



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE

ISABELLA LETÍCIA ESTEVES BARROS

Alterações no perfil proteico de *Mycobacterium tuberculosis* após exposição à
pirazinamida

Maringá - Paraná
2018

ISABELLA LETÍCIA ESTEVES BARROS

Alterações no perfil proteico de *Mycobacterium tuberculosis* após exposição à
pirazinamida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosilene Fressatti Cardoso.

Maringá
2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

ISABELLA LETÍCIA ESTEVES BARROS

Alterações no perfil proteico de *Mycobacterium tuberculosis* após exposição à pirazinamida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dra. Rosilene Fressatti Cardoso
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Dr. Jane Martha Graton Mikcha
Universidade Estadual de Maringá

Dr. Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 02 de Fevereiro de 2018.

Local de defesa: Bloco 126/sala 01, Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e a todos que me acompanharam e que contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado, iluminado e abençoado até o presente momento. Por ter me dado força e amparo durante os períodos mais difíceis.

Aos meus pais, Alvaro Fabiano Barros e Silvana Maria Esteves Barros, por todo o amor, cuidado e incentivo que me deram durante toda a minha vida. Obrigada por serem exemplo de pessoa e de família que são. Agradeço por acreditarem que eu sou capaz, mesmo quando eu não acredito.

A minha irmã Beatriz Esteves Barros, por me ajudar nos momentos difíceis com seus sábios conselhos. Obrigada por estar ao meu lado sempre.

A minha madrinha Valéria Cristina Esteves, por todo apoio e carinho que me deu durante toda a minha caminhada. Obrigada por sempre me orientar e me amparar quando preciso, por acreditar em mim e por me amar como se fosse sua filha.

A minha avó Carmen Ruiz Esteves, por todos os ensinamentos, cuidados e pelas orações que me dedicou.

Ao meu Avô Osmar Esteves (*in memoriam*), por sempre me apoiar. Saudades eternas.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Rosilene Fressatti Cardoso, pela disponibilidade, confiança e acolhimento, que foram fundamentais para o desenvolvimento dessa pesquisa. Obrigada por ser inspiração e exemplo de pessoa e pesquisadora.

As minhas professoras Dr^a. Paula Zanetti Campanerut-Sá e Dr^a. Luciana Dias Ghiraldi Lopes, por toda a ajuda e dedicação que me proporcionaram durante a realização da pesquisa e da vida acadêmica.

As professoras da Bacteriologia Médica, Prof^a. Dr^a Regiane Bertin de Lima Scodro, Prof^a. Dr^a Katiany Rizzieri Caleffi-Ferraciolli e Prof^a. Dr^a Vera Lucia Dias Siqueira, por todo o aprendizado e ajuda que me proporcionaram durante a vida acadêmica e que se estendeu a pós-graduação.

As minhas amigas Amanda Milene Malacrida e Flávia Franco Veiga, por sempre me darem suporte nos momentos bons e ruins e por todo o companheirismo durante toda nossa graduação até hoje. Vocês são amigas maravilhosas.

A todos os colegas de laboratório, em especial Jan Eduardo Meneguello e Sandra Sayuri Nakamura de Vasconcelos, por toda ajuda no desenvolvimento da pesquisa e dos experimentos.

A todos que me ajudaram até aqui e que participaram direta ou indiretamente desse momento tão importante para mim.

EPÍGRAFE

“Feliz o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento; por que melhor é o lucro que ela dá do que o da prata, e melhor a sua renda do que o ouro mais fino. Mais preciosa é do que pérolas, e tudo o que podes desejar não é comparável a ela.”

Provérbios 3:13-15

Tese elaborada e formatada
conforme as normas da ABNT
(Capítulo I e III) e da publicação
científica (Capítulo II): *Future
Microbiology*, disponível em:
<http://www.futuremedicine.com/page/authors.jsp>

Alterações no perfil protéico de *Mycobacterium tuberculosis* após exposição à pirazinamida

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença bacteriana crônica, infectocontagiosa, causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Apesar de ainda representar um grande problema de saúde mundial, a TB é uma doença curável, pois possui tratamento bem estabelecido e efetivo. A pirazinamida (PZA) é um dos fármacos utilizado no esquema de primeira escolha do tratamento da TB, que atua na população de bacilos semi dormentes presentes em ambiente ácido dentro do macrófago. A PZA atua apenas em pH ácido e não tem seu mecanismo de ação completamente elucidado. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi analisar o perfil proteico de *Mtb* após exposição à PZA. Para isso, a cepa de referência H₃₇Rv de *Mtb* foi exposta a concentração subinibitória de PZA (50 µg/mL) por 12 e 24 horas e as proteínas extraídas foram analisadas por espectrometria de massas. Com este estudo, foi possível identificar a presença de 30 proteínas diferentemente expressas após a exposição à PZA. As principais alterações ocorreram em proteínas relacionadas ao metabolismo intermediário e respiração e em proteínas hipotéticas.

Palavras-chave: Tuberculose, proteômica, pirazinamida, espectrometria de massas, *Mycobacterium tuberculosis*.

Changes in protein profile of *Mycobacterium tuberculosis* after pyrazinamide exposure

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a chronic, infectious-contagious bacterial disease caused primarily by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Although it is still a major global health problem, TB is a curable disease because it has well established and effective treatment. Pyrazinamide (PZA) is one of the drugs used in the first choice TB treatment regimen, which acts on the semi dormant bacilli population present in the acidic environment inside the macrophage. PZA is a drug that acts only at acidic pH and does not have its mechanism of action completely elucidated. Thus, the objective of this study was to analyze the protein profile of *Mtb* after exposure to PZA. For this, *Mtb* reference strain H₃₇Rv was exposed to subinhibitory concentration of PZA (50 µg/mL) for 12 and 24 hours and the extracted proteins were analyzed by mass spectrometry. With this study, it was possible to identify the presence of 30 differently expressed proteins after exposure to PZA. The main alterations occurred in proteins related to intermediate metabolism and respiration and in conserved hypothetical proteins.

Key words: Tuberculosis, proteomics, pyrazinamide, mass spectrometry, *Mycobacterium tuberculosis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1- Casos de TB notificados por idade e gênero em 2016, no Brasil	13
Figura 2- Grupos de países com alta incidência de tuberculose no mundo e as suas áreas de sobreposições	14
Figura 3- Esquema básico para o tratamento da TB em adultos e adolescentes	15
Figura 4- Estrutura da pirazinamida e da nicotinamida	17

CAPITULO II

Figure 1- Network demonstrating protein interaction among all protein differentially expressed during PZA exposure	43
--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	12
1.1 TUBERCULOSE	12
1.2 PIRAZINAMIDA	16
1.3 PROTEÔMICA	18
1.4 JUSTIFICATIVA	20
1.5 OBJETIVOS	21
1.5.1 Objetivo Geral	21
1.5.2 Objetivos Específicos	21
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO II	26
2.1 Manuscrito 1: “Changes in protein profile of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> after pyrazinamide exposure”	27
CAPÍTULO III	44
3.1 Conclusões	44
3.2 Perspectivas	45

CAPÍTULO I

1.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença bacteriana crônica, infectocontagiosa, causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Apesar de ser uma doença suscetível a prevenção, tratamento e cura, milhares de pessoas ainda adoecem e morrem devido a essa doença e suas complicações. Por isso, a TB continua sendo considerada um importante problema de saúde pública mundial (WHO, 2017; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A TB é transmitida via aérea, por meio de gotículas contendo *Mtb*, que são expelidas pelo indivíduo doente bacilífero ao falar, espirrar ou tossir. Quando os bacilos são inalados junto com as gotículas por um indivíduo saudável e chegam aos alvéolos, apresentam capacidade de evasão das defesas imunes naturais e se multiplicam no interior de macrófagos alveolares, dando início ao processo patológico (PANDOLFI et al., 2007; EDWARDS; KIRKPATRICK, 1986).

A doença geralmente acomete os pulmões, causando a TB pulmonar, mas também pode afetar outros órgãos, caracterizando a TB extrapulmonar. A forma pulmonar da doença é a mais comum e a mais preocupante para a saúde pública. Esta forma, além de apresentar tosse, com ou sem expectoração, por mais de três semanas, possui outros sintomas como: cansaço, dor no peito, falta de apetite, perda de peso, febre ao fim do dia acompanhada de suores noturnos e, eventualmente, hemoptise (expectoração com sangue) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; WHO, 2017).

