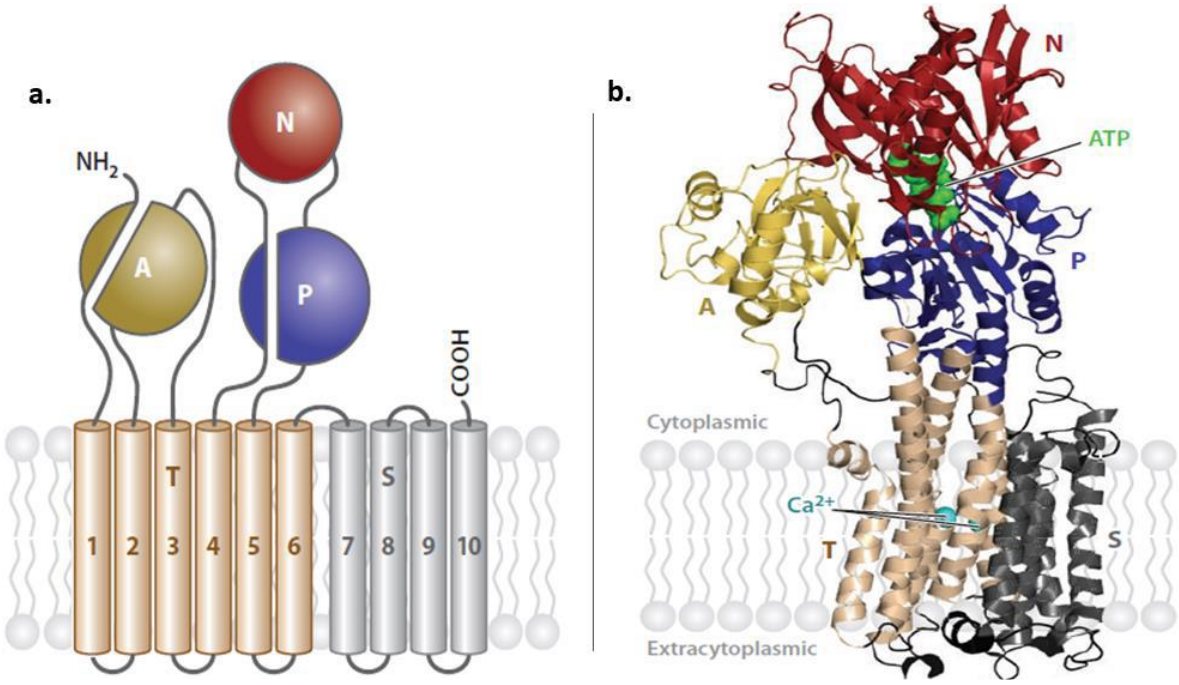


Figura 1-5. Representación de los dominios estructurales y funcionales típicos de las ATPasas tipo P. **A.** Vista esquemática general de la organización estructural de las ATPasas tipo P. **B.** Modelo de cintas de la estructura cristalina de Ca^{2+}-ATPasa SERCA1a[41].

Las ATPasas tipo P presentan dos estados conformacionales durante el proceso de transporte: **E1**, en donde los iones se hallan unidos al lado citoplasmático de la membrana para promover la autofosforilación y la generación de un nuevo estado conformacional conocido como **E2**, este estado con menor afinidad por los sustratos y que promueven la traslocación de iones a través de la membrana celular. Por lo tanto, la afinidad de la ATPasas tipo P por los sustratos dependerá en gran medida de la geometría del ion transportado y la relación de iones[41].

El ciclo de transporte de estas ATPasas funciona de acuerdo con el modelo mostrado en la **Figura 1-6**. En este caso particular, el Zn^{+2} ingresa a la ATPasa a través del embudo electronegativo (**1**) de traslocación de Zn desde el interior celular (color rojo). Luego de la unión del Zn^{2+} (circulo gris) al sitio de unión de iones intramembranales (**2**), Phe210 y Met187 ocluyen el embudo de entrada de iones (**3**), evitando el retorno de Zn^{2+} al espacio intracelular. Los reordenamientos de dominio en transición al estado E2P abren la vía extracelular (**4**), disminuyendo la afinidad por Zn^{2+} y mediando la liberación del ion (**5**), posiblemente estimulada por un residuo de lisina (**6**). La desfosforilación desencadena el cierre del dominio transmembrana. Luego de la desfosforilación las cadenas laterales se mueven a sus posiciones iniciales antes de que una transición E2 a E1 sea estimulada por la presencia de un nuevo ion Zn^{2+} intracelular[42].

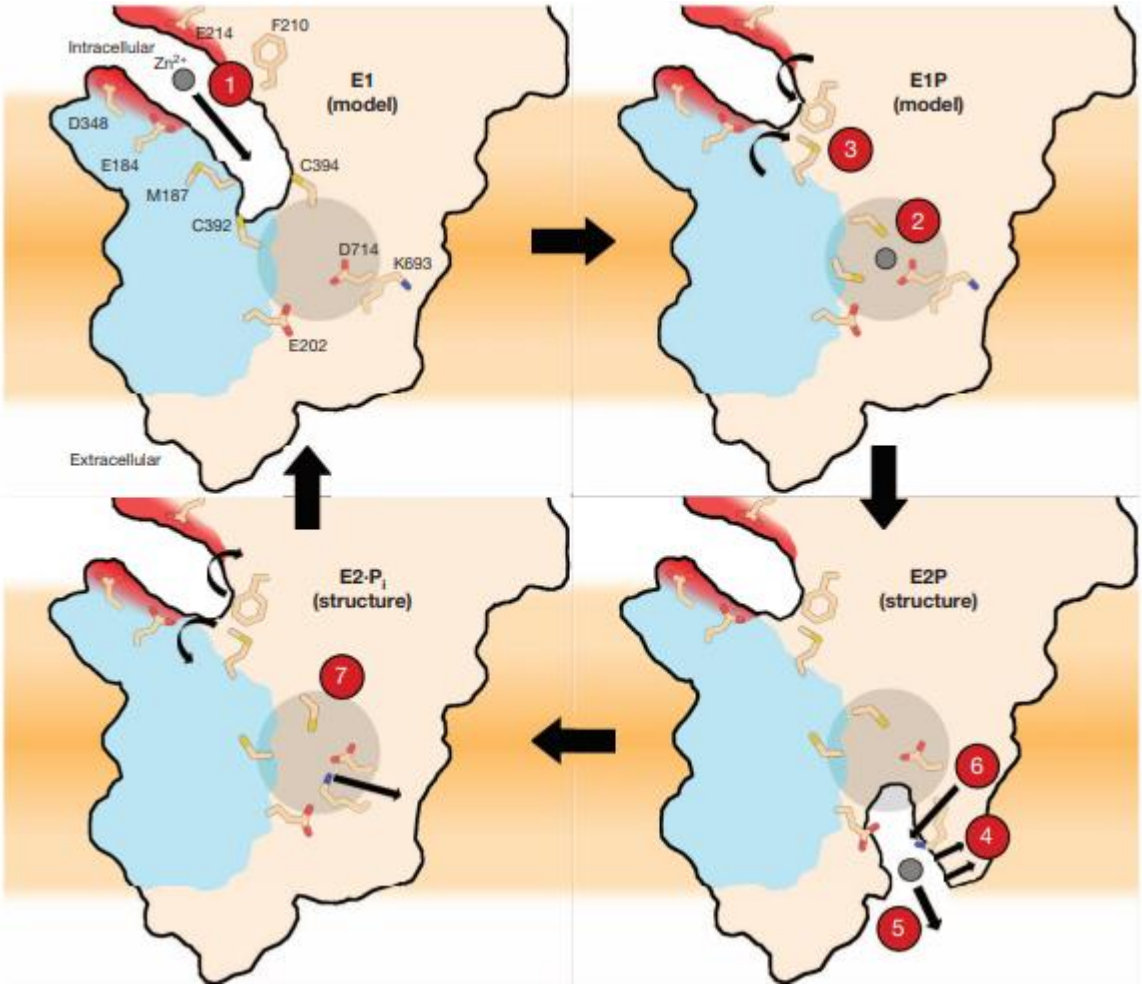


Figura 1-6. Mecanismo de transporte putativo de Zn^{2+} en una ATPasa tipo P[42].

1.7. Clasificación de ATPasas tipo P

Las ATPasas se clasifican filogenéticamente en cinco clases (**P1** a **P5**) dependiendo de su especificidad iónica y topología de la membrana, generando 10 subclases diferenciadas de acuerdo al sustrato transportado. Independiente de su clasificación, todas estas ATPasas comparten esta especificidad iónica y tienen en común la misma estructura base.

En la clase **P1**, se encuentran las que se consideran las ATPasas más antiguas, y a su vez está conformada por 2 subclases: la subclase **P1A** incluye la bomba KdpB de *E. coli*, con

solo 72 kDa y únicamente seis hélices transmembranales, resultando así en la ATPasa más pequeña[43]. La subclase **P1B** incluye las bombas involucradas en el transporte de iones de metales pesados (Cu^{+}, Zn^{2+} y Cd^{2+}), a las que se le asocian funciones de desintoxicación o metalación de proteínas[5].

En las ATPasas de la clase **P2** se hallan las bombas transportadoras de metales alcalino/alcalinotérreos. A su vez se dividen en tres subclases: P2A, P2B, P2C. En la subclase **P2A** se encuentra la Ca^{2+}-ATPasas del retículo sarco-endoplásmico, SERCA, la cual es la bomba más representativa de este grupo, y la que está presente en las células musculares de mamíferos. En la subclase **P2B** se halla PMCA (*plasma membrane Ca^{2+}-ATPase*), una enzima está involucrada en el restablecimiento del gradiente de concentración de iones Ca^{2+}, posterior a eventos de señalización en donde la concentración citosólica de este ion aumenta[41]. La subclase **P2C** incluye la primera ATPasa en ser descrita, la Na^{+}/K^{+}-ATPasa[44], que como se deduce de su nombre, es importante para mantener gradientes electroquímicos de los iones Na^{+} y K^{+} a través de la membrana plasmática.

La clase **P3**, se divide en la subclase **P3A**, o bombas H^{+}-ATPasas presentes en hongos, plantas y bacterias. Estas enzimas son importantes para la separación de carga a través de la membrana. También poseen una estructura similar a la de las Na^{+}/K^{+} y Ca^{2+}-ATPasas, lo que puede llevar a intuir que se trata de un mecanismo de transporte común conservado[45]. En la subclase **P3B** se encuentran las Mg^{2+}-ATPasas de las micobacterias.

En las ATPasas de la clase **P4** se encuentras ATPasas que transportan fosfolípidos. Su rol es fundamental en la formación y mantenimiento de la asimetría de la membrana celular, además de la formación de vesículas de transporte para la ruta de secreción y endocitosis[46].

En la última clase, la **P5**, se encuentran las ATPasas presentes en los genomas de todos los eucariotas (sin evidencias de presencia en procariotas), de las cuales no se conoce su especificidad o sustrato transportado.

1.8. ATPasas tipo P de *Mtb*

Se han identificado once ATPasas tipo P en el genoma de *Mtb*, las que se han clasificado según el tipo de ion transportado: i) transportadores de metales alcalino/alcalinotérreos como CtpE, CtpF, CtpH, CtpI; y ii) transportadores de metales pesados, que incluye a CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpG, CtpJ y CtpV. Estudios *in silico* han permitido estimar que estas proteínas son conservadas en diferentes especies del género *Mycobacterium*, ya que presentan una identidad de al menos un 98 % en sus secuencias. Este hecho puede contribuir al diseño de inhibidores con un amplio espectro entre las diferentes especies patogénicas de las micobacterias.

Durante el proceso de infección, *Mtb* se enfrenta a diferentes condiciones adversas y de estrés como el aumento en concentraciones tóxicas de metales pesados (Cu^{2+} y Zn^{2+}) y otros cationes metálicos como Ca^{2+}, condiciones que pueden afectar su viabilidad y capacidad para replicarse en los macrófagos. Se ha evidenciado que las ATPasas tipo P son importantes para enfrentar algunas de estas condiciones. Por ejemplo, CtpV está implicada en la resistencia frente a altas concentraciones de Cu^{2+} [9], CtpA está involucrada en la desintoxicación de Cu^{+} [47], mientras que a CtpG se le asigna un rol importante para el transporte de Cd^{2+} [48], y a CtpC se le ha asociado con la protección de la micobacteria frente a un aumento de la concentración de Zn^{2+} [5,49].

Previamente se describió la respuesta transcripcional de *Mtb* frente a distintas condiciones de estrés como estrés oxidativo, toxicidad e infección. De esta manera se conoce que las ATPasas se expresan de manera diferencial frente a las distintas condiciones de estrés asociadas a la infección (**Figura 1-7**)[12]. Resulta apreciable qué, entre los diferentes genes de las ATPasas, *ctpF* es el que muestra mayor activación frente a las diferentes condiciones de estrés evaluadas. Este hecho indica que las ATPasas tipo P de *Mtb*, especialmente CtpF, podrían tener un papel fundamental para la supervivencia de la micobacteria en el ambiente intrafagosomal.

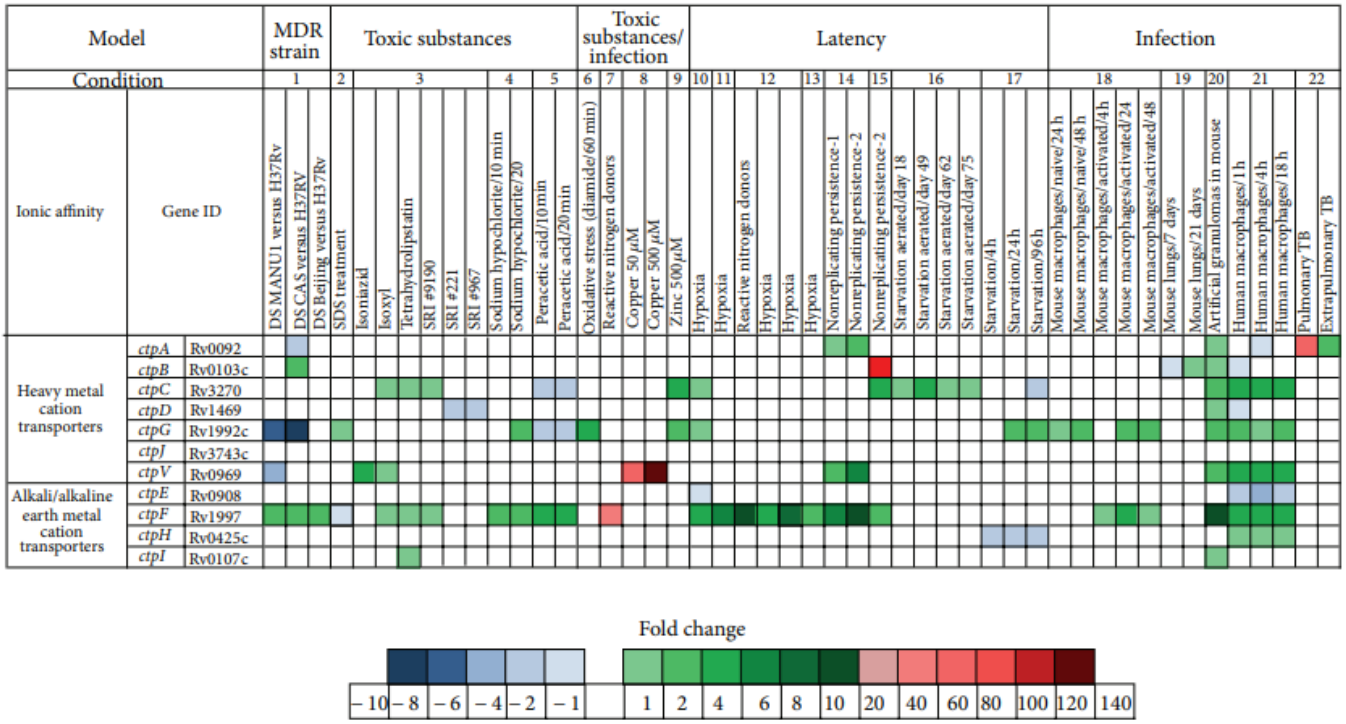


Figura 1-7. Esquema general de los comportamientos transcripcionales de las ATPasa tipo P de *Mtb* bajo condiciones de estrés. Dentro de las condiciones de estrés se encuentran exposición a sustancias tóxicas, latencia e infección[12].

1.9. CtpF

CtpF es una Ca^{2+}-ATPasa tipo P de *Mtb* de 905 aminoácidos. Mediante estudios *in silico*, se reportaron los motivos y perfiles de hidrofobicidad de CtpF, sugiriendo que se trata de una ATPasa transportadora de metales alcalino/alcalinotérreos (clase P2)[8]. Otros estudios, mostraron que la sobreexpresión heteróloga de CtpF de *Mtb* en la membrana de *M. smegmatis*, le confiere a las micobacterias tolerancia frente a concentraciones tóxicas de Ca^{2+} [50]. Otros estudios de acumulación de Ca^{2+} en células completas, mostraron que *M. smegmatis* sobreexpresando CtpF, acumula menos Ca^{2+} intracelular comparado con la cepa salvaje (WT) sin sobreexpresar la enzima (**Figura 1-8**).

Por otra parte, en un modelo de vesículas de membrana plasmática invertidas de micobacteria, en donde se favorece la exposición de los dominios citoplasmáticos al medio de reacción, se evidenció que las vesículas recombinantes (expresando CtpF) presentaban mayor acumulación respecto a la cepa WT (**Figura 1-9**). En ensayos de actividad Ca^{2+}-ATPasa sobre vesículas de membrana de *Mtb* WT y *MtbΔctpF* (cepa defectiva en el gen *ctpF*), la deleción de este gen mostró una actividad significativamente menor en las células mutantes respecto a la cepa WT (**Figura 1-10**). Este conjunto de resultados demuestran que CtpF es un transportador de Ca^{2+} asociado con el eflujo de calcio en las micobacterias y demuestran que CtpF es una ATPasa involucrada en la homeostasis de Ca^{2+} en la micobacteria[11].

