

Evaluación de los cambios metabólicos asociados a la resistencia a la artemisinina en *Plasmodium falciparum*

Alejandro Bonive, Ascanio Rojas y Héctor Acosta

Universidad de Los Andes (ULA)
Centro Nacional de Cálculo Científico ULA (CeCaLULA)

Mérida, Venezuela

alejandro.bonive@gmail.com

1. Introducción

La malaria es responsable de causar un estimado de 228 millones de casos y 405.000 muertes a nivel mundial en 2018, siendo *Plasmodium falciparum* el causante de la mayoría de los casos y muertes [1]. Desde 2001 el tratamiento principal para tratar la malaria producida por *P. falciparum* consiste en el uso de Artemisinina en conjunto con otra(s) drogas antimaláricas y son denominados como tratamientos basados en artemisinina (ACTs). La Artemisinina afecta al parásito de diferentes maneras; dañando numerosas proteínas [2-4], interfiriendo con el funcionamiento del proteasoma [2] y produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS)[5], estos efectos causan la muerte del parásito interfiriendo con varias rutas metabólicas y causando un daño sistémico a diferentes niveles.

A pesar de que la artemisinina afecta a *P. falciparum* de varias maneras, en 2008 surge evidencia que sugiere que algunas cepas de *P. falciparum* estaban desarrollando resistencia a la artemisinina en el sudeste asiático [6], estudios posteriores mostraron que diversas mutaciones en el gen *pfkelch 13* del parásito son el principal marcador molecular en cepas resistentes [7] y diversas mutaciones en la proteína han sido asociadas a nivel mundial con un aumento en la tolerancia a la artemisinina en *P. falciparum* [8]. Pese a esto algunas cepas resistentes muestran otros cambios además de mutaciones en *pfKelch13*, de hecho, algunas cepas resistentes obtenidas *in vitro* exponen un incremento en la tolerancia a la artemisinina sin presentar mutaciones en *pfKelch13* [9].

Resalta el hecho de que ciertas cepas resistentes muestran diferencias respecto a cepas sensibles cuando se evalúa los transcritos totales (transcriptómica), estas diferencias se han observado al analizar aislados sanguíneos de muestras clínicas [10] y cepas obtenidas *in vitro* [9, 11, 12]. Otros enfoques "ómicos" También han mostrado diferencias entre cepas sensibles y resistentes, como metabólica y proteómica [13].

Estos trabajos con enfoques Ómicos producen muchos datos que son difíciles de analizar en su totalidad, o que requieren de posteriores estudios para asociarse con otros aspectos biológicos, el presente trabajo propone realizar un reanálisis de diferentes datos ómicos ya obtenidos en cepas de *P.falciparum* resistentes a la artemisinina con la finalidad de proponer diferentes cambios metabólicos que ocurren en el parásito y que le permiten tolerar el estrés oxidativo producido por la droga, este es uno de los efectos que produce la droga en el parásito [5, 12].

2. Metodología

Se usaron los datos de transcriptómica obtenidos por Mok *et al.* [10] que comprenden 999 proteínas cuya expresión es diferente en cepas resistentes a la artemisinina de *P. falciparum* respecto a cepas sensibles. Se asumió que las diferencias en las abundancias de transcritos implican diferencias en la cantidad de proteínas. También se usaron los datos de metabolómica obtenidos por Siddiqui *et al.* [13] en cepas de *P. falciparum* resistentes a la droga. A esta evidencia se le dio un sentido biológico asociándola con las diferentes rutas metabólicas que han sido descritas hasta la fecha para *P. falciparum*, estas rutas metabólicas fueron obtenidas del servidor Malaria Parasite Metabolic Pathways (MPMP, [14])

3. Resultados y Discusión

En la Figura 1 se muestran los principales cambios metabólicos propuestos para *P. falciparum* en cepas resistentes a la artemisinina respecto a las rutas metabólicas glucólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y producción de glutatión. Hay un aumento en la expresión de diferentes enzimas de la glucólisis; hexoquinasa (HK, PF3D7_0624000), fosfoglucoisomerasa (PGI, PF3D7_1436000) y fosfofructoquinasa (PFK, PF3D7_0915400) y fosfogliceratoquinasa (PGK, PF3D7_0922500), lo cual podría implicar un aumento en el flujo glucolítico.