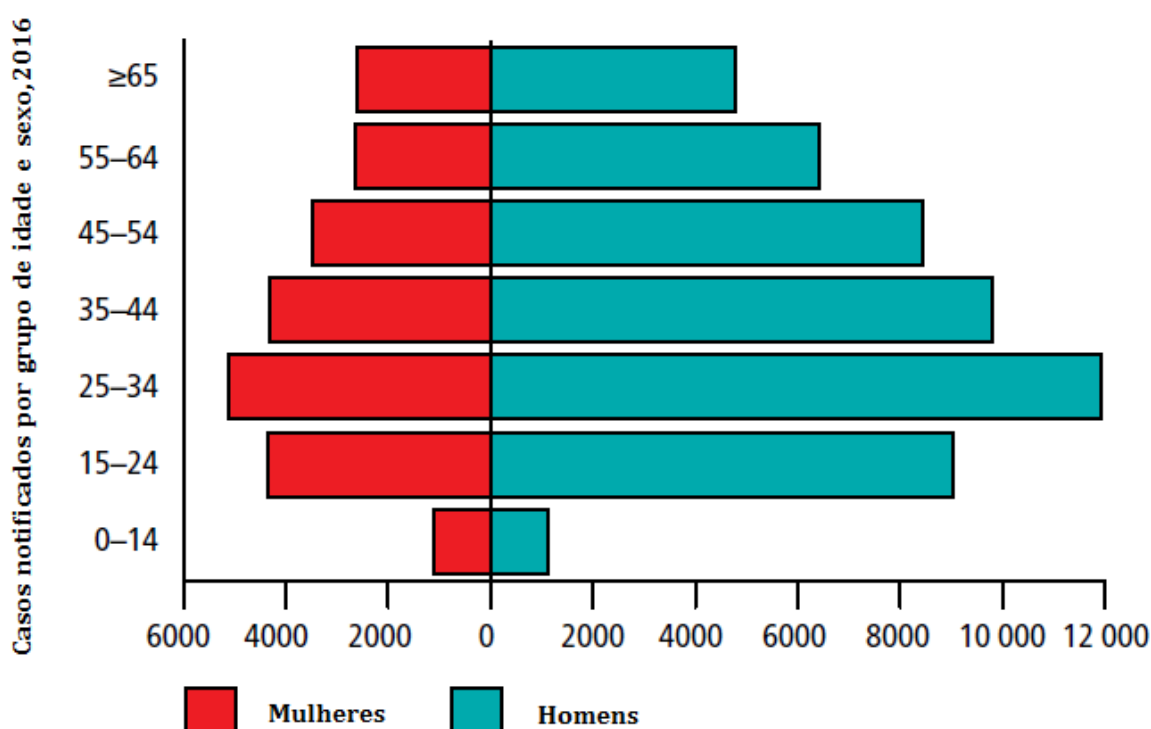
Em 2016, a incidência mundial de TB foi cerca de 10,4 milhões, dos quais 90% eram adultos e 65% estavam entre os homens. Quanto à mortalidade, esta foi estimada em 1.3 milhões. A coinfeção TB/HIV correspondeu a 10% de todos os novos casos de TB com 374 mil mortes. Também estima-se que uma proporção relativamente pequena, de 5 a 15%, dos 1,7 bilhões de pessoas infectadas com *Mtb*, desenvolvem a doença durante a vida. Entretanto, vale ressaltar que pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) são mais propensas a desenvolverem essa patologia (WHO, 2017).

Os casos de TB são mais comuns na população de menor renda e, principalmente, em indivíduos do sexo masculino, que se encontram na faixa etária correspondente a plena

capacidade produtiva, acarretando um enorme prejuízo econômico ao país (Figura 1) (WHO, 2017).

Os fatores que intensificam a disseminação dessa doença incluem: aglomerados humanos, medidas de controle ineficazes, a disseminação de práticas tais como etilismo, tabagismo e consumo de drogas ilícitas e fatores comportamentais e socioeconômicos do paciente como desnutrição, diabetes mellitus, baixa resistência imunológica e abandono de tratamento (LACERDA et al., 2014; WHO, 2017).

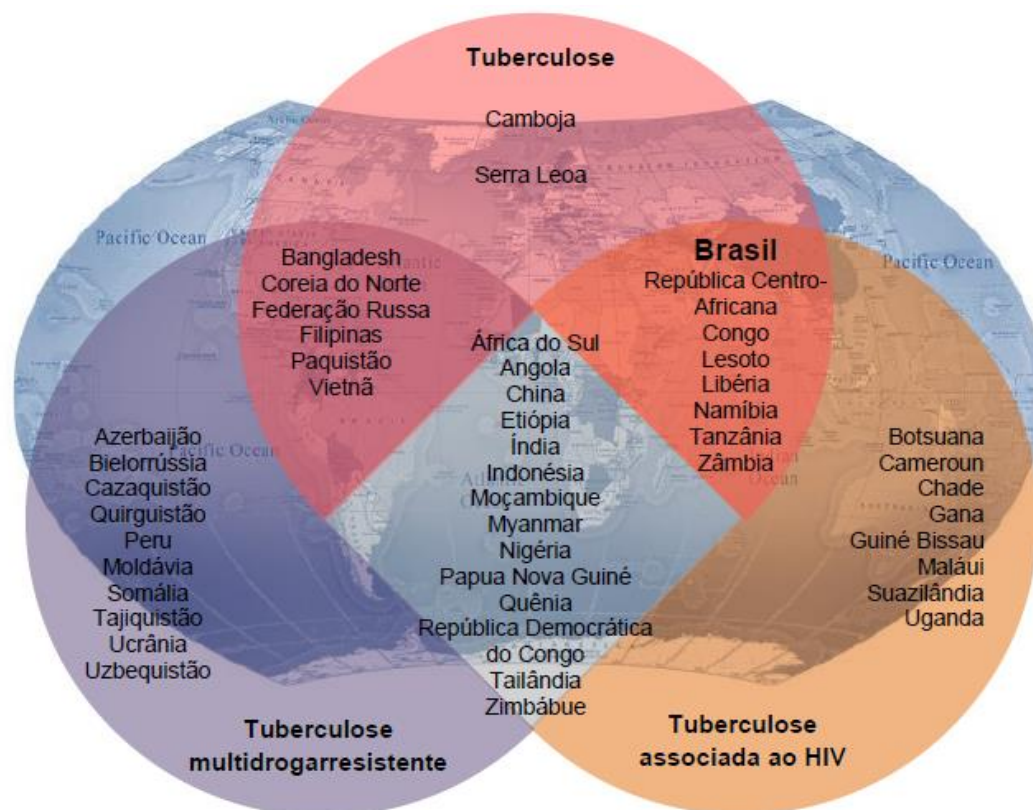
FIGURA 1- CASOS DE TB NOTIFICADOS POR IDADE E GÊNERO EM 2016, NO BRASIL



Fonte: Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017)

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou os países em três grupos conforme suas respectivas incidências de TB, sendo eles: incidência de TB, incidência de TB multidroga resistente (TB-MDR) e incidência da coinfeção TB-HIV. O Brasil faz parte dos 20 países que apresentam as maiores taxas de incidência de TB e de coinfeção TB-HIV, não sendo classificado apenas no grupo dos que exibem altas taxas de resistência ao tratamento (Figura 2) (WHO, 2017).

FIGURA 2- GRUPOS DE PAÍSES COM ALTA INCIDÊNCIA DE TUBERCULOSE NO MUNDO E AS SUAS ÁREAS DE SOBREPOSIÇÕES



Fonte: Organização Mundial da Saúde (BRASIL, 2017)

A TB é uma doença curável em praticamente 100% das novas ocorrências, desde que os bacilos sejam sensíveis aos medicamentos anti-TB e que os princípios básicos da terapia medicamentosa sejam obedecidos. Estes consistem em: associação medicamentosa adequada, uso de doses corretas e durante o tempo necessário. Assim, evita-se a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos, assegurando a cura do paciente (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Em 1944 foi descoberto a estreptomicina (SM), o primeiro antimicrobiano capaz de atuar de maneira efetiva no combate a TB. Após essa descoberta, novos antimicrobianos foram introduzidos com sucesso na terapia da doença: a isoniazida (INH) desde 1952, a rifampicina (RIF) desde 1965, o etambutol (EMB) desde 1968 e a pirazinamida (PZA) desde 1952 (ZHANG, 2005; DE SOUZA; VASCONCELOS, 2005) entre outros.