La secuencia primaria de aminoácidos de SERCA es altamente conservada en eucariotas superiores y exhibe una alta similitud con organismos procariotas. La estructura primaria de CtpF (UniProt ID: P9WPS9) presenta una identidad del 34 % respecto a SERCA1a (UniProt ID: P04191)[11]. De las ATPasas tipo P presentes en *Mtb*, CtpF es la más cercana a SERCA, la Ca^{2+} mejor caracterizada y más estudiada entre las ATPasas tipo P2A de eucariotas superiores[8,15]. SERCA cumple un rol importante en mantener el gradiente de concentración de Ca^{2+} en la membrana plasmática de algunos organelos, además de estar involucrada en la conservación de los niveles de Ca^{2+} en el citosol para el funcionamiento de las vías de señalización y los procesos fisiológicos[51].

Diferentes estudios de cristalografía de rayos X ha permitido elucidar los distintos estados conformacionales de SERCA durante el ciclo catalítico, en donde por cada molécula de ATP hidrolizada se transportan dos iones de Ca^{2+} [51], estos iones se unen a los sitios denominados Ca-I y Ca-II que se encuentran en el dominio transmembranal de la ATPasa[52]. Esta ATPasa cuenta con los tres dominios citoplasmáticos propios de las ATPasas tipo P, además de contar con diez hélices en el dominio transmembranal (**TMDs**) **M1-M10**. Compuestos como la tapsigargina (TG), ácido ciclopiazónico (CPA) y la 2,5-di(t-butil)hidroquinona (BHQ) son inhibidores de SERCA1a, bloqueando el estado E2 del ciclo catalítico[53,54]. Entre los inhibidores antes mencionados se destaca CPA, que corresponde a un metabolito

secundario aislado de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, es una micotoxina implicada en la intoxicación por alimentos contaminados en vertebrados superiores. Estudios bioquímicos y estructurales han permitido establecer que CPA se sitúa en el canal de acceso del Ca^{2+} de SERCA1a, afectando el flujo intracelular y la homeostasis de Ca^{2+} [55].

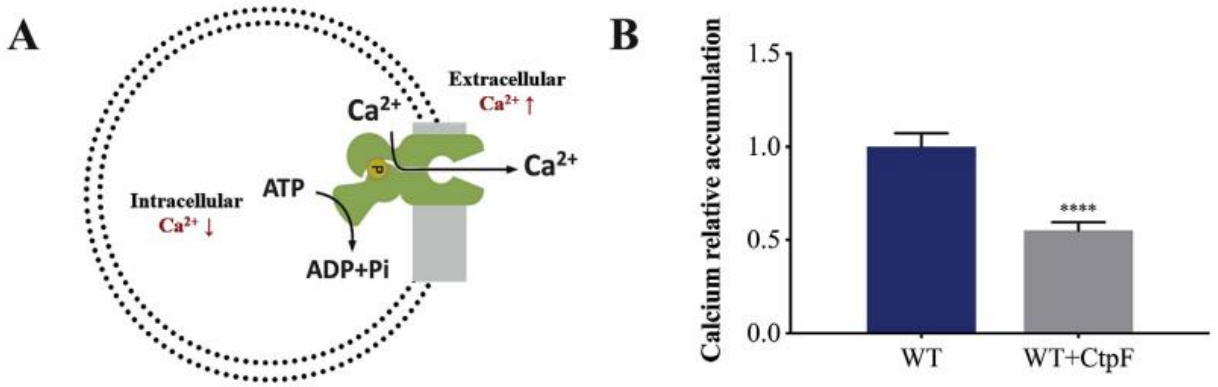


Figura 1-8. Ensayos de acumulación en *M. smegmatis* WT y recombinante (WT + CtpF). **A.** representación del modelo para el funcionamiento de CtpF, la ATPasa transporta Ca^{2+} contra el gradiente de concentración para mantener los niveles de este catión en el citosol de la bacteria. **B.** Acumulación de Ca^{2+} en *M. smegmatis* WT y recombinante (WT + CtpF)[11].

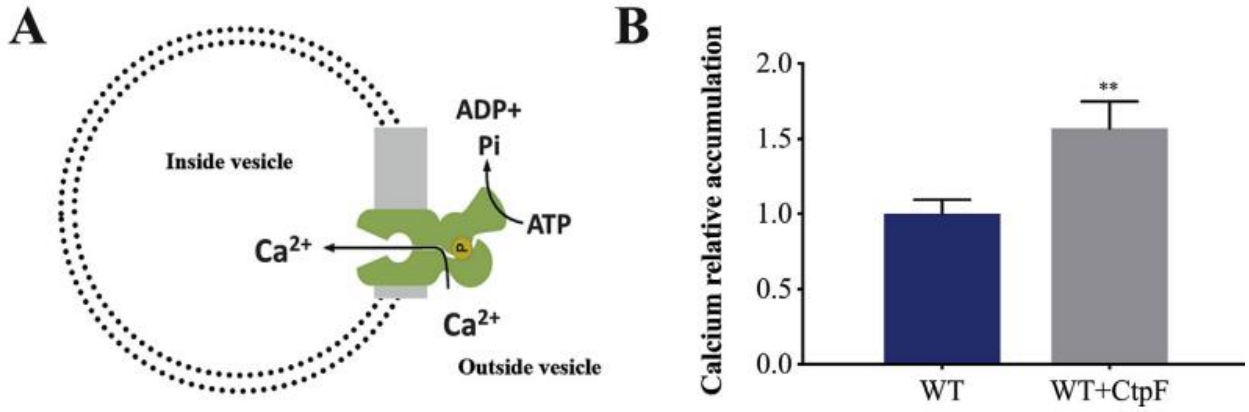


Figura 1-9. Acumulación de Ca^{2+} en vesículas de membrana de *M. smegmatis* WT y recombinante (WT + CtpF). A. representación del modelo de vesículas de membrana en donde se favorece la configuración invertida de los dominios citoplasmáticos de CtpF, de forma que quedan expuestos al medio de reacción. B. Acumulación de Ca^{2+} en vesícula de membrana de *M. smegmatis* WT y recombinantes (WT + CtpF)[11].

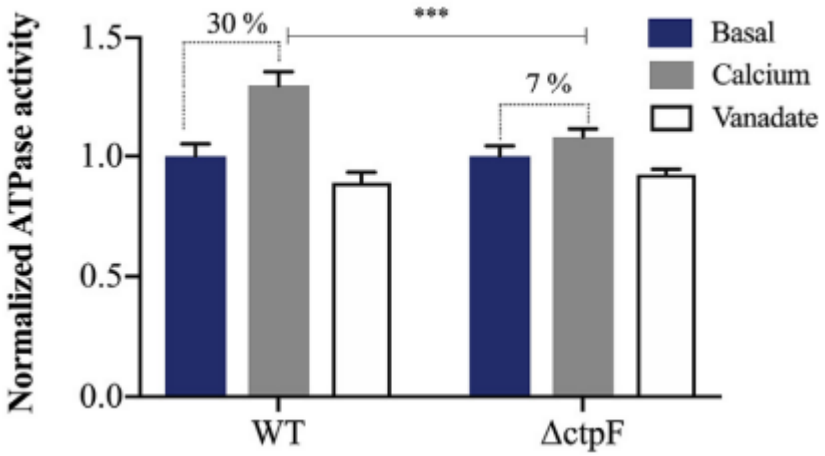


Figura 1-10. Actividad Ca^{2+}-ATPasa mediada por CtpF en vesículas de membrana de *Mtb* WT y *MtbΔctpF*. La actividad Ca^{2+}-ATPasa corresponde a la actividad resultante por la adición de Ca^{2+} al medio de reacción, la actividad del vanadato corresponde a la inhibición de la actividad Ca^{2+} por la adición de VO_4^{3-} al medio de reacción, un conocido inhibidor de ATPasas tipo P[11].

1.10. DosR

El regulón DosR está implicado en la entrada y mantenimiento de *Mtb* en estado de latencia. En esta forma biológica, *Mtb* permanece inactivo en un estado no replicativo expuesto a bajos niveles de oxígeno, pudiendo así permanecer durante años en el hospedero[56]. El regulón DosR (*Dormancy survival regulator*) consta de 50 genes que son inducidos por condiciones de hipoxia, NO y CO. El regulón de DosR está controlado por tres componentes, dos histidinquinasas (DosD y DosT), que tienen la capacidad de unirse a los gases NO y CO, y el regulador de latencia DosR[57]. El sistema regulador le permite a la micobacteria detectar los diferentes estímulos ambientales para inducir la expresión de los genes involucrados en la adaptación de la bacteria al entorno del huésped y al cambio del metabolismo aeróbico y anaeróbico[6]. El regulón DosR tiene genes involucrados en procesos biológicos como la obtención de energía desde fuentes alterativas de carbono (ácidos grasos), regulación génica, resistencia al estrés redox, sistemas de transporte, síntesis de proteínas, interacción hospedero-patógeno, entre muchos otros genes con función aun desconocida[7].

El gen *ctpF* de *Mtb* hace parte de los diferentes genes que son inducidos ante condiciones de hipoxia, y que son controlados por DosR, lo que sugiere una relación entre su función y la adaptación de la micobacteria a las condiciones anaeróbicas[13], por lo que aumenta el interés sobre CtpF como blanco en el diseño de nuevos anti-TB.

1.11. Estrategias para la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos

Anteriormente, la identificación de nuevos compuestos antimicrobianos dependía de hallazgos fortuitos por ensayo y error (**no racionales**). En algunos casos las apreciaciones experimentales permitían establecer de forma semicuantitativa el efecto que se derivaba de ciertas modificaciones introducidas en ciertos compuestos con actividad biológica[58]. Sin embargo, el panorama cambió desde los años 70 del siglo pasado, cuando avances en química medicinal y biología estructural permitieron el avance de métodos y enfoques **racionales** para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos[59]. Sin importar la naturaleza de la estrategia usada, el objetivo sigue siendo el mismo, encontrar moléculas con propiedades farmacocinéticas adecuadas, estructuras químicas o mecanismos de acción alternativos para el desarrollo de nuevos anti-TB más activos y menos tóxicos[60].

1.11.1. Estrategias no racionales

Son las estrategias de cribado en la que se busca evaluar un gran número de moléculas, con diversidad estructural de origen natural o bibliotecas combinatorias comercialmente disponibles seleccionadas al azar, efectuando múltiples ensayos biológicos[60]. Esta estrategia permite la identificación de moléculas líderes que presenten actividad biológica, o que puedan optimizarse para mejorar sus propiedades farmacocinéticas. Los compuestos lideres obtenidos usualmente cumplen con algunas propiedades farmacológicas que

permiten garantizar su biodisponibilidad. Esta a su vez está definida por las reglas de Lipinski: **i**) peso molecular (≤ 500 g/mol); **ii**) lipofilicidad en función del coeficiente de reparto octanol-agua (Log P ≤ 5); **iii**) número de donadores de enlaces de hidrógeno (≤ 5); y **iv**) aceptores de enlaces de hidrógeno (≤ 10)[61,62]. Aunque estas reglas han permitido que los científicos sean más conscientes de la relación entre las propiedades físicas y ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad), es necesario tener consideraciones adicionales a los límites propuestos por modelos basados en lipofilia, para obtener una comprensión más profunda de las interacciones moleculares, con el objetivo de explorar nuevas moléculas con potencial uso como fármacos[63]. Al hacer uso estricto de las reglas de Lipinski es posible que se rechacen moléculas exitosas, muestra de esto son los compuestos naturales, que aun con altos pesos moleculares pueden mantener una baja hidrofobicidad y un potencial de donación de enlaces de hidrógeno intermoleculares[63,64].

La estrategia no racional no permite conocer la relación entra la estructura química de las moléculas y su actividad, además, la disposición de grandes recursos es crítica para su implementación, y el porcentaje de casos de éxito es bajo, un caso de éxito por cada 10.000 compuestos evaluados[65]. Asociado a esta estrategia se encuentra el cribado de alto rendimiento (*HTS*, *High Throughput Screening*), una herramienta usada desde los años 90 para acelerar ensayos masivos, robotizados, a partir de bibliotecas de compuestos previamente seleccionadas, de modo que se asegure la diversidad de sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, permitiendo de esta manera la identificación de compuestos líderes. El HTS involucra plataformas de operación automatizada, modelos de cribado específico *in vitro*, grandes bibliotecas de compuestos, sistemas de análisis y procesamiento de datos[66].

1.11.2. Estrategias racionales.

En la búsqueda de nuevos fármacos las estrategias racionales tienen presente la información bioquímica, molecular y estructural disponible del receptor (diana molecular) como de los ligandos (posibles moléculas activas), lo que permite aumentar la probabilidad de éxito. Los métodos computacionales cumplen un rol fundamental en estas estrategias, toda vez que aprovechan toda la información química y biológica que se disponga sobre la conformación bioactiva de los ligandos o los residuos del sitio activo del receptor, con el fin de identificar y optimizar nuevos compuestos. Las estrategias racionales ofrecen la posibilidad de encontrar compuestos líderes en un menor tiempo, además de requerir menos recursos para su implementación en la búsqueda de nuevos fármacos[67].

El diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC) permite plantear una estrategia que depende de la calidad del receptor y las estructuras de los ligandos obtenidos experimentalmente. En esta estrategia es necesario considerar las posibles limitaciones asociadas al método y demostrar mediante ensayos biológicos la posible actividad de los candidatos[58]. El DiFAC es una colección de distintos métodos que incluyen quimioinformática, bioinformática, modelado molecular, química teórica, etc. El DiFAC se divide en dos grupos, diseño de fármacos basado en la estructura del ligando (DFBL) y el diseño de fármacos basado en la estructura del receptor (DFBE)[68].

1.11.2.1. Diseño basado en la estructura del ligando

El DFBL abarca todos los métodos que diseñan análogos de estructuras químicas de ligandos cuando no se dispone de la estructura tridimensional del receptor. Las moléculas que muestran una relación estructural deberían demostrar actividades biológicas similares; así el compuesto principal se puede optimizar comparando la actividad biológica

estimada con la actividad descrita para compuestos que muestran propiedades estereoquímicas similares. En las estrategias DFBL comúnmente utilizadas para identificar nuevos compuestos anti-TB se encuentran los métodos de Relaciones Cuantitativas Estructura - Actividad (QSAR), basadas en el modelamiento molecular. Para ellos se tiene presente la geometría molecular, que a su vez es responsable de sus propiedades físicas, químicas y especialmente biológicas[69]. La aproximación QSAR permite calcular algunas propiedades moleculares, denominadas descriptores, los que describen una propiedad global o local de la molécula. Mediante la definición suministrada por los descriptores que se relacionan con su actividad biológica, se pueden diseñar moléculas con una actividad biológica mejorada[70].

El modelado basado en farmacóforo también se halla dentro de DFBL. Según la IUPAC, un farmacóforo es "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". Así pues, en un modelo farmacofórico se identifica un conjunto de características estructurales de ligandos que se relacionan con su reconocimiento en los sitios de unión a receptores y, de esta manera con su actividad biológica[71]. Los modelos de los farmacóforos se pueden obtener mediante la superposición de diferentes moléculas bioactivas, en donde se generen alineamientos y así encontrar características químicas comunes importantes para su unión al receptor y, por lo tanto, importantes para su bioactividad. También es posible modelar los farmacóforos considerando el sitio activo o sitio de unión a un receptor. El análisis tiene en cuenta las características químicas complementarias del sitio activo y sus relaciones espaciales.

Al disponer de un farmacóforo, se pueden efectuar búsquedas en las bases de datos o bibliotecas de moléculas sintéticas comercialmente disponibles o de productos naturales, que permitan identificar o diseñar compuestos activos con las mismas características farmacofóricas, y de esta manera acercarse más a la comprensión de la relación estructura-actividad[15,67].

1.11.2.2. Diseño basado en la estructura del receptor

El termino receptor hace referencia al cualquier bio-macromolécula, tales como proteínas, ADN, ARN, entre otros. Al disponer de la estructura tridimensional de un receptor o diana molecular, esta estrategia permite evaluar la complementariedad y afinidad por un ligando, además de los posibles modos de unión del ligando en el sitio de unión del receptor que puedan generar o bloquear una respuesta biológica[72]. Los análisis derivados de estos métodos permiten identificar los mejores candidatos a ser evaluados en ensayos experimentales, lo cual reduce significativamente el proceso de identificar y optimizar un compuesto líder.

1.11.2.3. Acoplamiento molecular.

El acoplamiento molecular usa diferentes algoritmos para predecir la interacción entre dos moléculas, usualmente una pequeña (ligando) y una macromolécula (receptor) como un proteína, de forma que se pueda predecir el modo de unión más probable del ligando frente al receptor[73]. El acoplamiento molecular permite obtener una aproximación al modo de unión y la afinidad de interacción de un receptor y moléculas de una biblioteca de moléculas. El acoplamiento molecular permite predecir las interacciones del complejo receptor-ligando mediante el uso de: i) algoritmos de muestreo que consiste en una búsqueda conformacional del ligando, tales como el algoritmo genético y búsqueda de Monte Carlo, que se encargan de buscar las conformaciones y orientaciones más favorables para el ligando, y ii) funciones de evaluación basadas en cálculos de campos de fuerza o en funciones empíricas. Este método permite evaluar y seleccionar las

conformaciones y modos de unión de menor energía para el ligando, que a su vez probablemente representan la conformación biológicamente correcta[74].

2. Justificación

La TB persiste como un problema de salud pública a nivel mundial, lo que es evidenciado por el gran número de muertes que causa (1,5 millones en 2020) y la aparición de cepas TB-MDR y TB-XDR. Por otra parte, la resistencia antibiótica frente a los fármacos convencionales representa un motivo de constante preocupación, lo que obliga a la búsqueda de dianas alternativas y nuevos compuestos con potencial uso como anti-TB.