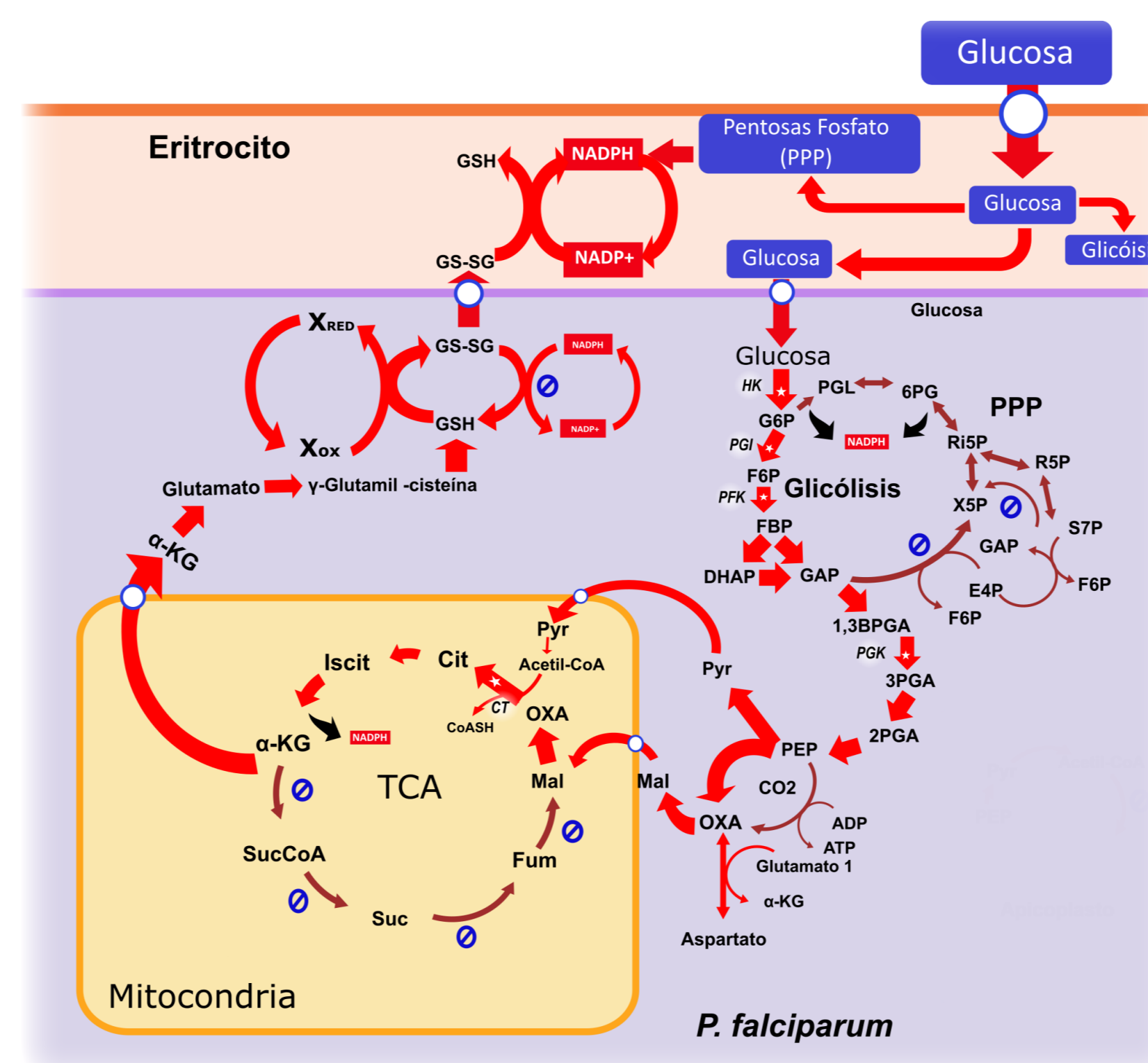


Figura 1: Cambios en las rutas metabólicas; glucólisis, ciclo TCA y estrés oxidativo propuestos para cepas resistentes, las flechas de color rojo brillante indican el principal flujo metabólico en estas rutas, las flechas opacas muestran reacciones con menor flujo. Se muestran los nombres abreviados de las enzimas correlacionadas positivamente con la resistencia a la artemisinina en *P. falciparum* según los datos de transcriptómica [10]

Por otro lado, los cambios en la expresión de diferentes enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos sugieren un cambio en el sentido de todo este ciclo, la citrato sintasa (PF3D7_1022500 y PF3D7_0609200) se encuentra correlacionada positivamente con la resistencia, pero la succinato deshidrogenasa (PF3D7_1010300), succinato CoA ligasa (PF3D7_1108500) y -cetoglutarato deshidrogenasa (PF3D7_1320800) se encuentran correlacionadas negativamente. Esto podría indicar que el citrato y -cetoglutarato se acumulan en la matriz mitocondrial, de esta manera la diferencia en la concentración de -cetoglutarato en la matriz respecto al citosol promovería su transporte hacia el citosol. En el mismo orden de ideas, el malato sería transportado desde el citosol hacia la matriz. En esta cepas el flujo de metabolitos en el ciclo de Krebs sería el opuesto al planteado para cepas salvajes (sensibles a la droga) donde el malato es el producto final del ciclo y es transportado de la matriz hacia el citosol mientras que el -cetoglutarato es transportado en sentido inverso[15]. Ahora bien, el -cetoglutarato extra transportado hacia el citosol tendería a acumularse y es probable que el parásito lo emplee de alguna manera, en este aspecto, los datos de metabolómica