Atualmente, o tratamento recomendado para novos casos de TB se baseia no uso de INH, RIF, EMB e PZA por dois meses (fase intensiva), seguido de quatro meses com INH e RIF (fase de manutenção) (Figura 3). A INH e a RIF são os medicamentos com maior atividade bactericida precoce, ou seja, apresenta capacidade de matar o maior número de

bacilos em um curto período de tempo. Ambos são ativos em todas as populações bacilares sensíveis (intracavitárias, granulomas, intracelulares). PZA é ativo somente em meio ácido (bactericida contra bacilos intracelulares ou no interior dos granulomas). O EMB é bacteriostático, atua em bacilos em multiplicação e é utilizado em associação com medicamentos mais potentes para prevenir a emergência de bacilos resistentes (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

FIGURA 3- ESQUEMA BÁSICO PARA O TRATAMENTO DA TB EM ADULTOS E ADOLESCENTES

Regime	Fármacos	Faixa de peso	Unidade/dose	Meses
2 RHZE Fase Intensiva	RHZE 150/75/400/275 comprimido em dose fixa combinada	20kg a 35kg	2 comprimidos	2
		36kg a 50kg	3 comprimidos	
		> 50kg	4 comprimidos	
4 RH Fase de manutenção	RH Comprimido ou cápsula de 300/200 ou de 150/100 ou comprimidos de 150/75*	20 a 35kg	1 comprimido ou cápsula de 300/200mg ou 2 comprimidos de 150/75*	4
		36kg a 50kg	1 comprimido ou cápsula de 300/200mg + 1 comprimido ou cápsula de 150/100mg ou 3 comprimidos de 150/75*	
		> 50kg	2 comprimidos ou cápsulas de 300/200mg ou 4 comprimidos de 150/75*	

Legenda: R – rifampicina, H – isoniazida, Z – pirazinamida, E - etambutol

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde, 2011

Como os medicamentos utilizados possuem efeitos adversos importantes e o esquema de tratamento é longo, muitas vezes o mesmo é abandonado pelo paciente ou, em algumas situações, interrompido por indicação médica. Essa falha no esquema terapêutico pode levar a emergência de isolados clínicos resistentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Pacientes portadores de TB-MDR são caracterizados por possuírem bacilos resistentes a pelo menos INH e RIF. Já pacientes portadores de TB extensivamente resistente (TB-XDR) possuem bacilos que além de MDR, apresentam resistência a qualquer fluoroquinolona e a um dos fármacos injetáveis de segunda linha (capreomicina, canamicina ou amicacina) (WHO, 2014; CHANG; YEW, 2013).

A resistência aos medicamentos anti-TB surge quando mutações ocorrem em genes que codificam alvos ou mecanismos do metabolismo destas drogas, diminuindo sua eficácia. Essas mutações ocorrem principalmente nos genes *rpoB* e *katG* e *inhA*, gerando resistência à RIF e INH, respectivamente. Embora menos frequente, a mutação no gene *pncA* também pode ocorrer, ocasionando resistência exclusivamente a PZA. No entanto, há isolados clínicos resistentes que não possuem mutações nos genes associados à resistência, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos (SEIFERT et al., 2015; RODRIGUES et al., 2012; YAO et al., 2010; SHEEN et al., 2009).

Pacientes que possuem TB resistente devem receber tratamento individualizado, dependendo da sensibilidade aos fármacos e das interações e da toxicidade que são intrínsecas ao paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Os fármacos utilizados para o tratamento de TB-MDR e TB-XDR incluem fluoroquinolonas (levofloxacino, moxifloxacino), fármacos injetáveis (estreptomicina, capreomicina, canamicina e ampicilina), fármacos de segunda linha (etionamida, protionamida, cicloserina) e fármacos em estudo (linezolida, claritromicina, clofazimina, amoxicilina-clavulanato, bedaquilina, entre outros) (WHO, 2014; JACOBSON et al., 2010).

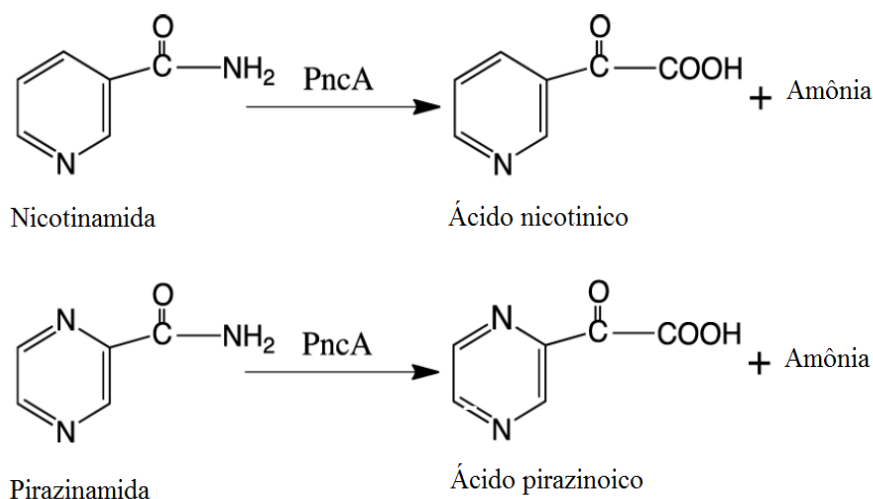
O desenvolvimento de resistência associado à capacidade do bacilo *Mtb* de causar infecções latentes, que são tolerantes aos medicamentos utilizados atualmente, mantém a TB como principal doença infecciosa causadora de morte. A necessidade mundial pelo desenvolvimento de novos fármacos, que tenham efetividade para combater os bacilos em todas as suas disposições (ativos, latentes e resistentes), é urgente. Existe uma gama de compostos, tanto naturais quanto sintéticos, que já estão sendo estudados para futuramente serem implantados e garantir maior eficácia e redução do regime de tratamento (CHETTY et al., 2016; HOAGLAND et al., 2016; QUAN et al., 2017; WHO, 2017).

1.2 PIRAZINAMIDA

A pirazinamida (PZA) é um análogo de nicotinamida (Figura 4), sintetizada quimicamente em 1936, mas utilizada como fármaco anti-TB a partir de 1952 (YEAGER; MUNROE; DESSAU, 1952). Antes da década de 1970, a PZA era principalmente usada como um fármaco de segunda linha para o tratamento de TB resistente ou no tratamento de recidivas da doença. Após diversos estudos clínicos, a PZA foi considerada quase tão efetiva quanto a RIF como um fármaco esterilizante, ambos com efeito sinérgico comprovado. Tais estudos mostraram que o tratamento poderia ser encurtado de 12 meses ou mais para 6 meses,

se RIF e PZA fossem utilizadas juntas no tratamento. Isso ocorre pois a PZA mata uma população de bacilos semi dormentes, presentes em um ambiente ácido (ocorrendo durante a inflamação ativa, ou seja no interior do macrófago), que não são afetados pelos outros medicamentos utilizados no tratamento da TB (MCCUNE; TOMPSETT, 1956; FOX; ELLARD; MITCHISON, 1999).

FIGURA 4- ESTRUTURA MOLECULAR DA PIRAZINAMIDA E DA NICOTINAMIDA



Fonte: ZHANG et al., 2013

Apesar dos estudos desenvolvidos desde a sua descoberta, há mais de 50 anos (YEAGER; MUNROE; DESSAU, 1952), o mecanismo de ação da PZA é o menos entendido dentre todos os fármacos anti-TB. A PZA é um pró-fármaco, que possui atividade apenas em pH ácido e que é convertido em sua forma ativa, o ácido pirazinoico (POA), pela enzima bacteriana pirazinamidase (PZase) (KONNO; FELDMAN; MCDERMOTT, 1967; SCORPIO; ZHANG, 1996). Enquanto outras espécies de micobactérias são intrinsecamente resistentes a PZA por possuírem um mecanismo de efluxo altamente ativo de POA, o *Mtb* possui esse mecanismo de efluxo deficiente (ZHANG et al., 1999).

Com base em vários estudos (ZHANG et al., 1999; 2002; 2003; SCORPIO; ZHANG, 1996), observa-se que a PZA entra nos bacilos por difusão passiva e é convertida em POA pela PZase citoplasmática, que é codificada pelo gene *pncA*. O POA sai da célula por meio de difusão passiva (ZHANG et al., 1999). Uma vez fora da célula, se o pH extracelular é ácido, uma pequena proporção de POA se tornará ácido protonado não carregado (HPOA). O HPOA entra na célula de maneira dependente do pH por difusão passiva e então se acumula em níveis intracelulares elevados e mata o bacilos por múltiplos mecanismos, incluindo:

interrupção da produção de energia da membrana, inibição da trans-tradução, possivelmente inibição da biossíntese de pantotenato e CoA, e outros mecanismos ainda não identificados (ZHANG; MITCHISON, 2003; ZHANG et al., 1999; 2003).

1.3 PROTEÔMICA

Existe uma tendência atual para o estudo de entidades biológicas em nível molecular e isso requer ferramentas que possam identificar os componentes de um sistema e mensurar suas respostas frente a um ambiente em constante mudança. Para isso, uma variedade de tecnologias de perfil transcriptômico, proteômico e metabolômico foram desenvolvidas, e a proteômica particularmente continua evoluindo rapidamente (BANTSCHEFF et al., 2007).

