

Validación de inhibidores putativos de los transportadores de membrana de la familia MmpL de *Mycobacterium tuberculosis* como agentes antimicrobianos con potencial terapéutico

Jeimmy K. Molina-Barrera¹, Mauricio Rojas-López^{1,2},
Erick Alejandro Meneses-Ramírez³

RESUMEN

Presentación: la tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa transmitida por el *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Este patógeno provocó 10 millones de contagios y 1,2 millones de muertes en el 2020. En Colombia, en el 2021, la tasa de incidencia de tuberculosis de todas las formas fue de 23.89 por cada 100.000 habitantes y presentó un aumento de 4.31 con respecto al 2020 (19.58 por 100.000 habitantes); no obstante, el número de casos sensibles al tratamiento convencional (rifampicina, isoniacida, etambutol y pirazinamida) es del 80%, haciendo evidente la necesidad de nuevos agentes terapéuticos, ya que además hubo un 0.6 casos por cada 100.000 habitantes de tuberculosis farmacorresistente en el 2021 presentando un aumento de 0.14 con respecto al 2020.

Planteamiento del problema: han sido reportados 13 transportadores de membrana micobacteriana (MmpL) esenciales para supervivencia, críticos para la síntesis de su pared y activos durante el estrés generado dentro del huésped e interfiriendo con la eficacia de los mecanismos inmunitarios.

MmpL3 participa en el transporte de monomicolatos de trehalosa, hierro Hemo y ácidos micólicos, es esencial para la supervivencia y el mantenimiento de la micomembrana contribuyendo a su patogenicidad. MmpL11 transporta ésteres de cera de micolato y triacilglicérol de cadena larga, importantes

¹ Grupo de Inmunología celular e Inmunogenética, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia (UDEA), Medellín, Colombia.

² Unidad de Citometría de Flujo, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia (UDEA), Medellín, Colombia.

³ Profesor universitario Universidad Ces, Medellín, Colombia.

Correspondencia : jeimmy.molina@udea.edu.co, mauricio.rojas@udea.edu.co

Financiación del proyecto: Colciencias

para la formación de biopelículas y supervivencia durante la latencia.

Mediante acoplamiento molecular (“*docking*”) *in silico* a los dominios periplásmicos I y II (D1 y D2) de las MmpL3 y 11 se seleccionaron compuestos para segundo uso: Digoxina (D, utilizado para el tratamiento de insuficiencia cardíaca), Ácido Glicirrico (AG, anti-herpético) y Bizoctrizol (B, bloqueador de rayos UV), Cardiogreen (C, tinción para diagnóstico médico), Glecaprevir (G, anti-hepático de la proteína NS5A), Ledipasvir (L, anti-hepático de la proteína NS3/4A), Midostaurin (M, inhibidor de la actividad de proteínas cinasas), Rifamicina (R, antibiótico de amplio espectro). Con estos compuestos se desarrolla el proyecto que busca seleccionar compuestos capaces de inhibir la replicación intracelular de *Mtb* H37Rv en macrófagos murinos B10R.

Objetivo general: evaluar *in vitro* la capacidad de inhibir la replicación intracelular de *M. tuberculosis* de inhibidores putativos de los transportadores de membrana MmpL3 y MmpL11 seleccionados mediante de “acoplamiento” molecular.

Metodología: las concentraciones no tóxicas de los compuestos candidatos se evaluaron mediante citometría de flujo basándose en concentraciones séricas reportadas. Se evaluó la función mitocondrial y daño en membrana de los macrófagos B10R(27) con DIOC₆ y PI, respectivamente. Se evaluó el ciclo celular en células fijadas con etanol a -20°C, teñidas con PI/RNAasa.

Establecidas las concentraciones no tóxicas, los macrófagos se infectaron con *Mtb* H37Rv (MOI 5:1), se evaluó el daño mitocondrial y en membrana celular, el ciclo celular y la exposición de fosfatidil serina. En sobrenadantes se analizaron citoquinas con CBA. Mediante el recuento de UFC, se evaluó el crecimiento intracelular de la *Mtb* en los macrófagos B10R.

Resultados: el rango de concentraciones [2.8-79nM] para evaluar sobre las células, se determinó bajo tres condiciones: no comprometer la integridad de la membrana, tener el mínimo efecto en la mitocondria y no afectar el ciclo celular hasta las 72h.

Los ensayos con los macrófagos B10R infectados H37Rv (MOI 5:1) mostraron que, a las 48h AG, B, D, L,

G y C[5.7nM] indujeron daño en la membrana plasmática y una disminución en el porcentaje de células con alta captación de DIOC₆ y sin incremento evidente en el número de células con daño mitocondrial (DIOC₆^{low}), en comparación con las células no infectadas.

A las 72h B y C, incrementaron con baja significancia el número de células con daño mitocondrial, G y R indujo daño en membrana y D tuvo ambos efectos en este tiempo en las células infectadas comparadas con las no infectadas. Se observó un incremento con baja significancia en la exposición de la fosfatil-serina en las células tratadas con AG, B, D y G. Ningún compuesto indujo aumento en fragmentación extensiva del DNA en presencia de *Mtb*.

En el primer ensayo, ya que aún no se han completado las réplicas experimentales, AG[12.2nM], C[5.7nM], R[12 y 24nM] inhibieron en el crecimiento de *Mtb* a las 72h. En presencia de los compuestos a las 48 y 72h hubo reducción en la acumulación de IL-10, IFN γ e IL-12p70. Únicamente la IL-12p70 fue mayor en presencia de *Mtb*.