Un mejor entendimiento de los diferentes mecanismos que utiliza *Mtb* para superar diferentes condiciones de estrés como hipoxia, inanición, sustancias reactivas de nitrógeno y altas concentraciones de cationes metálicos, entre otros, es fundamental para el descubrimiento de nuevas dianas anti-TB. En este sentido, el uso de proteínas de membrana como dianas para el diseño de compuestos anti-TB es ventajoso, toda vez que los posibles fármacos que inhiban su actividad no tendrían que ser internalizados por la célula.

El presente proyecto utiliza a CtpF, una ATPasa tipo P de *Mtb*, como diana para la búsqueda de compuestos anti-TB por ser una proteína de membrana, su importancia como mecanismo de desintoxicación contra concentraciones elevadas de Ca^{2+} intracelular, su sobreexpresión bajo condiciones de hipoxia y estrés oxidativo, su protagonismo en la persistencia, además de su posible rol en la virulencia y sobrevivencia del bacilo tuberculoso.

Considerando lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se planteó una estrategia racional para encontrar compuestos activos, mediante el uso de diferentes métodos quimioinformáticos basados en la estructura de la ATPasa tipo P CtpF de *Mtb* y partiendo

de resultados previos de nuestro grupo de investigación. La actividad de los candidatos seleccionados se evaluó *in vitro*.

3. Hipótesis experimental

Mtb se enfrenta a diferentes condiciones adversas en el ambiente intrafagosomal, por lo que ha desarrollado diferentes estrategias que le permiten sobrevivir a las condiciones de estrés dentro del macrófago. Nuestros estudios recientes han mostrado que la proteína CtpF, además de contribuir al balance de un ion tan sensible como el Ca^{2+} para el funcionamiento celular, también está relacionada con los mecanismos de defensa de la micobacteria, pues el gen *ctpF* se sobreexpresa bajo diferentes condiciones de estrés que simulan el ambiente intrafagosomal, y es clave para la virulencia del bacilo tuberculoso.

Utilizando a CtpF como diana, nuestro grupo de investigación ha realizado estudios para encontrar nuevos compuestos que inhiben la actividad de CtpF y comprometen la viabilidad del bacilo tuberculoso. Por tanto, y partiendo de resultados previos, mediante la aplicación de métodos quimioinformáticos como dinámica molecular, modelado de farmacóforo, acoplamiento molecular y cribado virtual, se espera encontrar compuestos con una mejor inhibición de la actividad de CtpF, reflejada en una menor concentración mínima inhibitoria frente a *Mtb*, y una menor actividad citotóxica y hemolítica.

4. Objetivos

Objetivo general

Identificar mediante métodos del diseño de fármacos basados en el ligando y en la estructura, complementados con ensayos de actividad *in vitro*, nuevos inhibidores del transportador de membranas CtpF de *M. tuberculosis.*

Objetivos específicos

1. Definir las características farmacofóricas de unión a CtpF, a partir de los modos de unión obtenidos mediante dinámica molecular de moléculas experimentales.
2. Identificar moléculas potencialmente activas contra CtpF mediante un protocolo de consenso a través del uso del cribado virtual con diferentes métodos quimioinformáticos.
3. Evaluar el efecto de los compuestos seleccionados en la actividad Ca^{2+} ATPasa mediada por CtpF en la membrana plasmática.
4. Comparar el efecto en la viabilidad celular de *Mtb*, la actividad hemolítica y citotoxicidad de los compuestos seleccionados frente a los compuestos base control.

5. Metodología

Para alcanzar los objetivos propuestos, en el presente trabajo se empleó una estrategia combinada entre estudios computacionales y pruebas biológicas. Inicialmente se identificaron un grupo de compuestos, mediante una estrategia racional, que posteriormente se sometieron a una serie de ensayos *in vitro* que incluyen: CMI, ensayos de actividad ATPasa, actividad citotóxica y hemolítica (**Figura 5-1**).

Teniendo en cuenta que no se dispone de una estructura 3D de ninguna de las ATPasas tipo P de *Mtb*, mediante métodos experimentales como cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear, en un trabajo previo de doctorado de nuestro grupo de investigación, se generó y validó un modelo de estructura 3D de CtpF obtenido por homología[15]. En ese estudio, se estableció que CPA era capaz de inhibir el crecimiento de *Mtb*, y además inhibe la actividad Ca^{2+} ATPasa de CtpF. Utilizando esos resultados, también se hizo un cribado virtual basado en farmacóforo que permitió identificar nuevos inhibidores del crecimiento de *Mtb* y su actividad Ca^{2+} mediada por CtpF.

Para el presente estudio se tomaron como punto de partida CPA y los tres compuestos que mostraron mejores resultados *in vitro* en el estudio anterior: ZINC55090623, ZINC63908257 y ZINC45605493, denominados desde ahora como ligando A, B y C respectivamente.

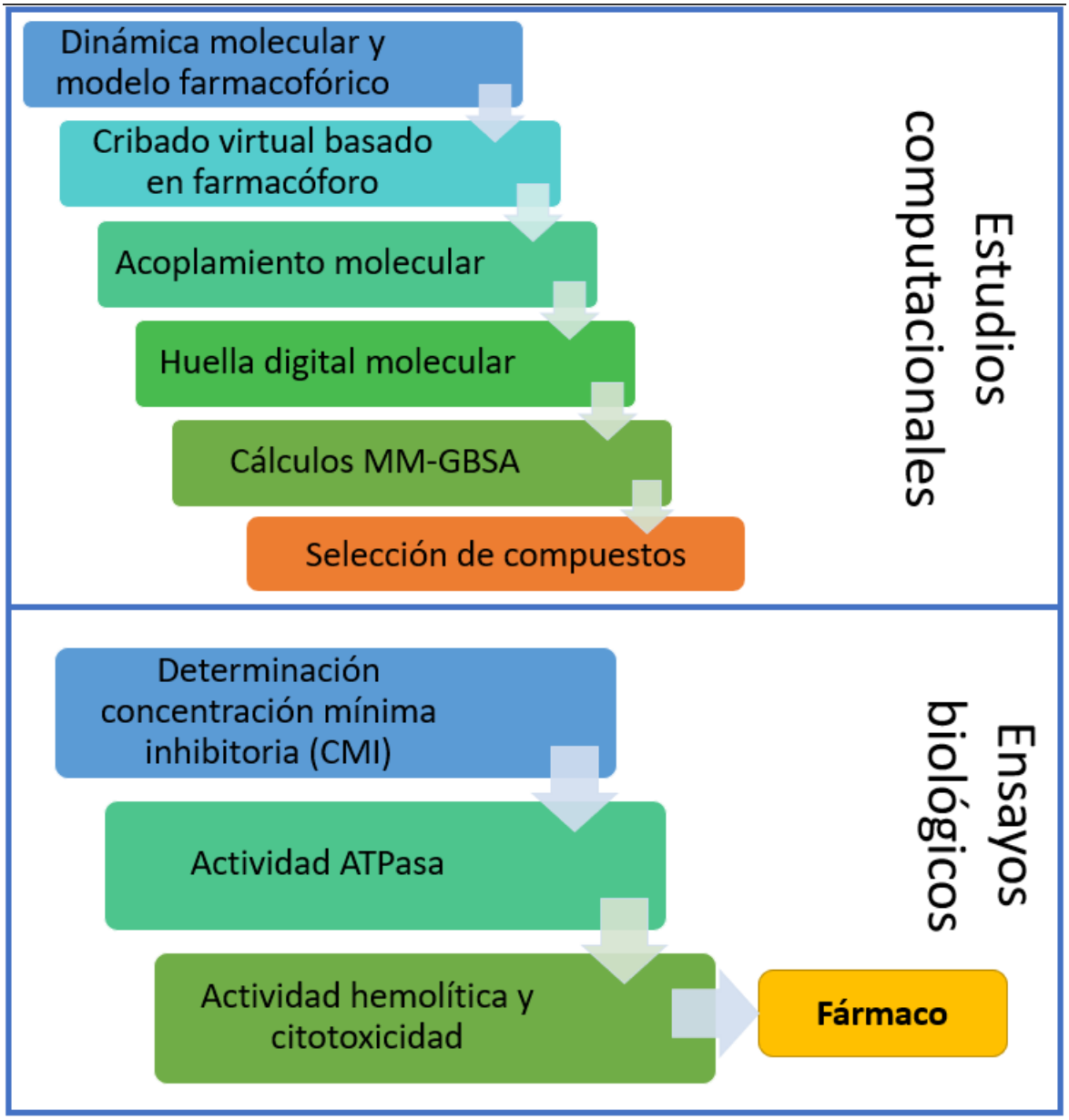


Figura 5-1. Representación esquemática de las etapas que conforman la metodología utilizada en el presente estudio para la búsqueda de nuevos inhibidores del crecimiento de *Mtb* y la actividad de CtpF.

Como primer paso, se efectuaron simulaciones de dinámica molecular, mediante las que se identificaron las interacciones proteína-ligando (P-L) que se mantuvieron durante mayor tiempo en la simulación para cada complejo. De cada molécula se identificaron los grupos responsables de estas interacciones, para así construir cuatro farmacóforos derivados de

cada una de las moléculas iniciales. Estos farmacóforos se exportaron a la interfaz web de ZINCPharmer, donde se identificaron moléculas que se adaptaron al modelo propuesto en cada caso, para posteriormente efectuar un refinamiento del modo de unión estas moléculas en el sitio de unión a CtpF. Adicionalmente estas moléculas se sometieron a un *rescoring* basado en cálculos de energía MM-GBSA, con el objetivo de estimar con mayor precisión la afinidad relativa de las moléculas de cada una de las listas por CtpF.

Para los ensayos biológicos, se consideraron aquellos compuestos que mostraron energías libres de unión menores que la de los compuestos de referencia, y que además mostraran modos de unión similares respecto esas mismas moléculas de referencia. Posteriormente, estos compuestos se sometieron a ensayos *in vitro*, en donde se evaluó su capacidad de inhibir el crecimiento de la micobacteria y la actividad Ca^{2+}-ATPasa mediada por CtpF. Además, se evaluó su seguridad mediante ensayos de actividad citotóxica y hemolítica. A continuación, se describen detalladamente los métodos y materiales.

5.1. Estudios computacionales

Para el presente trabajo, se partió de la estructura de CtpF modelada mediante homología obtenida en un estudio anterior en nuestro grupo de investigación, en donde la estructura de CtpF (UniprotID: P9WPS9) se obtuvo utilizando como plantilla la estructura de la Ca^{2+}-ATPasa SERCA1a de conejo en la conformación E2 en complejo con el inhibidor ácido ciclopiazónico (CPA) en el sitio de unión (código PDB: 3FGO)[15].

5.1.1. Dinámica molecular (DM)

Se efectuaron simulaciones de DM para los complejos CtpF – CPA y los ligandos A, B y C identificados en el estudio previo de doctorado de nuestro grupo de investigación, que además de CPA, mostraron mejores resultados en los ensayos *in vitro*. Las simulaciones se

efectuaron haciendo uso del módulo Desmond de Schrodinger[75], se empleó el campo de fuerza OPLS_2005 a 300 K y 1 atm. El modelo se CtpF se insertó en un modelo de membrana 1-palmitol-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC) solvatado en una caja ortorrómbica. Se agregaron iones de sodio y cloruro de forma aleatoria hasta lograr la neutralidad del sistema, manteniendo un margen de distancia de 10 Å entre la esquina de la caja del complejo P-L. Se efectuó una minimización sobre el sistema y luego se equilibró con los parámetros por defecto del software, que constan de seis etapas para el ensamble NTP. Las simulaciones de cada complejo tuvieron una duración de 50 ns, se empleó el termostato de Nosé-Hoover y presión constante a 1 atm, y el baróstato de Martyna-Tobias-Klein, con tiempos de relajación de 1 y 2 ps respectivamente.

Para el análisis de las trayectorias y las interacciones P-L más importantes en cada caso, se empleó el visualizador del software maestro.

5.1.2. Cribado virtual basado en farmacóforo

Los resultados de DM de cada complejo permitieron conocer la trayectoria de los ligandos durante la simulación, los cambios conformacionales y valores de RMSD (*root mean square deviation)* de los ligandos y la proteína CtpF, además se identificaron las interacciones P-L más importantes para cada complejo. Se propuso como punto de corte, aquellas interacciones que se mantuvieron al menos un 20 % durante la simulación de cada complejo, de esta forma se identificaron los grupos que eran responsables de estas interacciones en cada molécula (donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, grupos hidrofóbicos y aromáticos). Para la selección de la pose de cada ligando que se usó para modelar los farmacóforos se consideraron los *frames* en donde se mostraron aquellas interacciones significativas identificadas en los diagramas de interacciones P-L de cada complejo.

La estructura de la conformación de cada ligando se exportó a la interfaz en línea ZINCPharmer (http://zincpharmer.csb.pitt.edu)[76], con base en el análisis previo de las interacciones P-L obtenidas en la DM de cada complejo, se definieron las características farmacofóricas de cada modelo derivado de cada uno de los ligandos de referencia (CPA, Ligando A, B y C). En la interfaz ZINCPharmer se seleccionó la base de datos de ZINC de compuestos disponibles comercialmente; en los parámetros de búsqueda se estableció 1,0 Å como máximo RMSD entre las posiciones de los átomos del ligando de referencia y los ligandos de la base de datos, adicionalmente se emplearon filtros *drug-like*[77,78]. Finalmente, los candidatos de cada una de las cuatro listas resultantes se descargaron como un archivo en formato sdf.

5.1.3. Preparación de ligandos, acoplamiento molecular y *rescoring*

Para la preparación los ligandos resultantes de cada una de las cuatro listas generadas, se empleó el módulo LigPrep de Schrodinger[79], se generaron estados de ionización a pH 7,0 ± 2,0 empleando Epik. Con el módulo Macromodel, se usó el campo de fuerza OPLS_2005 para generar minimizaciones de energía para cada ligando. Además, con QikProp se calcularon las propiedades *drug-like*, que incluyen peso molecular, Log del coeficiente de partición octanol-agua, número de enlaces rotables, número de aceptores y donadores de enlaces de hidrógeno.

Sobre cada una de las cuatro listas resultantes de cada farmacóforo, se efectuó por separado un cribado basado en acoplamiento molecular sobre el sitio de unión de CPA y los ligandos A, B y C al modelo de CtpF resultante de las simulaciones de dinámica molecular. En el cribado virtual basado en acoplamiento molecular se usó el módulo Glide de Schrodinger, en donde se empleó consecutivamente los métodos de precisión estándar (SP) y Glide precisión extra (XP), con el fin de refinar los cálculos[80,81]. La rejilla del

acoplamiento se generó usando como centro el ligando de referencia en cada caso en el sitio de unión a CtpF resultante de la dinámica molecular, el tamaño de la rejilla corresponde al establecido por el software para la búsqueda de ligandos de tamaño similar a la molécula de referencia en cada caso.

Los compuestos resultantes del cribado virtual basado en el acoplamiento molecular fueron sometidos a un *rescoring*, mediante el uso de cálculos de mecánica molecular basados en Área de Superficie Generalizada de Born (MM-GBSA, siglas en inglés), con el fin de predecir de forma más precisa la energía libre de unión relativas de los ligandos a CtpF. Para estos cálculos se usó el módulo prime de Schrodinger, empleando el modelo de solvatación VSGB-2.0[82].

5.1.4. Huella digital molecular de interacción P-L

Teniendo como base el ligando de referencia del que se obtuvo cada lista, se efectuaron cálculos de huella digital molecular de interacción P-L. Por separado, para cada lista se empleó el coeficiente de Tanimoto como métrica de similitud de unión de las moléculas en evaluación respecto al ligando de referencia en cada caso.

Finalmente, con base en los resultados de las evaluaciones de energía MM-GBSA, coeficiente de Tanimoto, propiedades *drug-like*, diversidad estructural, disponibilidad comercial y costo, se seleccionaron para su adquisición once compuestos obtenidos de los cuatro farmacóforos propuestos, derivados a su vez de las cuatro moléculas iniciales (CPA, ligando A, B y C).

5.2. Ensayos biológicos

5.2.1. Cepas de micobacterias y condiciones de cultivo

Para los ensayos de actividad antimicobacteriana con células completas, se utilizó la cepa no virulenta de *Mtb*, H37Ra.

Se utilizaron micobacterias previamente almacenadas a -80 °C en stocks a una concentración OD_{600} = 0,85 (correspondiente a una concentración aproximada de 5 x 10^8 UFC/mL) preparados en buffer fosfato salino (PBS) y glicerol al 10 %. Las bacterias se descongelaron a 37 °C durante 10 min, y se diluyeron en medio Middlebrook 7H9 suplementado con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) al 10 % hasta la OD_{600} deseada. Para los ensayos de viabilidad se empleó una OD_{600} = 0,4 correspondiente a ~ 3.5 x 10^5 UFC/mL, mientras que para el aislamiento de vesículas de membrana se partió de una OD_{600} = 0,6 correspondiente a ~2,5 x10^7 UFC/mL.

Los ensayos de actividad ATPasa se efectuaron utilizando vesículas de membrana obtenidas a partir de la cepa de *Mtb* H37Ra (atenuada) y su respectivo mutante en el gen *ctpF* (*MtbΔctpF*), construido previamente en nuestro grupo de investigación, por la Ph. D. Milena Maya, como parte de su tesis doctoral[11].

5.2.2. Compuestos seleccionados

Los once compuestos seleccionados *in silico* fueron adquiridos comercialmente en la empresa Molport. Según los proveedores la pureza de los compuestos se determinó mediante HPLC-MS con los siguientes resultados: ZINC15890389 (90,00 %, ChemDiv), ZINC13955524 (90,00 % Vitas-M laboratory), ZINC12547355 (90 %, Enamine), ZINC89959094 (91,00 %, Enamine), ZINC40156945 (100 %, Enamine), ZINC22790105 (100

%, Enamine), ZINC02646421 (95,49 %, Enamine), ZINC04030361 (90,00 %, ChemDiv), ZINC57418826 (95,77 %, Enamine), ZINC02967970 (90,00 %, Life Chemicals) y ZINC09731847 (90,00 %, ChemDiv).