A análise proteômica é definida como o conjunto de metodologias analíticas empregadas para caracterizar quali e quantitativamente um perfil proteico. O objetivo dessa análise é estudar a função/comportamento dos genes com base nas identificações das proteínas por eles expressas. Neste contexto, muitas vezes é necessário não somente determinar o conjunto de proteínas presentes em uma amostra, mas também caracterizar as inúmeras isoformas, produtos de modificações pós-traducionais sofridas pelas mesmas e, por fim, como essas proteínas interagem entre si (WILKINS, et al., 1996; TYERS; MANN, 2003; AEBERSOLD; MANN, 2003).

As proteínas são moléculas com as funções celulares mais diferenciadas, sendo capazes de estruturar a expressão de genes, catalisar reações metabólicas, além de compor a estrutura celular. Modificações genéticas que promovem a ausência ou defeitos na estrutura de proteínas, afetando sua função, podem acarretar ou ser marcadores de doenças (EMIDIO, 2015). A importância das proteínas é ressaltada quando se observa que uma parte considerável dos fármacos disponíveis comercialmente são direcionados a alvos proteicos (IMMING; SINNING; MEYER, 2006). Dessa forma, o estudo do proteoma, bem como a elucidação da função das proteínas no contexto em que são expressas, são de extrema importância para o auxílio na busca de novas terapias (BAKER et al., 2012; HEIN et al., 2013).

Um ponto importante na análise proteômica é a separação das proteínas (RABILLOUD; LELONG, 2011). A eletroforese, especialmente a bidimensional (eletroforese 2D), é comumente utilizada para a separação das proteínas. Esta técnica consiste na aplicação de um campo elétrico, primeiramente, de acordo com o ponto isoelétrico e, posteriormente, por volume molecular. Uma outra metodologia de separação de proteínas e peptídeos é a de

cromatografia líquida, que se baseia nos fenômenos de partição e/ou adsorção à fase estacionária, o que depende do tamanho da cadeia polipeptídica do analito. As colunas mais empregadas nesta metodologia possuem fase estacionária apolar, permitindo assim, que compostos mais apolares fiquem retidos na coluna por um tempo maior (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014).

Após a separação, os analitos necessitam de identificação, o que pode ser realizado por espectrometria de massas (CHEN, 2008). A técnica consiste basicamente na ionização de um composto e na avaliação da razão massa/carga (m/z) dos íons. O equipamento utilizado é composto por uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de massas e um detector. O primeiro componente é utilizado para gerar íons peptídicos ou proteicos, geralmente transferindo prótons (H^+) para as moléculas sem alterar sua estrutura química. O íon é acelerado por campo elétrico e separado por m/z no analisador de massas, ou então é selecionado de acordo com uma m/z previamente determinada e fragmentado em um processo denominado *em tandem* (MS/MS). Finalmente, os íons passam pelo detector, que é conectado a um computador com programas para análise de dados (MAY et al., 2011).

Existem dois principais métodos de ionização utilizados em proteômica: o MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), empregado para amostras em estado sólido, e o ESI (*Electrospray Ionization*), para amostras em estado líquido. No método MALDI, os peptídeos são co-cristalizados com uma matriz orgânica. Após bombardeamento por laser, a matriz sublima e seus íons transferem a carga para os analitos, resultando na formação de íons peptídicos (ZALUZEC; GAGE; WATSON, 1995). No método ESI, uma solução aquosa com o analito é forçada a atravessar uma agulha capilar submetida à alta voltagem. A solução é ejetada como um aerossol de gotas altamente carregadas que, após evaporação do solvente por um fluxo de gás inerte aquecido, geram formas ionizadas do analito (NGUYEN; FENN, 2007).

Independentemente do método de ionização, a massa molecular dos íons é avaliada em um analisador após passagem por uma câmara de vácuo. Os tipos mais comuns de analisadores são o TOF (*Time Of Flight*), o quadrupolo e os analisadores de aprisionamento de íons (*ion trap*) (MAY et al., 2011). Nos analisadores TOF, os íons resultantes da primeira fase são acelerados por um potencial entre dois eletrodos e atravessam um tubo de vácuo com velocidade inversamente proporcional à sua massa. Quando os íons atingem o detector, o tempo decorrido entre a ionização e a detecção é utilizado para derivar o valor m/z . O resultado final é um gráfico de m/z versus intensidade (contagem de íons), comumente referido como espectro MS. Os sinais gerados são comparados com informações disponíveis

em bancos de dados, o que permite identificar a proteína de interesse (GLISH; VACHET, 2003). Os analisadores do tipo *ion trap* são relacionados ao quadrupolo. Enquanto o quadrupolo apresenta campos elétricos em duas dimensões (eixos x e y) e os íons movem-se perpendiculares ao campo (eixo z), os analisadores *ion trap* filtram e aprisionam os íons de interesse em um campo elétrico tridimensional, e estes são gradualmente liberados em ordem de m/z crescente (GLISH; VACHET, 2003).

Há alguns anos já são publicados estudos proteômicos realizados em *Mtb* com objetivos variados, como a expressão de proteínas em condições de incubação diferentes (STARCK et al., 2004; ALBRETHSEN et al., 2013); análises proteômicas comparativas de cepas avirulentas, virulentas e isolados clínicos de *Mtb* (JHINGAN et al., 2016); diferenças na expressão proteica entre isolados de *Mtb* sensíveis e resistentes a fármacos (KUMAR et al., 2013; LATA et al., 2015; SHARMA et al., 2015; ZHAO et al., 2015); expressão de proteínas após a exposição a medicamentos já utilizados no tratamento da TB (JIA et al., 2005; JIANG et al., 2011; CAMPANERUT-SÁ et al., 2016) e também de candidatos a fármacos (JIA et al., 2005; SHEN et al., 2010; GHIRALDI-LOPES et al., 2017). Por isso, a proteômica se mostra uma importante ferramenta para o estudo e compreensão das adaptações sofridas pelo *Mtb*, quando exposto a situações diversas.

1.4 JUSTIFICATIVA

A análise proteômica permite identificar a mudança de expressão de um determinado sistema em estado patológico ou quando exposto a uma substância/fármaco, sendo útil para estudar os alvos e os mecanismos de ação de substâncias com ação nestes organismos. Assim, a proteômica é uma importante ferramenta na identificação de biomarcadores de doenças, caracterização de processos fisiológicos normais e patológicos, análise de interação entre as proteínas, desenvolvimento farmacêutico e toxicológico.

A PZA é um pró-fármaco, possui atividade apenas em pH ácido, não apresenta um mecanismo de ação bem esclarecido e, além disso, até o presente momento, não há estudos sobre sua ação no perfil proteico de *Mtb*. Dessa forma, a exposição do *Mtb* a PZA e posterior avaliação proteica dessa exposição permitirá avaliar as diferenças no padrão de expressão de proteínas do bacilo exposto e não exposto e ajudar na elucidação dos mecanismos de ação e alvos da PZA ainda desconhecidos.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 GERAL

Realizar análise do perfil proteico de *Mycobacterium tuberculosis* após exposição à PZA.

1.5.2 ESPECÍFICOS

- a) Identificar as proteínas expressa pela cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv antes e após a exposição à PZA;
- b) Realizar análise diferencial do perfil protéico em *M. tuberculosis* H₃₇Rv antes e após exposição à PZA.

REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.

ALBRETHSEN, J. et al. Proteomic Profiling of *Mycobacterium Tuberculosis* Identifies Nutrient-Starvation-Responsive Toxin-Antitoxin Systems. **Molecular & cellular proteomics**, v. 12, n. 5, p. 1180–1191, 2013.

BAKER, E. S. et al. Mass spectrometry for translational proteomics: progress and clinical implications. **Genome Medicine**, v. 4, n. 8, p. 63, 2012.

BANTSCHEFF, M. et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: A critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 4, p. 1017–1031, 2007.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Plano nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública**. Brasília, DF, 1ª edição, 2017.

CAMPANERUT-SÁ, P. A. et al. Proteomic and morphological changes produced by subinhibitory concentration of isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. **Future Microbiology**, v. 11, p. 1123–32, 2016.

CATHERMAN, A. D.; SKINNER, O. S.; KELLEHER, N. L. Top Down proteomics: Facts and perspectives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 445, n. 4, p. 683-693, 2014.

CHANG, K.C.; YEW, W.W. Management of difficult multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: Update 2012. **Respirologi**, v. 18, n. 1, p. 8-21, 2013.

CHEN, C.H. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, n. 1, p. 16-36, 2008.

CHETTY, S. et al. Recent advancements in the development of anti-tuberculosis drugs. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 3, p. 370-386, 2016.