obtenidos por Siddiqui *et al.* [13] muestran que en las cepas resistentes de *P. falciparum* hay un aumento en dos metabolitos implicados directamente en la respuesta al estrés oxidativo por el parásito; glutatión y -glutamylcisteína (precursor del glutatión), el -cetoglutarato extra puede formar parte del glutatión, primero siendo transformado en glutamato mediante una glutamato deshidrogenasa (GDH), *P. falciparum* tiene al menos dos formas citosólicas de esta enzima que producen esta reacción [16]. El glutamato es usado junto a otros dos aminoácidos (glicina y cisteína) para la producción de glutatión.

La evidencia preliminar del análisis de otras rutas metabólicas sugiere que en cepas resistentes el parásito dedica una mayor cantidad de energía en mitigar los efectos de la droga y una menor cantidad en la progresión del ciclo celular y replicación, esto concuerda con el letargo en el ciclo celular que ya ha sido reportado en algunas cepas resistentes [17].

Por otro lado, diferentes proteínas que posiblemente están cumpliendo un rol en la tolerancia al estrés oxidativo de *P. falciparum* están siendo evaluadas. Los cambios metabólicos propuestos concuerdan con un posible aumento en la tolerancia al estrés oxidativo en cepas resistentes a la artemisinina de *P. falciparum*.

4. Conclusiones

El presente trabajo muestra parte de los resultados que se han obtenido de una investigación en curso, una de las conclusiones más importantes es que ante el efecto de la artemisinina, diferentes cambios metabólicos pueden haber surgido en *P. falciparum*, cambios que aprovechan varias de las características del parásito, como la plasticidad en el ciclo TCA y que ya ha sido reportada anteriormente [18] y pueden ser asociados con un aumento en la tolerancia al estrés oxidativo.

Alteraciones en otras rutas metabólicas sugieren que las cepas resistentes dedican una mayor cantidad de energía en la tolerancia a los efectos de la artemisinina.

Referencias

1. WHO, World malaria report 2019, WHO, Editor. 2019. p. 232.
2. Bridgford, J.L., et al., Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nat Commun*, 2018. 9(1): p. 3801.
3. Ismail, H.M., et al., Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PNAS*, 2016. 113(8): p. 2080-2085.
4. Yang, T., et al., Decreased K13 Abundance Reduces Hemoglobin Catabolism and Proteotoxic Stress, Underpinning Artemisinin Resistance. *Cell Rep*, 2019. 29(9): p. 2917-2928 e5.
5. Pongwatnanakorn, O., et al., Possible Role of the Ca(2+)-Mn(2+) P-Type ATPase Pmr1p on Artemisinin Toxicity through an Induction of Intracellular Oxidative Stress. *Molecules*, 2019. 24(7).
6. Noeld, H., et al., Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *The New England Journal of Medicine*, 2008. 359(24): p. 2619-2620.
7. Ariey, F., et al., A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 2014. 505(7481): p. 50-5.
8. Ménard, D., et al., A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *The New England Journal of Medicine*, 2016. 374: p. 2453-64.
9. Demas, A.R., et al., Mutations in *Plasmodium falciparum* actin-binding protein coronin confer reduced artemisinin susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. 115(50): p. 12789-12804.
10. Mok, S., et al., Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science*, 2014.
11. Cui, L., et al., Mechanisms of *in vitro* resistance to dihydroartemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology* 2012. 86(1): p. 111-128.
12. Rocamora, F., et al., Oxidative stress and protein damage responses mediate artemisinin resistance in malaria parasites. *PLoS Pathog*, 2018. 14(3): p. e1006930.
13. Siddiqui, G., et al., Multi-omics Based Identification of Specific Biochemical Changes Associated With PfKelch13-Mutant Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2017. 215: p. 1435-1444.
14. Ginsburg, H., A. Artyomov, and O.B. Lev. *Malaria Parasite Metabolic Pathways*. 2020; Available from: <https://mpmp.huji.ac.il/>
15. Ke, H., et al., Genetic investigation of tricarboxylic acid metabolism during the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Cell Rep*, 2015. 11(1): p. 164-74.
16. Olaszewski, K.L. and M. Llinas, Central carbon metabolism of *Plasmodium* parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 2011. 175(2): p. 95-103.
17. Hott, A., et al., Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* parasites exhibit altered patterns of development in infected erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015. 59(6): p. 3156-67.
18. Jacot, D., et al., Apicomplexan Energy Metabolism: Carbon Source Promiscuity and the Quiescence Hyperbole. *Trends Parasitol*, 2016. 32(1): p. 56-70.