5.2.3. Ensayo de actividad antimicobacteriana de los compuestos seleccionados

La actividad antimicobacteriana de los compuestos seleccionados en el cribado virtual basado en farmacóforo, y adquiridos comercialmente, se evaluó mediante la determinación de la CMI en la cepa *Mtb* H37Ra. Los compuestos adquiridos se disolvieron en DMSO, y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Para determinar la CMI, los compuestos se diluyeron en medio de cultivo Middlebrook 7H9 – 10 % de OADC a la concentración deseada para el ensayo.

Los ensayos de susceptibilidad se llevaron a cabo según las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standard Institute*[83]. En placas de *microtiter* (96 pocillos) se mezclaron 100 µL de cultivo (aproximadamente 3,5 x 10^5 UFC, en medio 7H9 OADC y tiloxapol 0,05 % a pH 7,2) con 100 µL de diluciones de los compuestos a probar en concentraciones seriadas a la mitad (entre 1,5-200 µg/mL como concentración final). Las placas se incubaron a 37 °C con agitación (80 rpm) durante 6 días. Después se añadieron 30 µL de una solución de resazurina 0,01 % a cada pocillo, y los cultivos se continuaron incubando durante 48 h a 37 °C. La viabilidad celular se evaluó colorimétricamente, estimando el cambio de la resazurina de azul a rosa/fucsia, lo que indica crecimiento celular[84,85].

El valor de CMI se determinó como la concentración previa a la cual se produce un cambio de coloración en el ensayo, donde se estima se inhibe más del 99 % del crecimiento celular. Durante el experimento se emplearon los siguientes controles: cultivo sin bacteria (control de medio), cultivo sin tratamiento (control negativo), y cultivo en presencia de un anti-TB convencional (RIF 0,125 µg/mL, control positivo). Además, se empleó un control con DMSO

1 %, con el objetivo de asegurar que la inhibición del crecimiento no sea causada por el solvente. El ensayo descrito anteriormente se realizó por triplicado en dos experimentos independientes para cada compuesto.

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

El efecto de los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847 sobre la actividad ATPasa estimulada por Ca^{2+} se evaluó en vesículas de membrana invertida obtenidas a partir de cepas de *Mtb* H37Ra WT (*Mtb* WT) y la cepa *MtbΔctpF*.

Las vesículas de membrana plasmática de las micobacterias se aislaron a partir de un cultivo bacteriano masivo en medio Middlebrook 7H9 + OADC crecido hasta una OD_{600} = 0,6. Para el aislamiento de membranas se utilizó el protocolo de lisis mecánica y centrifugación diferencial, con algunas modificaciones estandarizadas previamente por nuestro grupo de investigación[86,87]. Todo el procedimiento se realizó a una temperatura de 4 °C.

La conformación de membrana invertida se aseguró incluyendo el detergente Brij-58 en el buffer de reacción. Brij-58 es un polioxietil éter cuya terminación polar posee un tamaño que induce la apertura e inversión de vesículas de membrana, mediante el acoplamiento de bicapas lipídicas. De esta forma los dominios de fosforilación, actuador y de unión a nucleótido de CtpF quedan expuestos al exterior de la vesícula, lo que permite controlar el funcionamiento de la enzima mediante el consumo de ATP presente en el buffer de reacción[88]. La concentración de la proteína se calculó mediante el método de Bradford-Zor-Selinger, usando la fracción V de albúmina de suero bovino como estándar[89].

La actividad ATPasa en las vesículas de membrana plasmática se determinó cuantificando el fosfato inorgánico (Pi) liberado durante la reacción enzimática, mediante el método de Fiske-Subbarow con citrato de bismuto[90,91,92]. Brevemente, la reacción enzimática de 50 µL se llevó a cabo a pH 7,4 en medio de incubación (10 mM MOPS pH 7,4, 3,0 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) con el fin de estimular la actividad ATPasa Ca^{2+} dependiente. Se utilizó el software Maxchelator para calcular el Ca^{2+} libre a partir de la concentración de Ca^{2+} total y de EGTA[93,94].

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

Para evaluar el efecto de la concentración de los compuestos seleccionados sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa, la reacción se suplementó individualmente con los compuestos a concentración final: 0,1 µM, 1,0 µM, 10 µM, 40 µM, 80 µM, 100 y 200 µM, preincubados a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se permitió una concentración máxima de 0,5 % de DMSO en el medio de reacción.

Para iniciar las reacciones enzimáticas se usó Na_2ATP (3 mM). La reacción se incubó durante a 30 min a 37 °C, y se detuvieron agregando 100 µL de una solución de parada (3,0 % de ácido ascórbico, 0,5 % molibdato de amonio y 3,0 % de SDS en HCl.) Posteriormente, se agregaron 150 µL de citrato de bismuto y citrato de sodio al 3,5 % cada uno en HCl 2.0 M, las muestras se incubaron a 37 °C durante 10 min, y el fosforo inorgánico liberado (Pi) se cuantificó colorimétricamente a 690 nm[95,96].

Reacciones sin proteína (control negativo), sin Ca^{2+} (actividad basal), y suplementados con los compuestos a evaluar, pero sin proteína fueron usados como controles. La actividad Ca^{2+}-ATPasa se calculó como la diferencia entre la actividad ATPasa medida en presencia y ausencia de calcio. Se usó ortovanadato de sodio 50 µM como inhibidor control de la actividad ATPasa tipo P[40]. El efecto de los compuestos evaluados sobre la actividad Ca^{2+}-

ATPasa, se consideró como la diferencia entre la actividad Ca^{2+}-ATPasa en presencia y ausencia de los compuestos.

La actividad enzimática se reportó como nmol de Pi liberado/mg de proteína x min, a partir de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos se analizaron en el software GraphPad Prism, con el mismo programa se estimó el IC_{50}, que indica la concentración del compuesto que produce una inhibición del 50 % de la actividad enzimática máxima. Para estimar las diferencias estadísticamente significativas entre la actividad ATPasa estimulada por calcio en ausencia y presencia de los compuestos se efectuaron pruebas t-Student no pareadas.

5.2.5. Actividad citotóxica

La actividad citotóxica de los compuestos seleccionados se evaluó en células Vero utilizando placas de 96 pocillos (marca TPP, Suiza) en medio IMDM suplementado con 10 % de suero fetal bovino. 100 µL de las células Vero (10.000 células) fueron tratadas de forma individual con 100 µL de diluciones seriadas a la mitad de los compuestos a evaluar (1,5-200,0 µg/mL concentración final en cada pocillo) disueltos en medio IMDM. Las placas con las células y los compuestos se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO_2, luego se eliminaron los sobrenadantes y se añadieron 100 µL de una disolución de 5 mg/mL de MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Luego de 2 horas se retiró la solución de MTT y se añadieron 200 µL de DMSO para solubilizar los cristales formados[97,98], a lo que a continuación se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO. Como controles, se empleó DMSO 100 % para evidenciar el efecto citotóxico sobre las células, mientras que las células sin tratamiento alguno se tomaron como el 100 % de células viables.

5.2.6. Actividad hemolítica

Durante el ensayo de actividad hemolítica se emplearon placas de fondo en V de 96 pocillos (marca TPP, Suiza). Las evaluaciones se efectuaron sobre 100 µL de una suspensión de eritrocitos humanos O Rh (+) por pocillo al 2 % (concentración final) en solución salina de NaCl al 0,9 % de un donante sano. Posteriormente, las muestras se suplementaron con 100 µL de diluciones seriadas de compuestos (1,5 - 200 µg/mL a concentración final) y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, las placas se centrifugaron a 3500 rpm, y en un lector de placas Elisa (iMark de Bio rad) se midió la absorbancia a 570 nm. Como control 100 % hemólisis se trataron las células con Tritón X-100 (0,5 %), como control 0 % de hemólisis se usaron células suspendidas en solución salina[99]. El ensayo se efectuó por triplicado en dos experimentos independientes para cada compuesto. La hemólisis se expresa como un porcentaje de hemólisis respecto a los controles.

6. Resultados y discusión

A continuación, se presentan y discuten los resultados obtenidos a partir de la implementación de la estrategia propuesta. Los resultados se presentan de forma cronológica, a su vez corresponden al orden en que fueron planeados los objetivos específicos.

6.1. Dinámica molecular de los complejos CtpF – CPA, ligando A, B y C

El presente estudio tuvo como punto de partida la estructura obtenida por homología en el estudio anterior de nuestro grupo de investigación, además se consideraron como base las moléculas que junto con CPA mostraron mejores resultados en ensayos *in vitro* en el mismo estudio (ligando A, B y C)[15]. En primer lugar, se efectuaron simulaciones de dinámica molecular, en donde se permitió la evolución de los cuatro sistemas durante 50 ns en cada caso. Las simulaciones se efectuaron sobre los cuatro complejos P-L: CtpF-CPA, CtpF-ligando A, CtpF-ligando B y CtpF-ligando C. Estas simulaciones permitieron apreciar los diferentes cambios conformacionales que sufrió la proteína y cada uno de los ligandos en el sitio de unión a CtpF. En la **Figura 6-1** se muestra la variación del RMSD de los Cα de CtpF y los ligandos de cada complejo. El RMSD de CPA muestra ser el más bajo de los cuatro ligandos, su RMSD promedio durante toda la simulación es cercano a los 2,0 Å, esto sugiere que el ligando sufre poco desplazamiento desde su posición inicial y no sufre grandes cambios conformacionales a lo largo de la dinámica molecular. Esto resulta consecuente

con la estructura del ligando debido a que la componen diferentes anillos que le otorgan rigidez. Para el ligando A y B se encontró que durante la simulación sus valores de RMSD varían entre 4,5 y 6,0 Å respectivamente, estos valores son mayores a los apreciados para CPA, esto podría deberse a la estructura de estas moléculas debido a que poseen más enlaces rotables que CPA, lo que le otorga más grados de libertad; las rotaciones de enlaces sencillos pueden conllevar al desplazamiento significativo de grupos de átomos unidos a ellos. El ligando C muestra un menor valor de RMSD a través del tiempo respecto a los dos ligandos anteriores, aunque esta molécula también cuenta con varios enlaces sencillos en su estructura, fue evidente que durante la simulación la molécula tiende a estar plegada sobre ella misma, gracias a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular que se mantiene durante más de la mitad del tiempo de la duración de la dinámica molecular (**Figura 6-2D**), este efecto puede otorgarle rigidez a la estructura y que sufra menos cambios conformacionales de los esperados.

Los valores de RMSD de Cα de CtpF durante la simulación para el ligando A y B tienden a estabilizarse entre 3,0 y 4,0 Å respectivamente. Para las simulaciones de CtpF con CPA y el ligando C no resulta evidente que se alcance una estabilización durante el tiempo de simulación empleado, por lo cual es probable que se requieran simulaciones más largas para encontrar una estabilización, no obstante, estos valores iniciales muestran un comportamiento similar a los obtenidos en estudios previos de dinámica molecular del homólogo SERCA1a, en donde se efectuaron simulaciones de 185 y 200 ns para los complejos SERCA1a-CPA y SERCA1a-RA respectivamente, en donde se obtuvieron valores de RMSD de 3,2 y 3,7 Å para los Cα de la enzima en los complejos evaluados[100,101]. Aunque para el presente trabajo el estudio de las interacciones P-L son más relevantes que los cambios conformacionales que sufre CtpF durante la simulación, y que evidentemente se requieren simulaciones más largas para este fin. Según los valores de RMSD obtenidos para la proteína con los ligandos A y B, podría considerarse inicialmente que estos pueden ser los mejores inhibidores entre los cuatro evaluados, debido que, bajo la hipótesis de que su acción es análoga a la de CPA sobre SERCA1a, estos bloquean a la enzima CtpF en una

conformación y esto podría apreciarse en las simulaciones al lograr estabilizar rápidamente el RMSD de la proteína durante la simulación, siendo este efecto más evidente para la simulación con el ligando A[53,54].

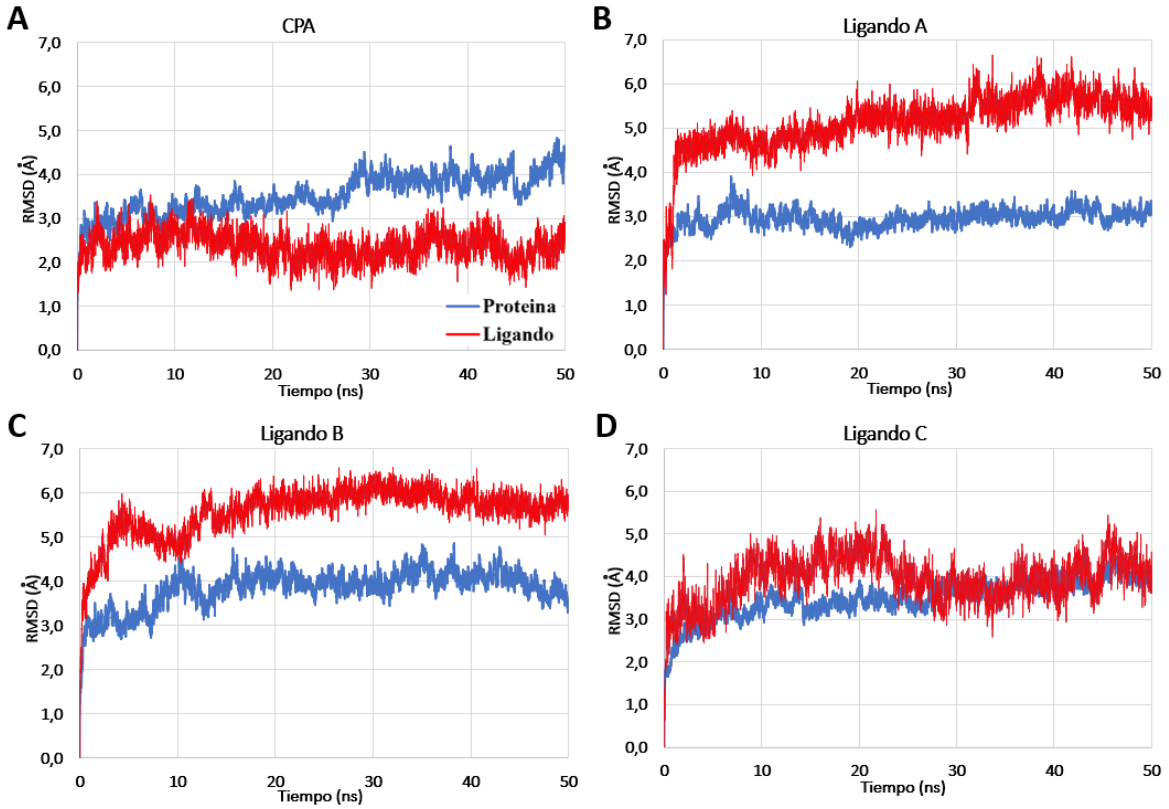


Figura 6-1. Variación del RMSD de CtpF y los respectivos ligandos durante 50 ns de simulación. **A.** RMSD de CtpF - CPA. **B.** RMSD de CtpF - A. **C.** RMSD de CtpF - B. **D.** RMSD de CtpF - C.

6.2. Modelado de farmacóforos

La DM permitió simular las interacciones que se forman entre CtpF y cada uno de los cuatro ligandos evaluados, en la **Figura 6-2** se muestran las interacciones P-L a distancias menores de 4,0 Å y que se mantuvieron durante al menos un 20 % del tiempo de simulación. Para CPA, dentro de las interacciones más importantes que se aprecian en la **Figura 6-2A**, se muestra una interacción tipo enlace de hidrógeno entre la amina del indol de la molécula y la cadena lateral de Leu245 que se mantiene un 90 % del tiempo. Además, durante un 24

% del tiempo existe una interacción *pi-pi stacking* entre el anillo pirrólico y la His66, también existen interacciones hidrofóbicas entre el resto del indol y la Leu252. Finalmente, dentro de las interacciones más significativas se encuentra un enlace de hidrógeno que se mantiene durante un 94 % del tiempo de simulación, entre Gln63 y el oxígeno carbonílico terminal de la molécula.

Para el ligando A (**Figura 6-2B**), las interacciones más significativas son de tipo enlaces de hidrógeno con Gln63, Asn98 y Pro290 (96, 63 y 97 % del tiempo respectivamente), seguidas por algunas interacciones hidrofóbicas con cadenas alifáticas y anillo de benceno presente en la molécula.

En el ligando B (**Figura 6-2C**), el nitrógeno presente en el grupo indol forma un enlace de hidrógeno con Leu245 casi el 100 % del tiempo de simulación. Otro enlace de hidrógeno significativo se forma entre el nitrógeno de la sulfonamida del ligando y Glu106 (89 % del tiempo de simulación); otros enlaces de hidrógeno menos significativos son evidentes entre el nitrógeno de la amida intermedia de la molécula y Gln63. Adicionalmente, entre el anillo de tiofeno y el anillo de la His66 existe una interacción tipo pi-pi stacking durante el 70 % del tiempo.

Como se mencionó anteriormente, el ligando C presenta un plegamiento sobre sí mismo gracias a un enlace de hidrógeno intramolecular mostrado en la **Figura 6-2D**, adicionalmente, se aprecia la formación de enlaces de hidrógeno (mediados por moléculas de agua que sirven como puente entre el ligando y la proteína) con el oxígeno de la cetona en el anillo del grupo imidazolidinona, que además también posee un grupo donador que se enlaza con la Gly102 (57 % del tiempo de simulación). Estos enlaces de hidrógeno mediados por agua también se aprecian en el nitrógeno de la amida intermedia del ligando, interacciones que en general se mantienen durante un 34 y 50 % del tiempo de simulación. Finalmente, se encuentran dos grupos hidrofóbicos, y una interacción tipo *pi-pi stacking* con el grupo pirazol y la His66 durante un 24 % del tiempo de simulación.