DE SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 678-682, 2005.

EDWARDS, D.; KIRKPATRICK, C.H. The immunology of mycobacterial diseases. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 134, n. 5, p. 1062-71, 1986.

EMIDIO, N. B. et al. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, n. 3, p. 101-111, 2015.

FOX, W.; ELLARD, G.A.; MITCHISON, D.A. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 3, n. 10, p. 231-279, 1999.

GHIRALDI-LOPES, L.D. et al. Proteomic profile of *Mycobacterium tuberculosis* after eupomatenoid-5 induction reveals potential drug targets. **Future Microbiology**, v. 12, p. 867-879, 2017.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 140-150, 2003.

HEIN, M. Y. et al. Chapter 1 - Proteomic Analysis of Cellular Systems. In: Walhout, A. J. M., Vidal, M., et al. **Handbook of Systems Biology**. San Diego: Academic Press, p.3-25, 2013.

HOAGLAND, D.T. et al. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 102, p. 55-72, 2016.

IMMING, P.; SINNING, C.; MEYER, A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 10, p. 821-834, 2006.

JACOBSON, K.R. et al. Treatment outcomes among patients with extensively drug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 1, p. 6-14, 2010.

JHINGAN, G.D. et al. Comparative Proteomic Analyses of Avirulent, Virulent, and Clinical Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Identify Strain-specific Patterns. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 27, p. 14257-73, 2016.

JIA, L. et al. Pharmacoproteomic effects of isoniazid, ethambutol, and N-Geranyl-N'-(2-adamantyl)ethane-1,2-diamine (SQ109) on *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, n. 2, p. 905–911, 2005.

JIANG, T. et al. The novel responses of ethambutol against *Mycobacterium smegmatis* mc²155 revealed by proteomics analysis. **Current microbiology**, v. 62, n. 2, p. 341–345, fev. 2011.

KONNO, K.; FELDMAN, F. M.; MCDERMOTT, W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 95, n. 3, p. 461-9, 1967.

KUMAR, B. et al. Proteomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to kanamycin and amikacin. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 68–77, 2013.

LACERDA, S. N. B. et al. Individual and social vulnerabilities upon acquiring tuberculosis: a literature systematic review. **International Archives of Medicine**, v. 7, p. 35, 2014.

LATA, M. et al. Proteomic analysis of ofloxacin-mono resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Journal of Proteomics**, v. 127, p. 114–121, 2015.

MAY, C. et al. Instruments and methods in proteomics. **Methods in Molecular Biology**, v. 696, p. 3-26, 2011.

MCCUNE, R.M. JR.; TOMPSETT, R. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. I. The persistence of drug-susceptible tubercle bacilli in the tissues despite prolonged antimicrobial therapy. **Journal of Experimental Medicine**, v. 104, n. 5, p. 737-762, 1956.

NGUYEN, S.; FENN, J.B. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 4, p. 1111-7, 2007.

PANDOLFI, J.R. et al. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.3, p. 251 - 257, 2007.

QUAN, D. et al. New tuberculosis drug leads from naturally occurring compounds. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 56, p. 212-220, 2017.

RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1829-1841, 2011.

RODRIGUES, L. et al. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 695-700, 2012.

SCORPIO, A.; ZHANG, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. **Nature Medicine**, v. 2, n. 6, p. 662-7, 1996.

SEIFERT, M. et al. Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. **PlosOne**, v. 10, n. 3, 2015.

SHARMA, D. et al. Comparative proteomic analysis of aminoglycosides resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates for exploring potential drug targets. **PloS One**, v. 10, n. 10, p. 1-18, 2015.

SHEEN, P. et al. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 89, n. 2, p. 109-113, 2009.

SHEN, H. et al. Altered Protein expression patterns of *Mycobacterium tuberculosis* induced by ATB107. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 337-346, 2010.

STARCK, J. et al. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* grown under aerobic and anaerobic conditions. **Microbiology (Reading, England)**, v. 150, n. 11, p. 3821-9, 2004.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 193-7, 2003.

WILKINS, M. R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 61-65, 1996.

WHO. **Global tuberculosis report 2017**. Geneva: World Health Organization; 2017. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acesso em: 02 de novembro de 2017.

WHO. 2014. **Companion Handbook to the WHO Guidelines for the Programmatic Management of Drug-Resistant Tuberculosis**. Geneva, 2014. Disponível em:

http://www.who.int/tb/publications/pmdt_companionhandbook/en/. Acesso em: 05 de outubro de 2017.

YAO, C. et al. Detection of *rpoB*, *katG* and *inhA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Chongqing as determined by microarray. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 11, p. 1639-43, 2010.

YEAGER, R.; MUNROE, W.; DESSAU, F. Pyrazinamide (Aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis. **American Review of Tuberculosis**, v. 65, n. 5, p. 523-534, 1952.

ZALUZEC, E.J.; GAGE, D.A.; WATSON, J.T. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 6, n. 2, p. 109-23, 1995.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 529-64, 2005.

ZHANG, Y. et al. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in the unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 7, p. 2044–9, 1999.

ZHANG, Y. et al. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 4, p. 1-12, 2013.

ZHANG, Y. et al. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 790-5, 2003.

ZHANG, Y.; MITCHISON, D. A. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 7, n. 1, p. 6–21, 2003.

ZHANG, Y.; PERMAR, S.; SUN, Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 42-9, 2002.

ZHAO, L. et al. Molecular characterisation of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in China. **International journal of antimicrobial agents**, v. 45, n. 2, p. 137–43, 2015.

CAPITULO II

CHANGES IN PROTEIN PROFILE OF *Mycobacterium tuberculosis* AFTER PYRAZINAMIDE EXPOSURE

Changes in protein profile of *Mycobacterium tuberculosis* after pyrazinamide exposure

Isabella LE Barros^{*1}, Luciana D Ghiraldi-Lopes², Paula AZ Campanerut-Sá², Jean E Meneguello³, Eduardo J Pilau⁴, Regiane BL Scodro^{1,2}, Vera LD Siqueira^{2,3} & Rosilene F Cardoso^{1,2,3}

¹ Postgraduate Program in Health Sciences, State University of Maringá- PR- Brazil

² Department of Clinical Analyses & Biomedicine, State University of Maringá- PR- Brazil

³ Postgraduate Program in Biosciences Applied to Pharmacy, State University of Maringá- PR- Brazil

⁴ Department of Chemistry, State University of Maringá- PR- Brazil

*Corresponding author: Isabella Letícia Esteves Barros.

Postgraduate Program in Health Sciences, State University of Maringá- PR- Brazil

Av. Colombo 5790, Bloco T-20, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brazil.

Phone number: Cell phone: +55 44 98801-1978.

e-mail: isa.leh.barros@gmail.com

ABSTRACT

Aim: We investigated the proteome changes of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) after exposition to subinhibitory concentration of pyrazinamide (PZA). **Methods:** The bacillus was exposed to $\frac{1}{2}$ MIC of PZA at 12 and 24 hours. The proteins were extracted and identified by mass spectrometry. **Results:** PZA impacts mainly in *Mtb* proteins of intermediary metabolism and respiration and conserved hypotheticals. PZA also altered proteins related to cell wall and cell processes, virulence, detoxification, adaptation, information pathways, lipid metabolism and regulatory proteins. **Conclusion:** Our study demonstrates that the action of PZA goes beyond what has already been described and that this drug seems to act at different stages of the bacterial metabolism of *Mtb*.

Keywords: Tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; pyrazinamide; proteome; mass spectrometry; protein changes; drug targets.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is the leading disease caused by a single infectious agent, mainly for *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), above HIV/AIDS and also the ninth leading cause of death worldwide. In 2016, the global incidence of TB was about 10.4 million, with 6.3 million new cases reported, and estimated mortality at 1.3 million. TB/HIV coinfection accounted for 10% of all new TB cases with 374,000 deaths [1].

Although TB has a well established and effective treatment, one of the major problems still faced is the emergence of drug resistant TB. By 2016, there were 600,000 new cases of rifampicin resistance (RRTB), the most effective first-line drug, of which 490,000 were multidrug-resistant TB (MDR-TB) [1–3].

Understanding the basis of drug action and mechanism that induces resistance in the bacillus, will guide efforts for discovering next-generation compounds, with improved activity against *Mtb* and may bypass emerging resistance to existing drugs [4,5].

Pyrazinamide (PZA) is a first-line antituberculosis drug that shows sterilizing activity against *Mtb* in macrophage acidic environment and plays a critical role in reducing TB relapse rates. Despite the studies developed since PZA discovery more than 50 years ago [6], its mechanism of action is the least understood among all anti-TB drugs. PZA is a pro-drug that is converted into its active form, the pyrazinoic acid (POA) by the bacterial pyrazinamidase enzyme (PZase) [7,8]. Unlike other *Mycobacterium* spp., which are intrinsically resistant to PZA because of an active POA efflux system, *Mtb* has this mechanism, but it is flawed. [9].