Se harán análisis jerárquicos para seleccionar los compuestos más eficaces sobre *Mtb* e inocuos sobre los macrófagos y valorar los efectos sobre las células como futura alternativa al tratamiento anti-TB.

PALABRAS CLAVE

Cell Envelope; Inhibitors Tuberculosis; *Mycobacterium Tuberculosis*; Mmpl

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2021 [Internet]. World Health Organization 2021. 2021 [cited 2022 Jan 25]. p. 57. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>
2. Pinzon Lisette, Instituto Nacional Salud. Tuberculosis farmacoresistente [Internet]. Periodo epidemiológico XII. Colombia 2021. 2021 [cited 2022 Jan 25]. Available from: www.ins.gov.co
3. Ruiz Gómez F, Alexander L, Osorio M, Trujillo JT, Andrés Ó, Martínez C, et al. Informe de evento Tuberculosis año 2021. Bogotá; 2021.
4. Székely R, Cole ST. Mechanistic insight into mycobacterial MmpL protein function. *Molecular Microbiology*. 2016;99(5):831–4.
5. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry* [Internet]. 1995;64:29–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7574484>
6. Degiacomi G, Benjak A, Madacki J, Boldrin F, Proveddi R, Palù G, et al. Essentiality of mmpL3 and impact of its silencing on *Mycobacterium tuberculosis* gene expression. *Scientific Reports* [Internet]. 2017;7:43495. Available from: <http://files/590/Degiacomi et al. - 2017 - Essentiality of mmpL3 and impact of its silencing .pdf>
7. Wright CC, Hsu FF, Arnett E, Dunaj JL, Davidson PM, Pacheco SA, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* MmpL11 Cell Wall Lipid Transporter Is Important for Biofilm Formation, Intracellular Growth, and Nonreplicating Persistence. *Infection and Immunity*. 2017 Feb 23;85(8).
8. Bailo R, Bhatt A, Aínsa JA. Lipid transport in *Mycobacterium tuberculosis* and its implications in virulence and drug development. *Biochemical Pharmacology*. 2015;96(3):159–67.
9. Keeley J. Se entienden nuevos detalles de la infección tuberculosa. HHMI.org. 2020 Mar 17;
10. Wells RM, Jones CM, Xi Z, Speer A, Danilchanka O, Doornbos KS, et al. Discovery of a siderophore export system essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*. 2013;9(1):e1003120.
11. Ma S, Huang Y, Xie F, Gong Z, Zhang Y, Stojkoska A, et al. Transport mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* MmpL/S family proteins and implications in pharmaceutical targeting. *Biological Chemistry*. 2020 Jun 9;401(3):331–48.
12. Grzegorzewicz AE, Pham H, Gundi VAKB, Scherman MS, North EJ, Hess T, et al. Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Nature Chemical Biology*. 2012 Apr 20;8(4):334–41.
13. Varela C, Rittmann D, Singh A, Krumbach K, Bhatt K, Eggeling L, et al. MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria. *Chemistry and Biology*. 2012;19(4):498–506.
14. Melly G, Purdy G. MmpL Proteins in Physiology and Pathogenesis of *M. tuberculosis*. *Microorganisms*. 2019 Feb 4;7(3):70.

15. Domenech P, Reed MB, Barry CE. Contribution of the Mycobacterium tuberculosis MmpL Protein Family to Virulence and Drug Resistance. *Infection and Immunity* [Internet]. 2005 Feb 15;73(6):3492–501. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1111821/>
16. Li W, Obregón-Henao A, Wallach JB, North EJ, Lee RE, Gonzalez-Juarrero M, et al. Therapeutic potential of the Mycobacterium tuberculosis mycolic acid transporter, MmpL3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(9):5198–207.
17. Pacheco SA, Hsu F-F, Powers KM, Purdy GE. MmpL11 Protein Transports Mycolic Acid-containing Lipids to the Mycobacterial Cell Wall and Contributes to Biofilm Formation in Mycobacterium smegmatis. *The Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2013 Feb 24;288(33):24213–22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3745366/>
18. Chim N, Torres R, Liu Y, Capri J, Batot G, Whitelegge JP et al. The Structure and Interactions of Periplasmic Domains of Crucial MmpL Membrane Proteins from Mycobacterium tuberculosis. *Chemistry and Biology*. 2015;22(8):1098–107.
19. Drugbank. Digoxin: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2021 Nov 20]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00390>
20. Drugbank. Glycyrrhizic acid: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2021 Nov 20]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB13751>
21. Drugbank. Bisotrizole: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2021 Nov 20]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11262>
22. DrugBank. Indocyanine green: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2021 Nov 20]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB09374>
23. DrugBank. Glecaprevir: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2021 Nov 20]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB13879>
24. DrugBank. Ledipasvir: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2021 Nov 20]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB09027>
25. DrugBank. Midostaurin: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2021 Nov 20]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06595>
26. DrugBank. Rifamycin: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2021 Nov 20]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11753>
27. Barrera LF, Kramnik I, Skamene E, Radzioch D. Nitrite production by macrophages derived from BCG-resistant and -susceptible congenic mouse strains in response to IFN- γ and infection with BCG. *Immunology* [Internet]. 1994 [cited 2020 Nov 1];82(3):457–64. Available from: [/pmc/articles/PMC1414881/?report=abstract](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1414881/?report=abstract)