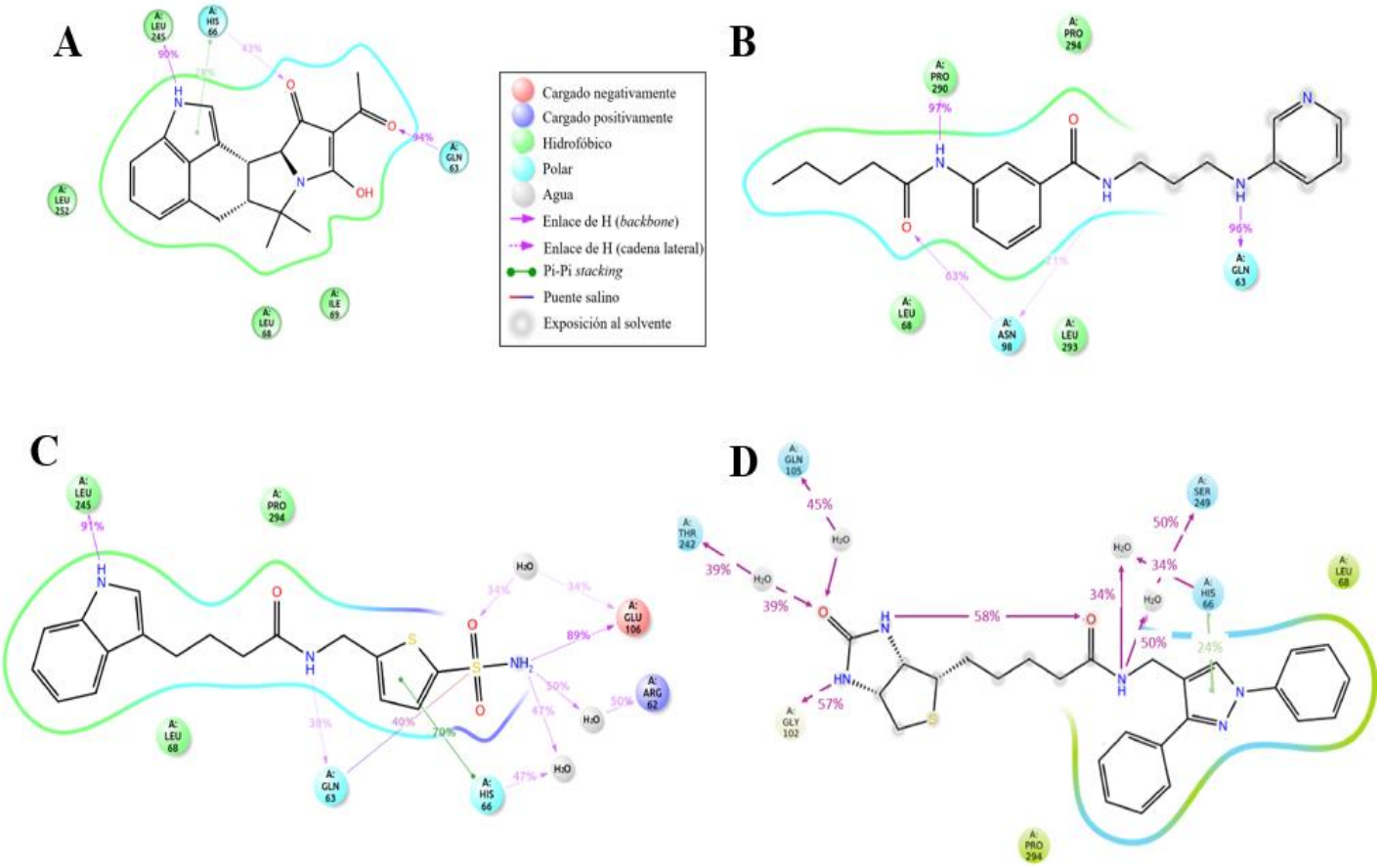


Figura 6-2. Interacciones P-L formadas durante la simulación de dinámica molecular entre CtpF y **A.** CPA; **B.** Ligando A; **C.** Ligando B; **D.** Ligando C

En las cuatro simulaciones de dinámica molecular de los complejos P-L, se identificaron interacciones significativas recurrentes con los residuos Gln63, His66, Leu68, Leu245, Leu252 y Pro294. Estos residuos ya se habían identificado como importantes en el análogo sitio de unión de CPA en SERCA1a (Gln56, Leu61, Leu253, Pro312) en el estudio de acoplamiento molecular realizado en nuestro grupo, excepto por las interacciones con los residuos His66 y Leu252[15]. Sin embargo, en el mismo estudio a excepción de la interacción con Leu252, todos estos residuos también hacen parte de sitio de unión de los inhibidores de actividad Ca^{2+}-ATPasa; CPA y los ligandos A, B y C en CtpF. Por lo tanto, la previa identificación por acoplamiento molecular y la conservación de las interacciones con estos residuos durante las simulaciones de dinámica molecular, sugieren que son importantes en la inhibición de la actividad ATPasa de CtpF.

Con base en la información anterior, se propusieron cuatro modelos de farmacóforos, estos se muestran en la **Figura 6-3**; las características de cada farmacóforo se definieron considerando los siguientes criterios: **i**) importancia durante la simulación, es decir, los grupos de cada ligando que contribuyeron a que las interacciones P-L se mantuvieran durante un mayor tiempo durante la simulación, **ii**) obtención de un número significativo y apropiado de *hits* en la librería resultante de ZINCPharmer. Por consiguiente, se propusieron las características que, según cada modelo, permitieron obtener un número apropiado de moléculas para continuar con las evaluaciones posteriores, y que, para la capacidad de cómputo disponible, no representara un tiempo extenso de cálculo.

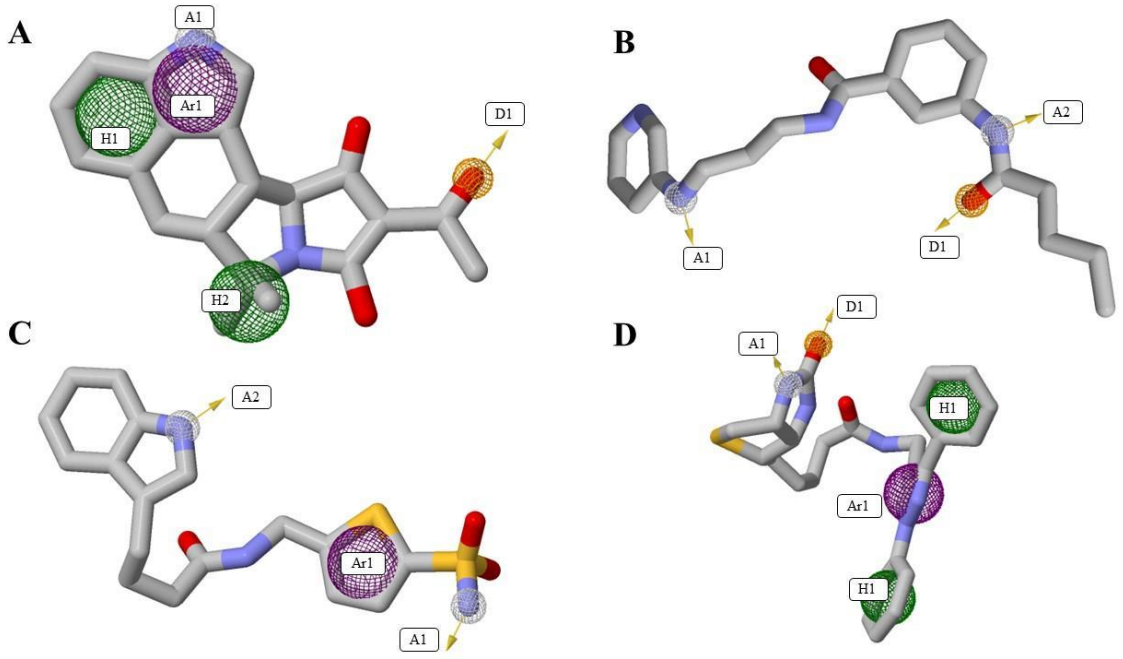


Figura 6-3. Modelos farmacofóricos propuestos a partir de las interacciones P-L más importantes obtenidas durante el tiempo de simulación por dinámica molecular. Las etiquetas A, D, H y Ar hacen referencia a grupos aceptores, donadores, hidrofóbicos y aromáticos respectivamente. **A.** Modelo CPA. **B.** Modelo 1. **C.** Modelo 2. **D.** Modelo 3

Cada uno de los modelos empleados en el cribado virtual en la interfaz de ZINCPharmer se deriva desde uno de los ligandos de partida. El modelo CPA (ligando CPA, **Figura 6-3A**) consta de dos grupos hidrofóbicos, un grupo aromático y un donador de enlaces de hidrógeno. El modelo 1 (ligando A, Figura **6-3B**) posee dos aceptores y un donador de enlaces de hidrógeno. El modelo 2 (ligando B, **Figura 6-3C**) lo conforman dos aceptores de enlaces de hidrógeno y un grupo aromático. Finalmente, el modelo 3 (ligando C, **Figura 6-3D**) se compone de dos grupos hidrofóbicos, un grupo aromático, un aceptor y un donador de enlace de hidrógeno.

6.3. Cribado virtual

Los cuatro modelos de farmacóforo se exportaron a la interfaz en línea ZINCPharmer (http://zincpharmer.csb.pitt.edu), la cual cuenta con 22.723.923 compuestos. La búsqueda permitió identificar 6.745 compuestos en total que coinciden con los farmacóforos propuestos. Los hits resultantes se sometieron a un segundo cribado virtual basado en acoplamiento molecular, para este fin se usó del módulo Glide de Schrodinger, en donde se emplearon consecutivamente los métodos SP y XP para refinar las poses de los ligandos.

Bajo la consideración de que las funciones de puntuación de acoplamiento no siempre resultan fiables para estimar afinidades debido a que no se consideran adecuadamente factores entrópicos en los cálculos de energía libre de unión, se recurrió a un método de *rescoring*, que previamente ha mostrado resultados satisfactorios para calcular energías libres de unión relativas entre ligandos que muestran una mejor correlación resultados experimentales[102]. Este método está basado en el cálculo de energía mediante mecánica molecular que combina un modelo de solvatación continua de Área de Superficie Generalizada de Born (MM-GBSA)[103,104], los cálculos de energía se usaron para modelar efectos del solvente por solvatación continua y términos independientes, las evaluaciones se efectuaron sobre las poses refinadas de cada uno de los ligandos provenientes de cada lista derivada de los cuatro farmacóforos en el sitio de unión a CtpF.

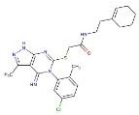
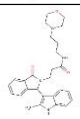
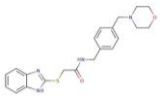
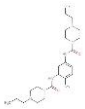
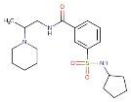
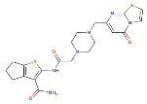
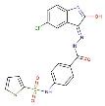
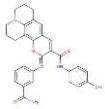
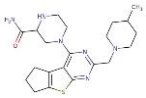
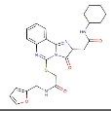
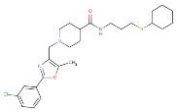
Adicionalmente, en la búsqueda de moléculas potencialmente activas, se consideró que las moléculas candidatas mostraran modos de unión similares respecto al ligando de referencia en cuestión en cada caso, bajo la hipótesis de ligandos con modos de unión similares a las moléculas que mostraron ser activas en ensayos previos, tendrían mayor potencial de mostrar actividad en ensayos biológicos. Para este fin se calculó el coeficiente de Tanimoto para cada candidato basado en la huella de interacción P-L (PLIF, por sus siglas en inglés *Protein Ligand Interaction Fingerprint*)[105], el coeficiente adopta valores entre 0 y 1, en donde valores cercanos a 1 indican una alta similitud en el modo de unión respecto a la referencia y un valor cercano a 0 indican lo contrario.

En la **Tabla 6-1**, se reportan las moléculas seleccionadas para cada lista resultante de cada modelo de farmacóforo propuesto, estas moléculas mostraron *ΔG* (MM-GBSA) menor que el ligando de referencia en cuestión en cada caso, por lo que se esperaba que estos ligandos pudieran tener una mayor afinidad por CtpF y por ende una mayor inhibición en la actividad de la enzima. Adicionalmente se calcularon los descriptores fisicoquímicos alusivos a la regla de 5 de Lipinski que proveen una aproximación sobre las propiedades fisicoquímicas de un fármaco, a partir de estas propiedades es posible predecir si estás moléculas poseen potencial como fármaco de uso oral. Las moléculas seleccionadas cumplen con las reglas de Lipinski[61,64], a excepción del compuesto ZINC09731847, el cual incumple un único parámetro, el Log P, siente este mayor que 5, sin embargo, incumplir solo uno de los parámetros resulta aceptable para calificar como candidato y continuar con los ensayos *in vitro*. Con base en los resultados teóricos resumidos en la **Tabla 6-1** se sugiere que los compuestos cumplen con propiedades moleculares apropiadas asociadas con la biodisponibilidad oral en humanos.

En la selección de los compuestos, con base en los parámetros teóricos, se consideraron aquellos ligandos que mostraran un *ΔG* (MM-GBSA) igual o mejor que el ligando de referencia en cada caso, CPA: -115,36 kcal/mol; ligando A: -111,41 kcal/mol; ligando B: -98,18 kcal/mol; ligando C: -134,21 kcal/mol, un coeficiente de Tanimoto igual o mayor a 0,400, máximo un incumplimiento a las reglas de Lipinski, y que contribuyera a la diversidad estructural del conjunto de candidatos seleccionados. En consideraciones más prácticas se tuvo en cuenta el costo por miligramo y disponibilidad comercial de los compuestos, procurando adquirir al menos tres moléculas de cada librería derivada de cada modelo de farmacóforo propuesto.

Tabla 6-1. Resumen de propiedades *drug-like*, energías libres de unión *ΔG* MMGBSA, Glide score y similitud (basada en el coeficiente de Tanimoto) de las moléculas seleccionadas del

cribado virtual basado en farmacóforo de la base de datos ZINC. Se muestran las moléculas seleccionadas para cada modelo, los modelos CPA, 1, 2 y 3 están basados en características farmacofóricas de los ligandos CPA, A, B y C respectivamente.

Ligando de referencia /ΔG MMGBSA	Modelo	Compuesto	Estructura	ΔG MMGBSA (kcal/mol)	Docking score (kcal/mol)	Log P	Enlaces rotables	MW	Donadores enlace-H	Aceptores enlace-H	tPSA	Coeficiente de tanimoto
CPA: -115,36 kcal/mol	**Modelo CPA**	**ZINC15890389**		-130,21	-6,97	4,54	7	471,02	3	6	99	0,471
		ZINC13955524		-128,82	-8,07	3,00	7	460,58	2	9	93	0,500
		ZINC12547355		-124,96	-8,81	2,03	7	396,51	2	8	79	0,606
Ligando A: -111,41 kcal/mol	**Modelo 1**	**ZINC89959094**		-135,44	-5,51	2,44	6	430,59	2	8	81	0,549
		ZINC40156945		-130,15	-5,86	2,23	7	393,54	2	9	90	0,539
		ZINC22790105		-128,29	-5,76	0,86	6	472,58	2	9	137	0,587
		ZINC02646421		-124,87	-5,71	1,70	6	460,91	2	8	144	0,616
Ligando B: -98,18 kcal/mol	**Modelo 2**	**ZINC04030361**		-129,78	-5,34	5,00	5	492,58	3	8	103	0,486
		ZINC57418826		-129,13	-5,33	1,11	3	414,57	3	9	92	0,419
		ZINC02967970		-127,85	-8,95	2,47	8	493,58	2	7	130	0,590
Ligando C: -134,21 kcal/mol	**Modelo 3**	**ZINC09731847**		-134,79	-7,45	5,54	8	490,10	1	7	58	0,287

Sin embargo, se tuvieron algunas consideraciones especiales en dos casos, ya que resulta apreciable que para el modelo 1 se seleccionó un cuarto compuesto, esto debido a que en la lista evaluada esta fue una de las pocas moléculas que además de mostrar un *ΔG* (MM-GBSA) mejor que su referencia y propiedades *drug-like* apropiadas, también mostró un coeficiente de Tanimoto igual o mayor a 0,600, encontrar valores de similitud de esta magnitud no fue usual, por lo cual se propuso para su adquisición bajo la hipótesis de que al tener un modo de unión similar a su referencia (que mostró actividad biológica), este compuesto también pudiera tener mayor potencial para demostrar actividad en los ensayos *in vitro*. Adicionalmente, también es evidente que se seleccionó un único compuesto para el modelo 3, esto debido a que fue la única molécula que mostró un *ΔG* (MM-GBSA) mejor que su ligando de referencia, aunque no muestra un modo de unión similar en al menos 0,400, se decidió adquirirlo y probar su actividad con el fin de no omitir el único candidato que muestra mayor afinidad que su ligando de referencia en el modelo 3.

De esta forma, se seleccionaron once compuestos en total para su adquisición y para someter a evaluaciones *in vitro*, tres para el modelo farmacofórico del ligando CPA (modelo CPA), cuatro compuestos para el modelo derivado del ligando A (modelo 1), tres compuestos para el modelo de resultante del ligando B (modelo 2) y un compuesto para el modelo del ligando C (modelo 3).

Dentro de los núcleos base o *scaffolds* más comunes presentes en los once candidatos propuestos del cribado virtual del presente estudio se encuentran: piperazina, piperidina, tiofeno y morfolina.

Se ha evidenciado el potencial de derivados de piperidina junto con otros fragmentos moleculares para usarse como agentes anticancerígenos, antihipertensivos, antivirales, antimicrobianos (contra *S. lutea, S.aureus, E. coli*), antipalúdicos y antifúngicos[106].