Considering the current threat on the resistant TB worldwide and the difficulties in discovering new drugs, it is of extreme importance to understand the biological interaction among *Mtb* and drugs. Since PZA is the only drug that acts on acid pH, this knowledge would help to select new targets to be used for designing new anti-TB compounds. As proteins are molecules with the most differentiated cellular functions, the importance of their study is emphasized when considerable part of commercially available drugs are targeted to bacterial proteins [10,11].

Proteomics studies in *Mtb* can help to detect essential proteins for the bacillus survival, thus be considered as possible targets for a new anti-TB drugs [12].

In this way, the study of the proteins as well as the elucidation of their function on the context in which they are expressed, are of extreme importance to find new therapies and to understand the adaptation of microorganisms under different environmental conditions

[13,14]. So, the aim of the present study was to evaluate the changes of protein in *Mtb* induced by subinhibitory concentration of PZA.

MATERIAL AND METHODS

1- *Mycobacterium tuberculosis* growth conditions and drug exposure

Mtb H₃₇Rv ATCC 27294 was cultured in Middlebrook 7H9 broth (Difco Laboratories, Detroit, MD, USA) supplemented with 0.2 % oleic-acid-albumin-dextrose-catalase enrichment Middlebrook OADC (BBL / Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) and incubated for 15 days at 35 °C. Bacterial suspensions were standardized to OD₆₀₀ = 0.6 to 0.8. PZA Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was previously determined by REMA assay [15] and an amount proportional to MIC of PZA was added to the cultures (pH 6.0) to achieve sub-MIC (½ MIC, 50 µg/mL) [15]. Bacterial suspensions were reincubated at 35 °C for 12 and 24 hs. A not exposed culture (control) and a not exposed PZA culture with pH 6.0 (acid control) were maintained at the same conditions to be used as protein profile reference.

2- Protein extraction, quantification and digestion

After the incubation time with and without PZA, the pellet were collected by centrifugation (4400 rpm for 5 minutes), washed twice with sterile saline (0.85% NaCl) and resuspended in 300 µl of lysis buffer containing reducing agents (7 M urea, 4% CHAPS, 0.5 % IPG buffer, 40 mM dithiothreitol (DTT)). The bacillus suspension was transferred to conic tubes and sonicated for 10 minutes. Cell debris was removed by centrifugation and the extracted proteins were stored at -80 °C.

Protein quantification was performed using the Bradford method [16]. Briefly, 100µl of the solution obtained in the extraction were added to 5ml of the Bradford reagent and read in spectrophotometer (OD 562nm). Protein concentrations were calculated by comparison with a serum albumin standard curve.

Tryptic digestion of the protein solution was carried out according to LNBio protocol [17]. Briefly, 8 M urea (1:1) was added to the extracted solution and samples were reduced and alkylated with DTT and Iodoacetamine, respectively. Subsequently, a 1:5 dilution in 50 mM of ammonium bicarbonate and final 1mM CaCl₂ solution was performed. Trypsin (Promega, USA) was added (ratio of 1:50 enzyme: substrate) and incubated at 37 °C overnight. Then, the reaction was stopped by adding trifluoroacetic acid (TFA) at final

concentration of 0.4% and the samples centrifuged at 2500g for 10 minutes at room temperature. The supernatant was stored at -20 °C until analysis.

3- Mass spectrometry Analysis (LC-MS)

The peptides were identified in a high-performance chromatograph UHPLC (Shimadzu, Nexera X2) coupled to a mass spectrometer (Bruker, Impact II) with a time-of-flight quadrupole analyzer (Q-TOF), equipped with electrospray source. Chromatographic separation was performed with a mixture of two solvents: A (99.5% H₂O/0.1% v/v formic acid) and B (99.5% acetonitrile/0.1% v/v formic acid) using a C18 column. The proteomics data were acquired in positive mode.

The data obtained were analyzed using the MaxQuant v. 1.5.8.3 and Perseus v. 1.5.8.5, according to the reference genome of *Mtb* H₃₇Rv and the obtained proteins were screened using the Uniprot and TubercuList protein database [18].

4- STRING analysis

The protein-protein interaction network of *Mtb* proteins exposed to PZA was built with the STRING database (Genetic / Genetic Recovery Research Toolkit, <http://string.embl.de/>) [19]. The STRING-10 server was used to predict the interacting partners of protein-protein interaction. The STRING database uses a combination of forecasting approaches and an integration of other information (neighborhood, transferred neighborhood, gene fusion, co-occurrence, co-expression, experiments, databases, text mining). The network was made at the average confidence level (0.400) allowing all active forecasting methods. Network construction and data visualization were done by Cytoscape v 3.5.1 [20].

RESULTS

Comparing the two controls with the two treated exposures we can notice the absence of 18 proteins in both times of PZA exposition that were present in the controls. These proteins are divided into the following functional classes, according to the TubercuList [18]: two proteins involved in lipid metabolism, four on intermediate metabolism and respiration, one of information pathways, four of cell wall and cell processes and seven hypothetical conserved (Table 1).

In the same comparison between controls and PZA exposition, we also observed the additional of 12 proteins after 12 hours of PZA exposure and absent in the controls. These proteins are divided into the following functional classes: four proteins involved in the intermediate metabolism and respiration, one of information pathways, two of cell wall and cell processes, one of virulence, detoxification and adaptation, one regulatory protein and also three hypothetical conserved proteins (Table 2).

Of the 12 proteins present after 12 hours of exposition, only 4 remained present after 24 hours of exposure to PZA. Among them, two proteins are included in the functional class of intermediate metabolism and respiration (Probable glutamine synthetase GlnA4 and NADH-quinone oxidoreductase subunit D) and two are conserved hypothetical proteins (Rv3678A and Rv2749) (Table 2).

We analyzed the differentially expressed proteins by STRING-10 with a medium confidence score threshold and build a network of these set of proteins (Figure 1). We found that proteins involved in intermediary metabolism and respiration, information pathway and cell wall and cell process interacted with each other as well as their partners.

DISCUSSION

The main emphasis of this study was to analyze the proteic alterations of *Mtb* H₃₇Rv exposed to PZA to 12 and 24h at subinhibitory concentration ($\frac{1}{2}$ MIC), using solution proteomics and mass spectrometry (LC-MS). To our knowledge, this is the first study to evaluate *Mtb* H₃₇Rv proteomic profile exposed to PZA at subinhibitory concentration ($\frac{1}{2}$ MIC) at two times.

Regarding proteins absence after PZA ($\frac{1}{2}$ MIC) exposition for 12 and 24hs, Polyketide synthase Pks12 and Decaprenylphosphoryl-beta-D-ribose oxidase were two lipid metabolism-related proteins identified as absent at the two PZA inductions times when compared to controls. It is known that Pks12 is an enzyme that is involved in biosynthesis of mannosyl-beta-1-phosphomycoketide (MPM), a *Mtb* cell antigen [21]. Decaprenylphosphoryl-beta-D-ribose oxidase together with DPPE2 (Rv3791) protein, catalyzes epimerization of decaprenylphosphoryl ribose (DPR) to decaprenylphosphoryl arabinose (DPA) in arabinan synthesis [22].

Another missing protein related to information pathways is the Elongation factor G-like protein, involved in the translation mechanism. This protein may promote the GTP-

dependent translocation of the nascent protein chain from the A-site to the P-site of the ribosome [18].

We also had four cell wall and cell processes-related proteins absent at the two PZA exposed times. The Protein translocase subunit SecD is involved in protein export. It is part of the prokaryotic protein translocation apparatus which comprise SecA, SecB, SecD, SecE, SecF, SecG and SecY [18]. The Phosphate-binding protein PstS 3 is involved in the active transport of inorganic phosphate through the membrane (import). This is one of the proteins required for the transport of phosphate-mediated binding protein [23]. The Putative diacylated glycolipid transporter LprF and ESX-5 secretion system ATPase EccB5 proteins still have unknown function [18].

Among the proteins related to intermediate metabolism and respiration that were be absent in the PZA expositions assays, the Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurQ and N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthase proteins are involved in purine biosynthesis in the fourth and sixth stages respectively [18]. In addition, we also found Probable phosphoadenosine phosphosulfate reductase, involved in the sulfate activation pathway (at the third step) in the reductive branch of the cysteine biosynthetic pathway. It reduces activated sulfate into sulfite [24]. Senaratne and colleagues found that this protein protects *Mtb* against free radicals during chronic infection phase in mice [25]. Finally, 3-dehydroquinate synthase is involved at the second step in the biosynthesis of chorismate within the biosynthesis of aromatic amino acids (the shikimate pathway) [26]. The shikimate pathway is absent in the human host, so the bacterium requires the shikimate pathway that is the precursor of the biosynthesis of the aromatic amino acids tyrosine, tryptophan and phenylalanine, as well as folate and ubiquinone. And because it is an essential step for the growth of *Mtb*, it can be a target for the development of new drugs [27].

Regarding the proteins that were present in the PZA exposed growth in both exposure times, we observed the regulatory protein Sensor protein KdpD. It is a member of the two-component regulatory system KDPD/KDPE involved in the regulation of the KDP operon. KDPD may function as a membrane-associated protein kinase that phosphorylates KDPE (Rv1027c) in response to environmental signals [28].

The Transcription-repair-coupling factor, a information pathways-related protein, was also present. It is involved in nucleotide excision repair and necessary for strand-specific repair [29].

Two cell wall and cellular processes-related proteins present after PZA exposition were observed: Probable conserved lipoprotein LpqN, with yet unknown function and

Probable conserved two-domain membrane protein, also unknown, but which appears to be involved in the efflux system (probably sugar or drug transport) [18]. According to the study by Gupta et al. (2010), after assembling a custom DNA microarray containing 25 *Mtb* drug efflux pump genes and monitoring the changes in the expression of these genes on the exposure of common anti-TB drugs, there was an increased activity of eight efflux pump genes in multidrug-resistant isolates for the first time, among them the *Rv3728* that encodes this protein [30].

Four proteins related to intermediate metabolism and respiration were present in the samples after PZA exposition. Probable glutamine synthetase GlnA4 (Glutamine synthase) (GS-II) has involvement in glutamine biosynthesis [31]. The Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit, involved in tricarboxylic acid cycle is a membrane-bound FAD-containing enzyme which is responsible for succinate interconversion [18]. The NADH-quinone oxidoreductase subunit D is involved in aerobic/anaerobic respiration [18]. Also, Phosphoglucosamine mutase (GlmM), which, despite being considered with unknown function, may be involved in cellular metabolism. The cell wall of *Mtb* is composed of peptidoglycan, arabinogalactan and mycolic acids, and N-acetyl glucosamine (GlcNAc) is an essential component of the cell wall and is catalyzed by phosphoglucosamine mutase (GlmM). Li et al., (2012) demonstrated the activity of phosphoglucosamine mutase by the *Rv3441c* protein, providing evidence that GlmM could be a potential target for the development of anti-TB drugs, considering its role in cell wall biosynthesis [32].

Finally, the Antitoxin RelB, a virulence, detoxification and adaptation-related protein, was present too. It has an unknown function, but some studies have already speculated on its function, such as that of Gupta (2008), which demonstrates the killing activity and rescue function of toxin-antitoxin loci from the genome of *Mtb* [33] and Korch's study and colleagues, which brings three *Mtb* Rel toxin-antitoxin modules that inhibit the growth of mycobacteria and are expressed in infected human macrophages [34]. All conserved hypothetical proteins, both present and absent after PZA inductions times, have an unknown function [18].

Taking into account some studies [8,9,35,36], the following model for the PZA action mode was proposed. PZA enters the bacilli by passive diffusion and is converted into POA by the cytoplasmic PZase. POA then gets out of the cell through passive diffusion and a deficient efflux mechanism in *Mtb* [9]. Once POA is outside the cell, if the extracellular pH is acidic, a small proportion of POA will become uncharged protonated acid HPOA, which enters the cell in a pH-dependent manner by passive diffusion and then accumulates to high intracellularly

levels and kills the bacilli by multiple mechanisms, including: disruption of membrane energy production, inhibition of trans-translation, possibly inhibition of pantothenate and CoA biosynthesis, and other as yet unidentified mechanisms [9,37,36].

According to STRING-10, proteins identified as absent and present after PZA exposition in our study, play important functions in several pathways of bacterial metabolism, introducing new insights related to the mechanism of action of PZA described in the literature. This reinforces the importance of studies such as ours to demonstrate that the action of PZA goes beyond what has already been described and that this drug seems to act at different stages of the *Mtb* metabolism.

CONCLUSION

Our results demonstrate that most of the altered proteins were related to intermediate metabolism and respiration and conserved hypotheticals proteins. Studies such as this are important for the identification of drug action for understanding the changes caused in the bacillus by PZA and also for identification of new therapeutic targets.

EXECUTIVE SUMMARY

- Tuberculosis (TB) is the leading cause of disease caused by a single infectious agent, above HIV/AIDS and also the ninth leading cause of death worldwide.
- Pyrazinamide (PZA) is a first-line antituberculosis drug that shows sterilizing activity against *Mtb* in macrophage acidic environment and plays a critical role in reducing TB relapse rates. Its mechanism of action is the least understood among all anti-TB drugs.
- An evaluation of the protein changes exposed to subinhibitory concentrations of PZA in *Mtb* at different times was made.
- *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) strain was exposed to ½ MIC and incubated at 37°C for 12 and 24 hours.
- The proteins were identified by LC-MS analysis.
- Thirty proteins of *M. tuberculosis* were altered by the presence of PZA.
- The major altered proteins were related to intermediate metabolism and respiration and conserved hypotheticals.

- The protein changes in *M. tuberculosis* exposed to subinhibitory concentration of PZA at different times present important functions in several pathways of bacterial metabolism, introducing new insights related to the mechanism of action of PZA described in the literature.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2017. Geneva (2017).
2. World Health Organization. Bending the curve - ending TB: Annual report 2017. Companion handbook. (2017).
3. Chang KC, Yew WW. Management of difficult multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: Update 2012. *Respirology*. 18(1), 8–21 (2013).
4. Dillon NA, Peterson ND, Feaga HA, Keiler KC, Baughn AD. Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of trans-Translation and RpsA. *Sci. Rep.* 7(1), 1–8 (2017).
5. Quan D, Nagalingam G, Payne R, Triccas JA. New tuberculosis drug leads from naturally occurring compounds. *Int. J. Infect. Dis.* 56, 212–220 (2017).
6. Yeager RL, Munroe WGC, Dessau FI. Pyrazinamide (aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Tuberc.* 65(5), 523–546 (1952).
7. Konno K, Feldmann FM, McDermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.* 95(3), 461–469 (1967).
8. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat. Med.* 2(6), 662–667 (1996).
9. Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z, Unlike A, Organi- WH. Role of Acid pH and Dficient Eflux of Pyrazinoic Acid in Unique Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Microbiology*. 181(7), 2044–2049 (1999).
10. Emidio NB, Carpanez AG, Quellis LR, Farani PS, Vasconcelos EG, Pinto PF. Proteômica : uma introdução aos métodos e aplicações. *HU Rev.* 41(3), 101–111 (2015).
11. Imming P, Sinning C, Meyer A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5(10), 821–834 (2006).
12. Campanerut-Sá PAZ, Ghiraldi-Lopes LD, Meneguello JE, *et al.* Systematic review on the proteomic profile of *Mycobacterium tuberculosis* exposed to drugs. *Proteomics* -

- 338 *Clin. Appl.* , 1–33 (2017).
- 339 13. Baker E, Liu T, Petyuk VA, *et al.* Mass spectrometry for translational proteomics:
340 progress and clinical implications. *Genome Med.* 4(8), 63 (2012).
- 341 14. Hein M, Sharma K, Cox J, Mann M. Chapter 1 - Proteomic Analysis of Cellular
342 Systems. In book: *Handbook of Systems Biology*, Edition: 1, Publisher: Academic
343 Press, Elsevier Inc. 3-25 (2002).
- 344 15. Campanerut PAZ, Ghiraldi LD, Sposito FLE, *et al.* Rapid detection of resistance to
345 pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* using the resazurin microtitre assay. *J.*
346 *Antimicrob. Chemother.* 66(5), 1044–1046 (2011).
- 347 16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
348 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72,
349 248–254 (1976).
- 350 17. LNBio. In solution digestion protocol. 3, 19–20 (2008). Available from:
351 http://lnbio.cnpem.br/wp-content/uploads/2012/11/protocolo_digestao_solucao.pdf.
- 352 18. Institut Pasteur. <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>.
- 353 19. Mawuenyega KG, Forst C V, Dobos KM, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis*
354 Functional Network Analysis by Global Subcellular Protein Profiling. 16, 396–404
355 (2005).
- 356 20. Su G, Morris JH, Demchak B, Bader GD. Biological network exploration with
357 Cytoscape 3. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 47, 8.13.1-24 (2014).
- 358 21. Matsunaga I, Bhatt A, Young DC, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis pks12* Produces a
359 Novel Polyketide Presented by CD1c to T Cells. *J Exp Med.* 200(12), 1559-1569
360 (2004).
- 361 22. Mikusova K, Huang H, Yagi T, *et al.* Decaprenylphosphoryl Arabinofuranose , the
362 Donor of the D -Arabinofuranosyl Residues of Mycobacterial Arabinan , Is Formed via
363 a Two-Step Epimerization of Decaprenylphosphoryl Ribose. *J Bacteriol.* 187(23),
364 8020–8025 (2005).
- 365 23. Braibant M, Lefbvre P, Wit L De, *et al.* Identification of a second *Mycobacterium*
366 *tuberculosis* gene cluster encoding proteins of an ABC phosphate transporter. *FEBS*
367 *Lett.* 394, 206–212 (1996).
- 368 24. Williams SJ, Senaratne RH, Mougous JD, Riley LW, Bertozzi CR. 5-
369 Adenosinephosphosulfate Lies at a Metabolic Branch Point in Mycobacteria. *J Biol*
370 *Chem.* 277(36), 32606–32615 (2002).
- 371 25. Senaratne RH, Silva AD De, Williams SJ, *et al.* 5-Adenosinephosphosulphate