La morfolina que corresponde a un heterociclo presente en numerosos fármacos experimentales y aprobados, que incluyen analgésicos, antinflamatorios, antioxidantes y

antimicrobianos. En la química medicinal se aprecian ventajas en sus propiedades fisicoquímicas, biológicas y metabólicas. Aunque la lipofilia de las moléculas que contienen morfolina depende en gran medida de su respectiva sustitución, el anillo por su naturaleza ofrece un perfil lipofílico-hidrofílico equilibrado, con características similares a las deseadas en un fármaco[107].

El tiofeno es un anillo heteroaromático que contiene azufre, usado a menudo como un componente básico en algunos fármacos, es tenido en cuenta como una alerta estructural debido a que en algunos casos puede conducir a la formación de metabolitos reactivos responsables de hepatotoxicidad inducida por fármacos. Sin embargo, la presencia de otras vías metabólicas menos tóxicas, así como un sistema eficaz de desintoxicación de nuestro organismo nos protege del potencial de bioactivación del anillo de tiofeno. Así pues, la presencia del anillo de tiofeno resulta insuficiente para predecir efectivamente la toxicidad de un compuesto[108].

6.4. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Con el fin de establecer si en primera instancia los compuestos logran inhibir el crecimiento de *Mtb*, se efectuaron ensayos de CMI sobre diez de los once compuestos seleccionados, toda vez que uno de ellos presentó problemas de solubilidad en los diferentes solventes probados.

En la **Tabla 6-2** se aprecia que de los diez compuestos evaluados a concentraciones entre 1,5 – 200,0 µg/mL, cuatro de ellos lograron inhibir el crecimiento de *Mtb* H37Ra a concentraciones desde 25,0 hasta 200,0 µg/mL. El compuesto ZINC57418826 mostró una CMI de 200,0 µg/mL, mientras que los compuestos ZINC12547355 y ZINC09731847 mostraron una CMI de 100,0 µg/mL, y el compuesto ZINC04030361 inhibió el crecimiento de la micobacteria a una concentración de 25,0 µg/mL.

Tabla 6-2. Resultados de CMI de las moléculas evaluadas sobre *Mtb;* los resultados corresponden al triplicado de dos ensayos independientes

Modelo	Compuesto	CMI (µg/mL)
Modelo CPA	ZINC15890389	>200,0
	ZINC13955524	>200,0
	ZINC12547355	100
Modelo 1	ZINC89959094	>200,0
	ZINC40156945	>200,0
	ZINC22790105	>200,0
	ZINC02646421	>200,0
Modelo 2	**ZINC04030361**	25,0
	ZINC57418826	200,0
Modelo 3	**ZINC09731847**	100,0

** Se resaltan en negrita los compuestos más activos*

Los valores obtenidos, inicialmente son superiores a los reportados en la literatura para fármacos de primera línea como la RIF o la INH que poseen valores de CMI del orden de 0,125 – 0,5 µg/mL[109–111]. Sin embargo, se debe considerar que la CMI obtenida para el compuesto ZINC04030361 encontrado utilizando la estrategia descrita en el presente trabajo, es mejor que las obtenidas por los compuestos precursores reportados en los trabajos previos de nuestro grupo de investigación, donde los valores mínimos de CMI llegaron solo hasta 50,0 µg/mL[15].

Por otra parte, también es muy relevante que la inhibición del crecimiento bacteriano sea producto de la inhibición de una diana alternativa a las utilizadas por los anti-TB tradicionales de primera o segunda línea. Por ejemplo, la isoniazida se une a la enzima InhA inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos de la pared celular, y la RIF inhibe la síntesis de cadenas de ARN por su unión a la ARN polimerasa de la micobacteria[112].

Aunque para algunos de los anti-TB en desarrollo se reportan valores de CMI contra *Mtb* similares a los de los fármacos de primera línea (SQ109, dirigido a los ácidos micólicos; CMI: 0,11 µg/mL)[113], es importante destacar para nuestro estudio, que también se han descrito candidatos con valores de CMI contra *Mtb* mayores a los de los fármacos de primera línea. Son los casos de CPZEN-45 (1,56 µg/mL) que es un inhibidor de la síntesis de arabinogalactano[114]; BTZ043 (1,11 µg/mL) un inhibidor suicida de DprE1 relevante en la síntesis de lipoarabinomanano y arabinogalactano[115]; y finalmente, el fármaco sanfetrinem, que se encuentra en ensayos preclínicos y del que se reportan valores de CMI de 2,1 a 5,6 µg/mL sobre *Mtb*. Por lo tanto, es igualmente importante destacar que los inhibidores del crecimiento de *Mtb* propuestos en el presente estudio no solo están dirigidos a una diana alternativa (una ATPasa tipo-P transportadora de calcio) a la de los fármacos de primera o segunda línea[112], sino también alternativas a la de los anti-TB que se encuentran actualmente en diferentes fases de desarrollo.

Por otra parte, consideramos que aplicando nuevamente la estrategia propuesta en el presente trabajo, un cribado virtual adicional utilizando a ZINC04030361 como base, podría conllevar a la identificación de un compuesto con una CMI cercana a la de los fármacos de primera línea, y a la de otros compuestos conocidos como inhibidores de ATPasas, como la artemisinina que actúa sobre PfATP6 de *Plasmodium falciparum* (CMI: 9,92 ng/mL), o la cloroquina (CMI: 1,38 µg/mL)[116,117].

Como alternativa en estudios futuros, utilizando el compuesto ZINC04030361, resulta interesante evaluar si puede darse un efecto sinérgico sobre la inhibición del crecimiento de *Mtb* al combinarse con alguno de los fármacos de primera o segunda línea. Existe evidencia de este efecto en algunos de los anti-TB en desarrollo al combinarse con ciertos fármacos anti-TB tradicionales. Tal es el caso de BTZ043 al combinarse con bedaquilina, o el candidato SQ109 que también logra este efecto cuando se combina con INH y RIF o alguno de los fármacos de segunda línea como moxifloxacina o amikacina[112,113].

6.5. Efecto de los compuestos seleccionados sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa de CtpF

Basados en la CMI mostrada por los compuestos inicialmente probados, se evaluó la capacidad para inhibir la actividad Ca^{2+}-ATPasa sobre vesículas de membrana plasmática de *Mtb*, de dos de los cuatro compuestos activos seleccionados mediante CMI.

Se ensayó el compuesto ZINC04030361, que logró inhibir el crecimiento de la micobacteria a la concentración más baja (25,0 µg/mL), y el compuesto ZINC09731847 del que se obtuvo una CMI de 100,0 µg/mL a pesar que posee un Log P más alto de lo recomendado (5,54) según las reglas de Lipinski.

Inicialmente, se determinó la actividad ATPasa basal de vesículas de membrana (actividad no estimulada por calcio), posteriormente se evaluó la actividad ATPasa estimulada por calcio o **actividad Ca^{2+}-ATPasa** (actividad en presencia de calcio libre), y la actividad ATPasa tipo P específica, en presencia de vanadato, un inhibidor conocido de ATPasas tipo P. Los ensayos se efectuaron sobre vesículas de membrana invertidas de *Mtb* H37Ra WT y de la cepa *Mtb* H37Ra defectiva en el gen CtpF (*MtbΔctpF*). La evaluación sobre las vesículas de membrana de la cepa *MtbΔctpF* fue usada como un control que permitió diferenciar la actividad Ca^{2+}-ATPasa mediada por CtpF, de la de otros transportadores presentes en las membranas de *Mtb* que puedan presentar alguna afinidad por el Ca^{2+}.

La actividad Ca^{2+}-ATPasa tipo P fue estimada 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).

En la **Figura 6-4**, se aprecia que el Ca^{2+} logró estimular la actividad ATPasa basal de *Mtb* WT en un 34 % mientras que la misma actividad en vesículas de membrana plasmática de la cepa *MtbΔctpF* se estimuló solo en un 8 %. Estos resultados demuestran que la membrana plasmática de *Mtb* presenta actividad Ca^{2+}-ATPasa tipo P mediada por CtpF.

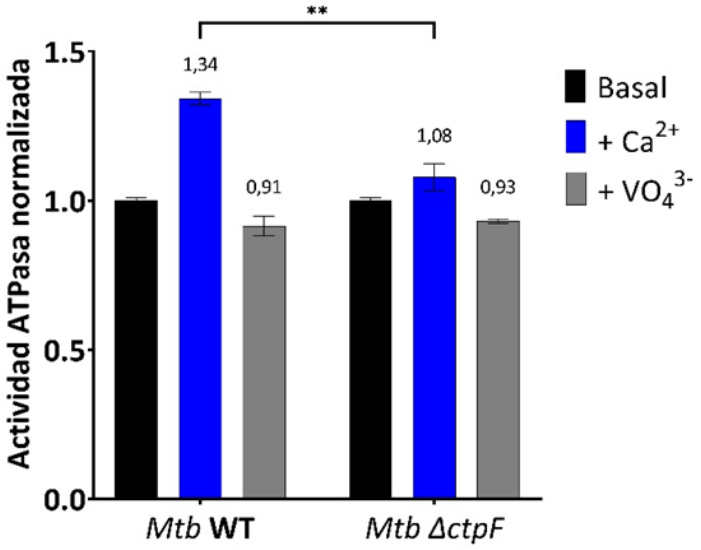


Figura 6-4. Actividad ATPasa basal y estimulada por la adición de Ca^{2+} de vesículas de membrana de las cepas *Mtb* WT y *MtbΔctpF*. La actividad Ca^{2+} se estimuló mediante la adición de Ca^{2+}-libre (30 µM). Estos valores se comparan con la actividad obtenida en presencia de VO_4^{-3} (50 µM). Los valores presentados corresponden a la media ± SEM (n = 3). Las diferencias significativas están descritas por asteriscos como **, P < 0,01.

La **Figura 6-5** muestra el efecto de los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847 sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa normalizada de vesículas de membrana plasmática de *Mtb* de la cepa WT y *MtbΔctpF.* Es apreciable que en vesículas de membrana de *Mtb* WT la actividad Ca^{2+}-ATPasa de los compuestos es concentración dependiente, sobre todo a partir de 1,0 µM. Aunque visualmente se aprecia una disminución en la actividad de las vesículas de membrana de la cepa *MtbΔctpF* a altas concentraciones de los compuestos, los métodos de análisis sugieren que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la actividad Ca^{2+}-ATPasa a diferentes concentraciones de los compuestos respecto al control en ausencia de los compuestos.

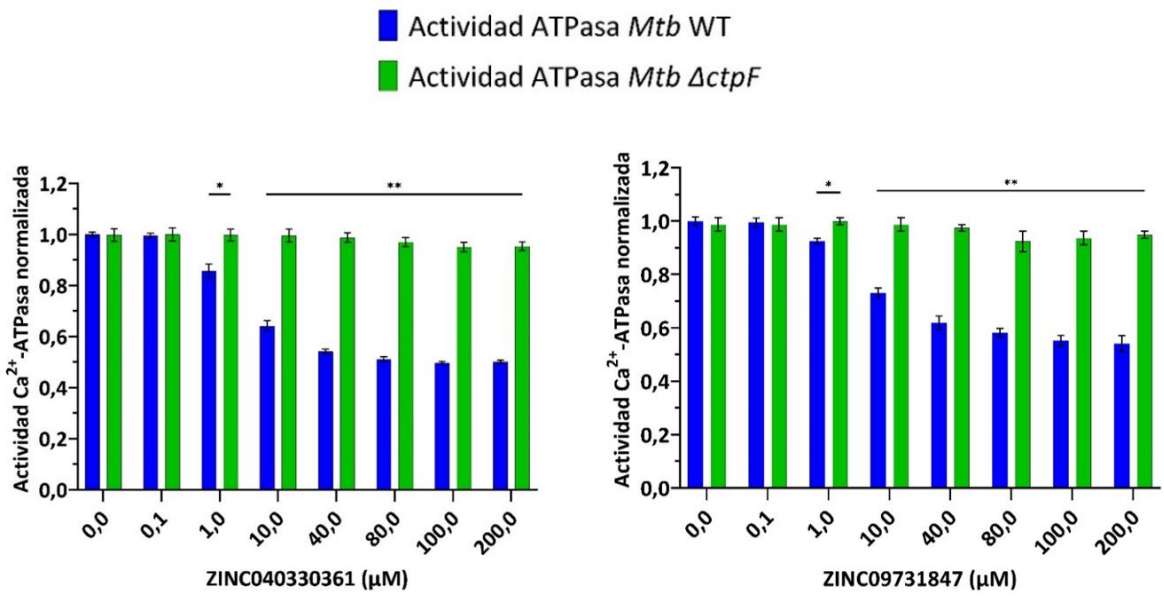


Figura 6-5. Efecto de los compuestos ZINC0430361 y ZINC09731847 sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa normalizada. Se muestra el efecto de los compuestos (0,1 – 200 µM) sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa de *Mtb* WT y *MtbΔctpF*. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las mediciones de vesículas de membrana de las dos cepas desde 1,0 µM, se indican como *, $P < 0,05$; ** $P < 0,001$. Los valores corresponden a la media ± SEM (n = 3).

En la **Tabla 6-3** se muestran los resultados del efecto de la actividad enzimática de los compuestos sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa, expresada como IC_{50} sobre vesículas de membrana de *Mtb* WT y *MtbΔctpF*. El compuesto ZINC04030361 mostró un IC_{50} (3,3 µM) mejor que el del ligando B, su ligando de referencia (IC_{50} = 4,4 µM)[15]. Este resultado es consecuente con lo esperado según los cálculos de *ΔG* (MM-GBSA), pues al mostrar una energía libre de unión más negativa que su ligando de referencia, también tiene el potencial de lograr un mayor efecto sobre la inhibición sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa de CtpF. El compuesto ZINC09731847 mostró un IC_{50} (7,6 µM) mayor a su ligando de referencia, el ligando C (IC_{50} = 4,1 µM); sin embargo, este valor es similar al IC_{50} de los otros inhibidores de CtpF encontrados en el estudio anterior con CMI de 100 µg/mL[15].

Tabla 6-3. Efecto sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa de los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847

	Actividad enzimática IC_{50} (µM)	
Compuesto	***Mtb* WT**	***MtbΔCtpF***
ZINC040330361	3,3	122,6
ZINC09731847	7,6	108,3

En la **Figura 6-6** se compara el efecto de los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847 a una concentración de 100,0 µM. Resulta apreciable que se logró inhibir la actividad Ca^{2+}-ATPasa normalizada de las vesículas de membrana de *Mtb* WT en un 50 % y 45 % respectivamente comparado con la actividad del control sin compuesto.

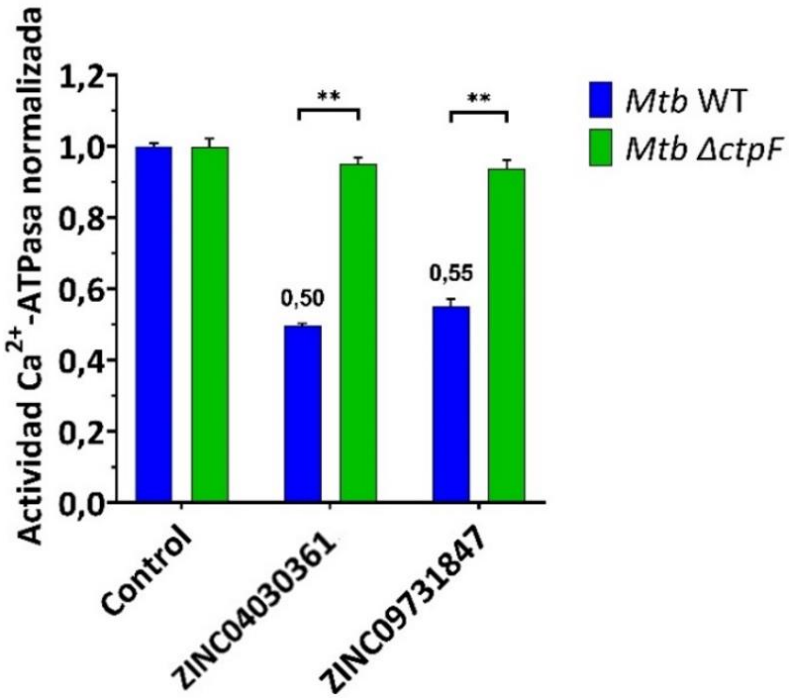


Figura 6-6. Efecto de los compuestos ZINC0430361 y ZINC09731847 sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa normalizada de vesículas de membrana de *Mtb* WT y *MtbΔctpF*. Se muestra la actividad a una concentración de 100,0 µM. Los resultados corresponden a la media ± SEM (n = 3). Se estimaron diferencias estadísticamente significativas en entre la actividad Ca^{2+}-ATPasa de las vesículas de membrana de las cepas *Mtb* WT y *MtbΔctpF,* en donde **, $P < 0,01$. El control corresponde al 100 % de actividad Ca^{2+}-ATPasa normalizada, en donde no hay presencia de los compuestos.

Los anteriores resultados sugieren que el cribado virtual basado en farmacóforo como estrategia de búsqueda de nuevos inhibidores de CtpF fue exitoso, ya que en el presente trabajo se identificaron dos nuevos inhibidores de la actividad de esta ATPasa, en los que se destaca el compuesto ZINC04030361, al presentar mejor actividad respecto a los compuestos de partida o referencia.

Es importante resaltar que si los compuestos no afectan la actividad Ca^{2+}-ATPasa de las vesículas de membrana del mutante *MtbΔctpF,* significa que efectivamente ZINC04030361 y ZINC09731847 están dirigidos contra CtpF, ya que está enzima está ausente en las vesículas de membrana del mutante.

6.6. Actividad citotóxica y hemolítica de los compuestos evaluados

Se efectuaron ensayos *in vitro* para determinar el efecto adverso que los dos candidatos seleccionados podrían tener sobre células eucariotas. Para ello se utilizaron las mismas concentraciones de inhibidores empleadas en los ensayos de CMI.

El ensayo de citotoxicidad se efectuó sobre células Vero, provenientes de células epiteliales del riñón de mono verde africano. La citotoxicidad se estimó mediante el ensayo con MTT, que se basa en su conversión en formazán (forma reducida de MTT) por células vivas. Las células Vero se han usado previamente en la determinación del efecto citotóxico de antioxidantes, metabolitos, candidatos a fármacos, péptidos antimicrobianos y extractos de plantas sobre células euriocariotas[118–120]. En la **Tabla 6-4** se muestra el efecto citotóxico de los dos compuestos evaluados sobre las células Vero. Es apreciable que a medida que aumenta la concentración de los compuestos también aumenta la citotoxicidad sobre las células Vero. Se evidencia que la mayor citotoxicidad obtenida en el ensayo respecto a las células no tratadas o células control fue del 27,2 %, dada por el compuesto ZINC04030361 a una concentración de 200,0 µg/mL, esta citotoxicidad resulta ligeramente mayor a la mostrada por el compuesto ZINC09731847 a la misma concentración (26,7 %). Sin

embargo, es necesario resaltar que para el compuesto ZINC04030361, esta citotoxicidad se obtuvo a una concentración que es ocho veces mayor que su CMI (25 µg/mL), mientras que para el compuesto ZINC09731847 representa el doble de su CMI (100 µg/mL). Estos valores de citotoxicidad son similares a los obtenidos en reportes previos de citotoxicidad de la RIF (sobre diferentes líneas celulares, incluyendo células Vero), en donde se obtuvieron citotoxicidades entre 20 y 25 % para concentraciones de 200 y 500 µg/mL respectivamente[121,122].

Aunque la evaluación de citotoxicidad de los ligandos de referencia (ligando A, B, y CPA) se efectuó sobre células eucariotas diferentes (Macrófagos murinos MH-S), sus valores citotoxicidad a 100 µg/mL (12,9 – 30,0 %)[15] son similares a los de los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847 a la misma concentración. Según los estándares internacionales, los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847 no son citotóxicos en las concentraciones evaluadas, ya que la viabilidad celular en todos los casos se mantuvo sobre el 70 %[123,124]. Con base en los resultados expuestos, el compuesto ZINC04030361 es un mejor candidato comparado con ZINC09731847, ya que tiene una actividad citotóxica aceptable a una concentración ocho veces mayor que su CMI en células *Mtb*.

Tabla 6-4. Efecto citotóxico de los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847 sobre células Vero

Concentración (µg/mL)	Citotoxicidad (%)	
	ZINC040330361	**ZINC09731847**
1,5	6,4	5,2
3,1	6,4	5,2
6,2	10,1	5,4
12,2	10,5	5,6
25,0	10,9	8,4
50,0	13,5	9,7
100,0	26,6	13,6
200,0	27,2	25,7

**Los resultados corresponden al triplicado de dos ensayos independientes.*

Por otra parte, los resultados de actividad hemolítica se expresan en términos de porcentaje de hemólisis respecto a eritrocitos no expuestos a los compuestos, e incubados en solución salina NaCl 0,9 % y respecto al 100 % de hemólisis, dada por eritrocitos tratados con Tritón 100-X (**Tabla 6-5**).

Los ensayos de actividad hemolítica permitieron determinar que a las concentraciones evaluadas ningún compuesto supera el 0,9 % de hemólisis, siendo esta la mayor actividad hemolítica observada para el compuesto ZINC09731847 a 200 µg/mL. El compuesto ZINC04030361 mantuvo valores de actividad hemolítica iguales o menores a 0,2 %. La actividad hemolítica obtenida en todas las concentraciones evaluadas de los compuestos ZINC09731847 y ZINC04030361, es menor a la observada en el trabajo previo de nuestro grupo de investigación, donde los ligandos A, B, C a una concentración de 100 µg/mL reportaron una actividad hemolítica en el rango de 1,2 a 2,4 %[15]. Además, los valores de actividad hemolítica encontrados en el presente estudio para los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847 son similares a los que se reportan en la literatura para anti-TB como la RIF o la INH (0,1 – 2,0 %) en concentraciones de hasta 400 µg/mL de estos fármacos.

Tabla 6-5. Actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos O Rh (+) de los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847

Concentración (µg/mL)	A. hemolítica (%)	
	ZINC040330361	ZINC09731847
1,5	0,1	0,1
3,1	0,0	0,2
6,3	0,2	0,0
12,5	0,2	0,1
25,0	0,2	0,0
50,0	0,2	0,4
100,0	0,2	0,5
200,0	0,2	0,9

**Los resultados corresponden al triplicado de dos ensayos independientes.*

Los resultados de actividad citotóxica y hemolítica de los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847 permiten sugerir que son seguros en concentraciones de hasta 200,0 µg/mL. Se destaca lo observado para ZINC04030361 que mantuvo una actividad hemolítica menor a 0,2 % en todas las concentraciones evaluadas, y demostró una actividad citotóxica aceptable a una concentración ocho veces mayor que su CMI.

6.7. Modos de unión de los compuestos activos

Se analizaron los modos de unión de los compuestos ZINC04030361 y ZINC09731847. En la **Figura 6-7** se muestran los modos de unión de los ligandos en cuestión y en la **Tabla 6-6** se resumen los residuos con los que interactúan estos dos ligandos, se espera que estos residuos sean relevantes para la inhibición demostrada de la actividad Ca^{2+}-ATPasa de CtpF y, por ende, que puedan comprometer la viabilidad de la micobacteria.

El compuesto ZINC04030361, obtenido de la biblioteca del farmacóforo modelo 2, posee un *ΔG* (MMGBSA) = -129,78 kcal/mol, logró inhibir el crecimiento de *Mtb* a 25 µg/mL, y en ensayos de actividad Ca^{2+}-ATPasa mostró un IC_{50} de 3,3 µM. Según nuestro estudio de acoplamiento molecular, este compuesto hace contactos cortos con residuos presentes en las hélices transmembranales **M1** (Arg62, Gln63, Phe64, His66, Leu68, Ile69, Leu72), **M2** (Val94, Val95, Asn98, Ala99, Gly102, Gln105, Glu106), **M3** (Thr242, Leu245, Ala246, Phe248, Ser249, Leu252) y **M4** (Pro290, Glu291, Leu293, Pro294); la mayoría de estos residuos corresponden a los identificados también previamente en el sitio de unión de ligando B, ocupando el canal de acceso al calcio, su modo de unión es similar a su referencia (ligando B) en 0,486 o 48,6% según el coeficiente de Tanimoto calculado. Este compuesto presenta un valor de Log P = 5,00 (justo en el límite establecido en las reglas de Lipinski, **Tabla 6-1**).

Tabla 6-6. Residuos de CtpF con los que interactúan los compuestos activos, todos los residuos se encuentran a una distancia máxima de 4,0 Å

Farmacóforo	Compuesto	Residuos a 4,0 Å	Coeficiente de Tanimoto
Modelo 2	**ZINC04030361**	**M1** (Arg62, Gln63, Phe64, His66, Leu68, Ile69, Leu72), **M2** (Val94, Val95, Asn98, Ala99, Gly102, Gln105, Glu106), **M3** (Thr242, Leu245, Ala246, Phe248, Ser249, Leu252), **M4** (Pro290, Glu291, Leu293, Pro294)	0,486
Modelo 3	**ZINC09731847**	**M1** (Gln63, His66, Leu68, Ile69, Leu72), **M2** (Val95, Asn98), **M3** (Thr242, Lys244, Leu245, Ala246, Trp247, Phe248, Ser249), **M4** (Ile289, Pro290, Glu291, Leu293, Pro294, Val297), **M5** (Leu706), **M6** (Pro768, Leu769, Leu770)	0,287

El compuesto ZINC09731847, obtenido de la lista proveniente del farmacóforo **modelo 3**, inhibió el crecimiento de *Mtb* a una concentración de 100 µg/mL, y mostró un IC_{50} de 7,6 µM. Este ligando muestra un modo de unión diferente al ligando de referencia (ligando C), similar en 0,287 o 28,7 % según el coeficiente de Tanimoto, ya que además de interactuar con la mayoría de los aminoácidos previamente mencionados en los segmentos **M1**, **M2**, **M3** y **M4** para el ligando ZINC04030361 y el ligando C (que corresponden al canal de acceso de calcio), también se muestran interacciones con los aminoácidos mayormente hidrofóbicos de segmentos **M5** (Leu706) y **M6** (Pro768, Leu769, Leu770). Las interacciones de este ligando con los residuos antes mencionados pueden ser resultado de su naturaleza mayormente hidrofóbica al considerar su valor de Log P (5,54). Estos resultados sugieren que, aunque este ligando tiene un probable modo de unión diferente a su molécula de referencia, también logra inhibir la actividad Ca^{2+}-ATPasa de CtpF con resultados *in vitro* comparables a los de los ligandos del estudio anterior[15].

Los resultados de estos dos acoplamientos moleculares muestran que entre los residuos comunes con los que interactúan estas moléculas se hallan la Gln63, His66, Leu68, Leu245 y Pro294; estos residuos también se identificaron como importantes para la interacción P-L en las simulaciones de dinámica molecular de los ligandos de referencia de este estudio en este estudio y en los acoplamientos moleculares del estudio previo realizado en nuestro grupo[15]. Por lo tanto, debido a su frecuente presencia, las interacciones con estos residuos

se identifican como potencialmente importantes para la inhibición de la actividad ATPasa de la enzima CtpF, y por ende también podrían relacionarse con la viabilidad de *Mtb*. Adicionalmente, aunque el ligando ZINC04030361 obtuvo los mejores resultados en los ensayos *in vitro*, el ligando ZINC09731847 también logró inhibir no solo el crecimiento de *Mtb* sino también la actividad Ca^{2+}-ATPasa, esto aunque posee un Log P mayor a lo sugerido para un fármaco de administración oral, y un modo de unión diferente a cualquiera de los ligandos que mostraron inhibición de la actividad Ca^{2+}ATPasa del estudio anterior, ya que interactúa con residuos de los segmentos transmembranales **M5** y **M6**, por lo tanto, en posibles futuros estudios resulta interesante explorar este espacio en búsqueda de nuevos inhibidores.

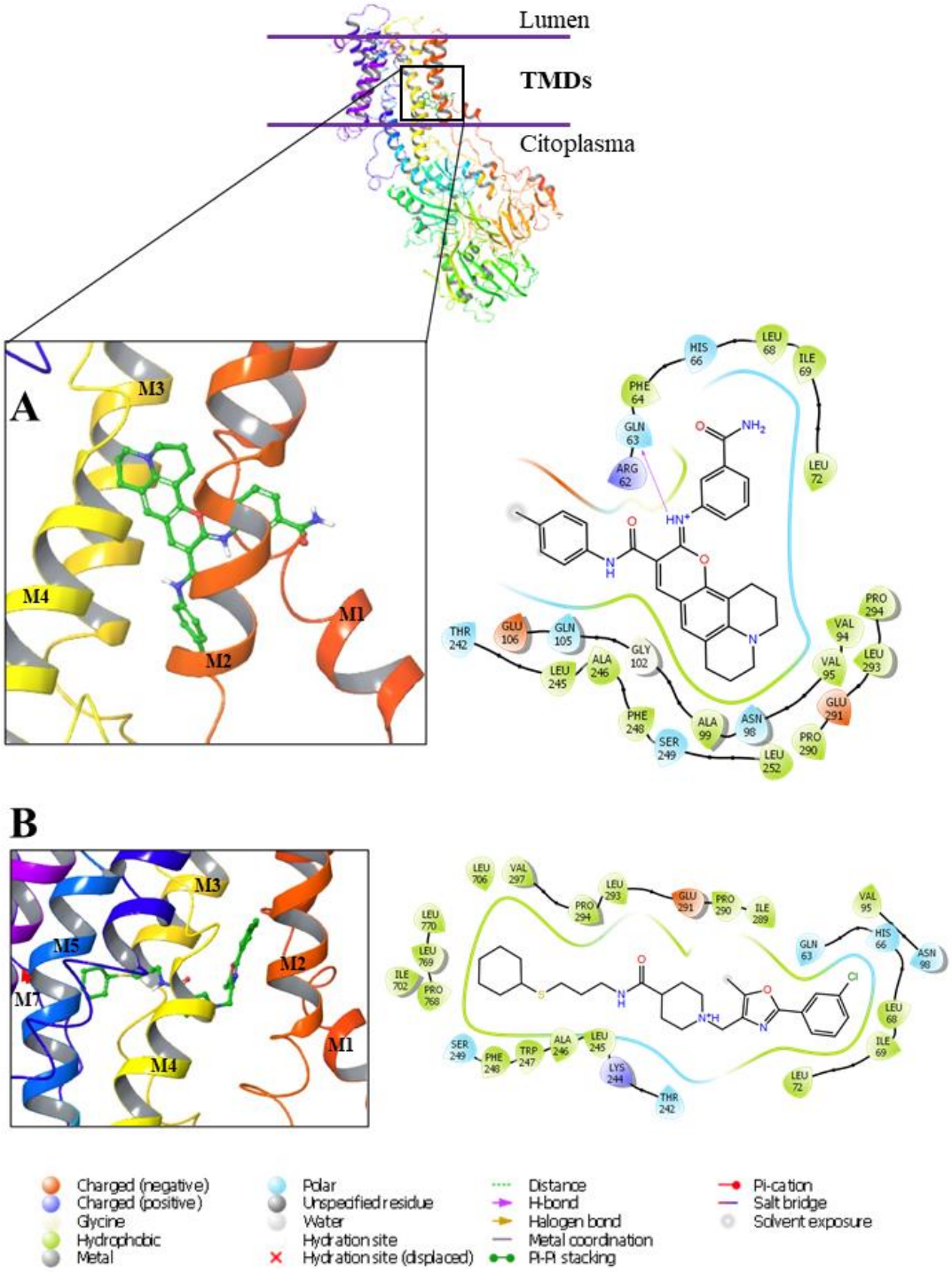


Figura 6-7. Modos de unión 3D y 2D a CtpF de los compuestos activos. **A.** ZINC04030361. **B.** ZINC09731847.

7. Conclusiones

Se identificaron once compuestos con potencial de inhibir el crecimiento de *Mtb* y la actividad Ca^{2+}-ATPasa mediada por CtpF, mediante una estrategia basada en acoplamiento molecular, cálculos de energía MM-GBSA, cálculos de huella digital molecular de interacción P-L y propiedades *drug-like*, estos compuestos presentaron valores de energía libre de unión menores que las de sus ligandos de referencia.

Se encontraron cuatro nuevos inhibidores del crecimiento de *Mtb* entre los candidatos iniciales, ZINC57418826 (CMI: 200,0 µg/mL), ZINC12547355 (CMI: 100 µg/mL), ZINC09731847 (CMI: 100 µg/mL) y ZINC040330361 (CMI: 25,0 µg/mL). El compuesto ZINC04030361 fue el candidato más activo, pues mostró la menor CMI y una disminución del 50 % (IC_{50} = 3,3 µM) de la actividad Ca^{2+}-ATPasa mediada por CtpF en vesículas de membrana de *Mtb*. Los ensayos *in vitro* indican que este compuesto posee una citotoxicidad del 27,2 % a 200 µg/mL, y muestra una hemólisis de 0,2 % a la misma concentración, además esta molécula presenta un perfil farmacocinético adecuado para un fármaco de administración oral (*drug-like)*.

Los resultados de la estrategia implementada en el presente estudio representan un avance en nuestra búsqueda y desarrollo de anti-TB alternativos, ya que se logró identificar un nuevo compuesto que inhibe el crecimiento de *Mtb* y la actividad Ca^{2+}-ATPasa mediada por CtpF a una menor concentración que la de los ligandos de referencia. Se trataría entonces de una molécula dirigida a una diana alternativa a cualquiera de los anti-TB de primera o segunda línea hasta ahora reportados.

8. Recomendaciones y perspectivas

Se propone a futuro evaluar el efecto del compuesto ZINC04030361 sobre una cepa de *Mtb* resistente a alguno de los fármacos anti-TB de primera línea, con el fin de establecer si pudiera ser una alternativa para el diseño de compuestos con potencial para el control de la resistencia.

En estudios futuros basados en acoplamiento molecular, energía libre de unión y dinámica molecular, sería conveniente efectuar mutaciones sobre los residuos Gln63, His66, Leu68, Leu245 y Pro294 de CtpF, de forma que se pueda evaluar su importancia para la unión de las moléculas que han probado tener actividad.

Se sugieren evaluaciones en conjunto del compuesto ZINC04030361 con alguno de los fármacos de primera línea, con el fin de establecer si puede existir un efecto sinérgico sobre la inhibición del crecimiento de *Mtb*.

La evaluación del compuesto ZINC04030361 sobre un modelo *in vivo* en ratones permitiría comparar su efectividad respecto a los fármacos de uso clínico, además de evaluar su toxicidad y selectividad, aspectos importantes en el desarrollo de nuevos fármacos anti-TB.

9. Bibliografía

1. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2021*. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf (2021) doi:ISBN 978-92-4-003702-1.

2. Pai, M. *et al.* Tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, (2016).

3. Dheda, K. *et al.* The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. *Lancet Respir. Med.* **5**, 291–360 (2017).

4. Cassir, N., Rolain, J.-M. & Brouqui, P. A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Frontiers in Microbiology* **5,** (2014).

5. Padilla-Benavides, T., Long, J. E., Raimunda, D., Sassetti, C. M. & Argüello, J. M. A Novel P_{1B}-type Mn^{2+}-transporting ATPase Is Required for Secreted Protein Metallation in Mycobacteria *. *J. Biol. Chem.* **288**, 11334–11347 (2013).

6. Gengenbacher, M. & Kaufmann, S. H. E. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 514–532 (2012).

7. Prosser, G. *et al.* The bacillary and macrophage response to hypoxia in tuberculosis and the consequences for T cell antigen recognition. *Microbes Infect.* **19**, 177–192 (2017).

8. Novoa-Aponte, L. *et al.* In silico identification and characterization of the ion transport specificity for P-type ATPases in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *BMC Struct. Biol.* **12**, 1–12 (2012).