- reductase (CysH) protects *Mycobacterium tuberculosis* against free radicals during chronic infection phase in mice. *Mol Microbiol.* 59(6), 1744–1753 (2006).
26. Mendonça JD De, Ely F, Palma MS, Frazzon J, Basso LA. Functional Characterization by Genetic Complementation of *aroB* -Encoded Dehydroquinase Synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and Its Heterologous Expression and Purification. *J Bacteriol.* 189(17), 6246–6252 (2007).
 27. Parish T, Stoker NG. The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* 148, 3069–3077 (2002).
 28. Agrawal R, Saini DK. Biochemical and Biophysical Research Communications Rv1027c – Rv1028c encode functional KdpDE two – Component system in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446(4), 1172–1178 (2014).
 29. Prabha S, Rao DN, Nagaraja V. Distinct Properties of Hexameric but Functionally Conserved *Mycobacterium tuberculosis* Transcription- Repair Coupling Factor. *PLoS One.* 6(4) (2011).
 30. Gupta AK, Katoch VM, Chauhan DS, *et al.* Microarray Analysis of Efflux Pump Genes in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* During Stress Induced by Common Anti-Tuberculous Drugs. *Microb Drug Resist.* 16(1), 21-28 (2010).
 31. Tullius M V, Harth G, Horwitz MA. All four *Mycobacterium tuberculosis gln A* genes encode glutamine synthetase activities but only *GlnA1* is abundantly expressed and essential for bacterial homeostasis. *Mol Microbiol.* 58(4), 1157–1172 (2005).
 32. Li S, Kang J, Yu W, *et al.* Identification of *M . tuberculosis* Rv3441c and *M . smegmatis* MSMEG _ 1556 and Essentiality of *M . smegmatis* MSMEG _ 1556. *PLoS One.* 7(8) (2012).
 33. Gupta A. Killing activity and rescue function of genome-wide toxin-antitoxin loci of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* 290(1), 45-53 (2008).
 34. Korch SB, Contreras H, Clark-curtiss JE. Three *Mycobacterium tuberculosis* Rel Toxin-Antitoxin Modules Inhibit Mycobacterial Growth and Are Expressed in Infected Human Macrophages. *J Bacteriol.* 191(5), 1618–1630 (2009).
 35. Zhang Y, Permar S, Sun Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Med Microbiol.* 51(1), 42–49 (2002).
 36. Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide : disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by

pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother.* 52(5), 790–795 (2003).

37. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 7(1), 6–21 (2003).

Table 1. Proteins absent after *Mycobacterium tuberculosis* PZA exposition for 12 and 24 hours and presente in the neutral and acidic pH controls.

ORF number	Gene	Protein identified	Functional class†
Rv2048c	<i>pks12</i>	Polyketide synthase Pks12	lipid metabolism
Rv3790	<i>dprE1</i>	Decaprenylphosphoryl-beta-D-ribose oxidase	lipid metabolism
Rv0120c	<i>fusA2</i>	Elongation factor G-like protein	information pathways
Rv2587c	<i>secD</i>	Protein translocase subunit SecD	cell wall and cell processes
Rv0928	<i>pstS3 or phoS2</i>	Phosphate-binding protein PstS 3	cell wall and cell processes
Rv1368	<i>lprF</i>	Putative diacylated glycolipid transporter LprF	cell wall and cell processes
Rv1782	<i>eccB5</i>	ESX-5 secretion system ATPase EccB5	cell wall and cell processes
Rv0788	<i>purQ</i>	Phosphoribosylformylglycinamidine synthase subunit PurQ	intermediary metabolism and respiration
Rv3276c	<i>purK</i>	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthase	intermediary metabolism and respiration
Rv2392	<i>cysH</i>	Probable phosphoadenosine phosphosulfate reductase	intermediary metabolism and respiration
Rv2538c	<i>aroB</i>	3-dehydroquinate synthase	intermediary metabolism and respiration
Rv3038c	-	Conserved protein	conserved hypotheticals

Rv1191	-	Conserved protein	conserved hypotheticals
Rv1443c	-	Uncharacterized protein	conserved hypotheticals
Rv1458c	-	Probable unidentified antibiotic- transport ATP-binding protein ABC transporter	conserved hypotheticals
Rv3633	-	Uncharacterized protein Rv3633	conserved hypotheticals
Rv0906	-	Uncharacterized protein Rv0906	conserved hypotheticals
Rv1480	-	Uncharacterized protein Rv1480	conserved hypotheticals

†According to TubercuList [18]

443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471

Table 2. Proteins present after *Mycobacterium tuberculosis* PZA exposition for 12 and 24 hours and absent in the neutral and acidic pH controls.

ORF number	Gene	Protein identified	Functional class†
Rv2860c	<i>glnA4</i> *	Probable glutamine synthetase GlnA4 (Glutamine synthase) (GS-II)	intermediary metabolism and respiration
Rv3318	<i>sdhA</i>	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	intermediary metabolism and respiration
Rv3148	<i>nuoD</i> *	NADH-quinone oxidoreductase subunit D	intermediary metabolism and respiration
Rv3441c	<i>glmM/mrsA</i>	Phosphoglucosamine mutase	intermediary metabolism and respiration
Rv1020	<i>Mfd</i>	Transcription-repair-coupling factor	information pathways
Rv1028c	<i>kdpD</i>	Sensor protein KdpD	regulatory proteins
Rv1247c	<i>relB</i>	Antitoxin RelB	virulence, detoxification, adaptation
Rv0583c	<i>lpqN</i>	Probable conserved lipoprotein LpqN	cell wall and cell processes
Rv3728	-	Probable conserved two- domain membrane protein	cell wall and cell processes
Rv3678A	-*	Uncharacterized protein	conserved hypotheticals
Rv2749	-*	Conserved protein	conserved hypotheticals
Rv0959	-	Uncharacterized protein Rv0959	conserved hypotheticals

†According to TubercuList [18] * proteins present at 24 hours after exposition



Figure 1. Network demonstrating protein interaction among all protein differentially expressed during PZA exposure. Triangles: presence, arrow: absence, green: 12 hours exposure, red: both 12 and 24 hours exposure.

CAPÍTULO III

3.1 CONCLUSÕES

1. As principais alterações proteicas relacionadas à exposição da cepa H₃₇Rv de *Mycobacterium tuberculosis* a PZA ocorreram em proteínas relacionadas ao metabolismo intermediário e respiração, sugerindo que estas poderiam ser exploradas como alvos para a ação de fármacos anti-TB.
2. Ocorreram alterações em proteínas hipotéticas conservadas, demonstrando que essas proteínas podem ser melhor exploradas para a compreensão do mecanismo de ação da PZA.
3. As proteínas alteradas encontradas neste estudo apresentam funções importantes em várias vias do metabolismo bacteriano, apresentando novos *insights* relacionados ao mecanismo de ação da PZA descrito na literatura. Isso poderia demonstrar que a ação da PZA vai além do que já se encontra descrito e que esse fármaco tem a capacidade de atuar em diferentes etapas do metabolismo bacteriano de *Mycobacterium tuberculosis*.

3.2 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, há a necessidade de realizar mais estudos para a compreensão do mecanismo de ação e dos alvos da PZA. As proteínas que se encontraram alteradas indicam que esse fármaco pode atuar em várias etapas do metabolismo de *Mtb*. Desta forma, estudos proteômicos com isolados clínicos sensíveis e resistentes aos fármacos de primeira linha, com micobactérias não- tuberculosas e com bacilos em estado dormente, assim como a comparação das proteínas alteradas pelo pH, podem contribuir para este objetivo. Além disso, a utilização de análises genômicas, transcriptômicas e metabolômicas, pode contribuir para o entendimento de novos alvos.