9. Ward, S. K., Abomoelak, B., Hoye, E. A., Steinberg, H. & Talaat, A. M. CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **77**, 1096–1110 (2010).

10. Raimunda, D., Long, J. E., Padilla-Benavides, T., Sassetti, C. M. & Argüello, J. M. Differential roles for the Co^{2+}/Ni^{2+} transporting ATPases , CtpD and CtpJ , in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol. Microbiol.* **91**, 185–197 (2014).

11. Maya-Hoyos, M., Rosales, C., Novoa-Aponte, L., Castillo, E. & Soto, C. Y. The P-type

ATPase CtpF is a plasma membrane transporter mediating calcium efflux in *Mycobacterium tuberculosis* cells. *Heliyon* **5**, (2019).

12. Novoa-Aponte, L. & Soto Ospina, C. Y. *Mycobacterium tuberculosis* P-Type ATPases: Possible Targets for Drug or Vaccine Development. *Biomed Res. Int.* (2014).

13. Pulido, P. A., Novoa-Aponte, L., Villamil, N. & Soto, C. Y. 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**, 604–610 (2014).

14. Krishna, S., Pulcini, S., Fatih, F. & Staines, H. Artemisinins and the biological basis for the PfATP6/SERCA hypothesis. *Trends Parasitol.* **26**, 517–523 (2010).

15. Santos, P. *et al.* Identification of *Mycobacterium tuberculosis* CtpF as a target for designing new antituberculous compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **28**, (2020).

16. Laursen, M. *et al.* Cyclopiazonic acid is complexed to a divalent metal ion when bound to the sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase. *J. Biol. Chem.* **284**, 13513–13518 (2009).

17. Bublitz, M., Morth, J. P. & Nissen, P. P-type ATPases at a glance. *J. Cell Sci.* **124**, 2515–2519 (2011).

18. O'Garra, A. *et al.* The Immune Response in Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 475–527 (2013).

19. Cook, G. M. *et al.* Physiology of Mycobacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **55**, 81–319 (2009).

20. Dulberger, C. L., Rubin, E. J. & Boutte, C. C. The mycobacterial cell envelope — a moving target. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**, 47–59 (2020).

21. Daffé, M. The Global Architecture of the Mycobacterial Cell Envelope. *The Mycobacterial Cell Envelope*. 1–11 (2008)

22. Ortalo-Magné, A. *et al.* Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology* **141**, 1609–1620 (1995).

23. Daffé, M. & Draper, P. The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to their Pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* **39**, 131–203 (1997).

24. Knechel, N. A. Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Crit. Care Nurse* **29**, 34–43 (2009).

25. Jackson, M. The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, (2014).

26. Rinder, H., Mieskes, K. T. & Löscher, T. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **5**, 339–345 (2001).

27. Ernst, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 581–591 (2012).

28. Ehrt, S., Schnappinger, D. & Rhee, K. Y. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 496–507 (2018).

29. Via, L. E. *et al.* Tuberculous Granulomas Are Hypoxic in Guinea Pigs, Rabbits, and Nonhuman Primates. *Infect. Immun.* **76**, 2333–2340 (2008).

30. Singh, R. *et al.* Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Appl. Microbiol.* **128**, 1547–1567 (2020).

31. Koul, A., Arnoult, E., Lounis, N., Guillemont, J. & Andries, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* **469**, 483–490 (2011).

32. Horsburgh, C. R., Barry, C. E. & Lange, C. Treatment of Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2149–2160 (2015).

33. Prestinaci, F., Pezzotti, P. & Pantosti, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog. Glob. Health* **109**, 309–318 (2015).

34. Zumla, A. I. *et al.* New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *Lancet. Infect. Dis.* **14**, 327–340 (2014).

35. Guo, H. *et al.* Structure of mycobacterial ATP synthase bound to the tuberculosis drug bedaquiline. *Nature* **589**, 143–147 (2021).

36. Lodish, H. *et al. Molecular Cell Biology*. (2016).

37. Nelson, D. L. & Michael, C. *Lehninger Principles of Biochemistry*. (2017).

38. Alberts, B. *et al. Molecular Biology of the Cell*. (2015).

39. Yatime, L. *et al.* P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1787**, 207–220 (2009).

40. Saffioti, N. A. *et al.* E2P-like states of plasma membrane Ca^{2+}-ATPase characterization of vanadate and fluoride-stabilized phosphoenzyme analogues. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1861**, 366–379 (2019).

41. Palmgren, M. G. & Nissen, P. P-Type ATPases. *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 243–266 (2011).

42. Wang, K. *et al.* Structure and mechanism of Zn^{2+}-transporting P-type ATPases. *Nature* **514**, 518–522 (2014).

43. Hu, G.-B., Rice, W. J., Dröse, S., Altendorf, K. & Stokes, D. L. Three-dimensional structure of the KdpFABC complex of *Escherichia coli* by electron tomography of two-dimensional crystals. *J. Struct. Biol.* **161**, 411–418 (2008).

44. Skou, J. C. The Identification of the Sodium–Potassium Pump (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed.* **37**, 2320–2328 (1998).

45. Kühlbrandt, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 282–295 (2004).

46. Lopez-Marques, R. L., Theorin, L., Palmgren, M. G. & Pomorski, T. G. P4-ATPases: lipid flippases in cell membranes. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **466**, 1227–1240 (2014).

47. León-Torres, A., Novoa-Aponte, L. & Soto, C. CtpA, a putative *Mycobacterium tuberculosis* P-type ATPase, is stimulated by copper (I) in the mycobacterial plasma membrane. *BioMetals* **28**, (2015).

48. López, M., Quitian, L.-V., Calderón, M.-N. & Soto, C.-Y. The P-type ATPase CtpG preferentially transports Cd^{2+} across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Arch. Microbiol.* **200**, 483–492 (2018).

49. Botella, H. *et al.* Mycobacterial P1-Type ATPases Mediate Resistance to Zinc Poisoning in Human Macrophages. *Cell Host Microbe* **10**, 248–259 (2011).

50. Novoa Aponte, L. Potencial de las ATPasas tipo P como dianas terapéuticas o en el diseño de mutantes atenuados de *Mycobacterium tuberculosis*. *Universidad Nacional de Colombia* (2017).

51. Primeau, J. O., Armanious, G. P., Fisher, M. E. & Young, H. S. The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase BT - Membrane Protein Complexes: Structure and Function. *Harris, J. R. & Boekema, E.* 229–258 (2018).

52. Musgaard, M., Thøgersen, L., Schiøtt, B. & Tajkhorshid, E. Tracing Cytoplasmic Ca2+ Ion and Water Access Points in the Ca^{2+}-ATPase. *Biophys. J.* **102**, 268–277 (2012).

53. Chourasia, M. & Sastry, G. N. The nucleotide, inhibitor, and cation binding sites of P-type II ATPases. *Chem. Biol. Drug Des.* **79**, 617–627 (2012).

54. Seidler, N. W., Jona, I., Vegh, M. & Martonosi, A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+}-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **264**, 17816–17823 (1989).

55. Moncoq, K., Trieber, C. A. & Young, H. S. The Molecular Basis for Cyclopiazonic Acid Inhibition of the Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump. *J. Biol. Chem.* **282**, 9748–9757 (2007).

56. Park, H.-D. *et al.* Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic

response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **48**, 833–843 (2003).

57. L., L. R. *et al.* The *Mycobacterium tuberculosis* DosR Regulon Assists in Metabolic Homeostasis and Enables Rapid Recovery from Nonrespiring Dormancy . *J. Bacteriol.* **192**, 1662–1670 (2010).

58. Santos, P., López-Vallejo, F. & Soto, C. Y. In silico approaches and chemical space of anti-P-type ATPase compounds for discovering new antituberculous drugs. *Chem. Biol. Drug Des.* **90**, 175–187 (2017).

59. Koseki, Y. & Shunsuke, A. Computational Medicinal Chemistry for Rational Drug Design: Identification of Novel Chemical Structures with Potential Anti-Tuberculosis Activity. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 176–188 (2014).

60. Thomas G. Fundamentals of Medicinal Chemistry. *John Wiley Sons, West Sussex* 79–80 (2003).

61. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23**, 3–25 (1997).

62. Lipinski, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **44**, 235–249 (2000).

63. Beutler, J. A. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **46**, (2009).

64. Ganesan, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 306–317 (2008).

65. Sheridan, R. P. & Venkataraghavan, R. New methods in computer-aided drug design. *Acc. Chem. Res.* **20**, 322–329 (1987).

66. Hertzberg, R. P. & Pope, A. J. High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 445—451 (2000).

67. Kapetanovic, I. M. Computer-aided drug discovery and development (CADDD): In silico-chemico-biological approach. *Chem. Biol. Interact.* **171**, 165–176 (2006).

68. Macalino, S. J. Y., Gosu, V., Hong, S. & Choi, S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 1686–1701 (2015).

69. Jorgensen, W. L. The many roles of computation in drug discovery. *Science* **303**, 1813–1818 (2004).

70. Kier, L. B. & Hall, L. H. The Generation of Molecular Structures from a Graph-Based QSAR Equation. *Quant. Struct. Relationships* **12**, 383–388 (1993).

71. Pandit, D., So, S.-S. & Sun, H. 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**, 1236–1244 (2006).

72. López-Vallejo, F., Medina Franco, J. L. & Castillo, R. Diseño de fármacos asistido por computadora. *Educ. Química* **17**, (2006).

73. Ramírez, D. Computational Methods Applied to Rational Drug Design. *Open Med. Chem. J.* **10**, 7–20 (2016).

74. Menchaca, T. M. Past, Present, and Future of Molecular Docking. *IntechOpen* **2**, (2020).

75. Bowers, K. J. *et al.* Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing* 84 (2006).

76. Koes, D. R. & Camacho, C. J. ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Res.* **40**, 409–414 (2012).

77. Wolber, G. & Langer, T. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *J. Chem. Inf. Model.* **45**, 160–169 (2005).

78. Veber, D. F. *et al.* Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **45**, 2615–2623 (2002).

79. Schrödinger LLC. LigPrep. (2021).

80. Friesner, R. A. *et al.* Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein−Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **49**, 6177–6196 (2006).

81. Friesner, R. A. *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **47**, 1739–1749 (2004).

82. Jacobson, M. P. *et al.* A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins* **55**, 351–367 (2004).

83. Palomino, J.-C. *et al.* Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2720–2722 (2002).

84. Khalifa, R. A., Nasser, M. S., Gomaa, A. A., Osman, N. M. & Salem, H. M. 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 (2013).

85. Anandi, M., Mirtha, C., Françoise, P. & Carlos, P. J. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3616–3619 (2003).

86. Basu, J., Chattopadhyay, R., Kundu, M. & Chakrabarti, P. Purification and partial characterization of a penicillin-binding protein from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **174**, 4829 - 4832 (1992).

87. Santos, P., Gordillo, A., Osses, L., Salazar, L.-M. & Soto, C.-Y. Effect of antimicrobial peptides on ATPase activity and proton pumping in plasma membrane vesicles obtained from mycobacteria. *Peptides* **36**, 121–128 (2012).

88. Johansson, F., Olbe, M., Sommarin, M. & Larsson, C. 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 (1995).

89. Zor, T. & Selinger, Z. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Anal. Biochem.* **236**, 302–308 (1996).

90. Cariani, L., Thomas, L., Brito, J. & del Castillo, J. . Bismuth citrate in the quantification of inorganic phosphate and its utility in the determination of membrane-bound phosphatases. *Anal. Biochem.* **324**, 79–83 (2004).

91. León-Torres, A., Novoa-Aponte, L. & Soto, C. Y. CtpA, a putative *Mycobacterium tuberculosis* P-type ATPase, is stimulated by copper (I) in the mycobacterial plasma membrane. *BioMetals* **28**, 713–724 (2015).

92. Kyaw, A., Maung-U, K. & Toe, T. Determination of inorganic phosphate with molybdate and Triton X-100 without reduction. *Anal. Biochem.* **145**, 230–234 (1985).

93. Bers, D. M., Patton, C. W. & Nuccitelli, R. Chapter 1 - A Practical Guide to the Preparation of Ca^{2+} Buffers. in *Calcium in Living Cells* **99** 1–26 (2010).

94. Fabiato, A. B. T.-M. in E. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods in Enzymology* **157**, 378–417 (1988).

95. Ayala-Torres, C., Novoa-Aponte, L. & Soto, C. Y. 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 (2015).

96. Sikdar, R., Ganguly, U., Pal, P., Mazumder, B. & Sen, P. C. Biochemical

characterization of a calcium ion stimulated-ATPase from goat spermatozoa. *Mol. Cell. Biochem.* **103**, 121–130 (1991).

97. Nugraha, A. T. *et al.* Cytotoxic activity of flavonoid from local plant *Eriocaulon cinereum* R.B against MCF-7 breast cancer cells. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **12**, 425–429 (2021).

98. Muñoz, M. *et al.* Comparative genomics identifies potential virulence factors in *Clostridium tertium* and *C. paraputrificum*. *Virulence* **10**, 657–676 (2019).

99. Braga, A. A. *et al.* Antibacterial and Hemolytic Activity of a new Lectin Purified from the Seeds of Sterculia Foetida L. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **175**, 1689–1699 (2015).

100. Di Marino, D., D'Annessa, I., Coletta, A., Via, A. & Tramontano, A. Characterization of the differences in the cyclopiazonic acid binding mode to mammalian and *P. Falciparum* Ca^{2+} pumps: A computational study. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **83**, 564–574 (2015).

101. Rodríguez, Y. & Májeková, M. Structural Changes of Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase Induced by Rutin Arachidonate: A Molecular Dynamics Study. *Biomolecules* **10**, (2020).

102. Sahakyan, H. Improving virtual screening results with MM/GBSA and MM/PBSA rescoring. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **35**, 731–736 (2021).

103. Gilson, M. K. & Zhou, H.-X. Calculation of protein-ligand binding affinities. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 21–42 (2007).

104. Aparna, V., Dineshkumar, K., Mohanalakshmi, N., Velmurugan, D. & Hopper, W. 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**, (2014).

105. Deng, Z., Chuaqui, C. & Singh, J. Structural Interaction Fingerprint (SIFt): A Novel Method for Analyzing Three-Dimensional Protein−Ligand Binding Interactions. *J. Med. Chem.* **47**, 337–344 (2004).

106. Abdelshaheed, M. M., Fawzy, I. M., El-Subbagh, H. I. & Youssef, K. M. Piperidine nucleus in the field of drug discovery. *Futur. J. Pharm. Sci.* **7**, 188 (2021).

107. Kourounakis, A. P., Xanthopoulos, D. & Tzara, A. Morpholine as a privileged structure: A review on the medicinal chemistry and pharmacological activity of morpholine containing bioactive molecules. *Med. Res. Rev.* **40**, 709–752 (2020).

108. Gramec, D., Peterlin Mašič, L. & Sollner Dolenc, M. Bioactivation potential of thiophene-containing drugs. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 1344–1358 (2014).

109. Heinrichs, M. T. *et al. Mycobacterium tuberculosis* Strains H37ra and H37rv have equivalent minimum inhibitory concentrations to most antituberculosis drugs. *Int. J. mycobacteriology* **7**, 156–161 (2018).

110. Bemer-Melchior, P., Bryskier, A. & Drugeon, H. B. Comparison of the *in vitro* activities of rifapentine and rifampicin against *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, 571–576 (2000).

111. Suo, J., Chang, C. E., Lin, T. P. & Heifets, L. B. Minimal inhibitory concentrations of isoniazid, rifampin, ethambutol, and streptomycin against *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated before treatment of patients in Taiwan. *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**, 999–1001 (1988).

112. Vilchèze, C. Mycobacterial Cell Wall: A Source of Successful Targets for Old and New Drugs. *Applied Sciences* **10**, (2020).

113. Chen, P., Gearhart, J., Protopopova, M., Einck, L. & Nacy, C. A. Synergistic interactions of SQ109, a new ethylene diamine, with front-line antitubercular drugs *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 332–337 (2006).

114. Salomon, J. J. *et al.* Biopharmaceutical *in vitro* characterization of CPZEN-45, a drug candidate for inhalation therapy of tuberculosis. *Ther. Deliv.* **4**, 915–923 (2013).

115. Monalisa, C. *et al.* 1,4-Azaindole, a Potential Drug Candidate for Treatment of Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 5325–5331 (2014).

116. Watkins, W. M. *et al.* Effectiveness of amodiaquine as treatment for chloroquine-resistant *plasmodium falciparum* infections in kenya. *Lancet* **323**, 357–359 (1984).

117. Wongsrichanalai, C. *et al. In vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates in Vietnam to artemisinin derivatives and other antimalarials. *Acta Trop.* **63**, 151–158 (1997).

118. Labrador, V., Fernández Freire, P., Pérez Martín, J. M. & Hazen, M. J. Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole in Vero cells. *Cell Biol. Toxicol.* **23**, 189–199 (2007).

119. Othmen, Z. O.-B., Golli, E. El, Abid-Essefi, S. & Bacha, H. Cytotoxicity effects induced by Zearalenone metabolites, α Zearalenol and β Zearalenol, on cultured Vero cells. *Toxicology* **252**, 72–77 (2008).

120. Ge, F. *et al. In vitro* synergistic interactions of oleanolic acid in combination with isoniazid, rifampicin or ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Microbiol.* **59**, 567–572 (2010).

121. Mohyeldin, S. M., Mehanna, M. M. & Elgindy, N. A. The relevancy of controlled nanocrystallization on rifampicin characteristics and cytotoxicity. *Int. J. Nanomedicine* **11**, 2209–2222 (2016).

122. Smitha, K. T., Nisha, N., Maya, S., Biswas, R. & Jayakumar, R. Delivery of rifampicin-chitin nanoparticles into the intracellular compartment of polymorphonuclear leukocytes. *Int. J. Biol. Macromol.* **74**, 36–43 (2015).

123. International Standard Organization. ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. 34 (2009).

124. Clara, A.-P. *et al.* Synergy between Circular Bacteriocin AS-48 and Ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2022).