

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

FERNANDA TEIXEIRA SUBTIL

**IDENTIFICAÇÃO DO ALVO MOLECULAR DAS 2-(QUINOLIN-4-ILÓXI)
ACETAMIDAS COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE**

Porto Alegre

2017

FERNANDA TEIXEIRA SUBTIL

**IDENTIFICAÇÃO DO ALVO MOLECULAR DAS 2-(QUINOLIN-4-ILÓXI)
ACETAMIDAS COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular da Faculdade de Biociências da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande
do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Co-orientador: Dra. Anne Drumond Villela

Porto Alegre

2017

Ficha Catalográfica

S941i Subtil, Fernanda Teixeira

Identificação do alvo molecular das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas como candidatos a fármacos para o tratamento da tuberculose / Fernanda Teixeira Subtil . – 2017.

68 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos.

Co-orientadora: Profa. Dra. Anne Drummond Villela.

1. tuberculose. 2. desenvolvimento de fármacos. 3. biologia molecular. 4. alvo molecular. 5. quinolóxiacetamidas. I. Santos, Diógenes Santiago. II. Villela, Anne Drummond. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FERNANDA TEIXEIRA SUBTIL

**IDENTIFICAÇÃO DO ALVO MOLECULAR DAS 2(QUINOLIN-4-ILÓXI)
ACETAMIDAS COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular da Faculdade de Biociências da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande
do Sul.

Aprovada em: _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Maurício Reis Bogo

Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto

Porto Alegre

2017

Dedico este trabalho aos meus pais,
irmãos, amigos e ao Pedro.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente ao professor Diógenes por ter aberto as portas do laboratório e me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho que me proporcionou um enorme crescimento profissional e pessoal. Além disso, me tratou com muito carinho.

Agradeço aos demais colegas do laboratório pelo companheirismo e discussões científicas que surgiram ao longo destes dois anos. Obrigada à Águida, por todo profissionalismo e suporte que me deu, especialmente na compra de materiais. As amigas também foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, por isso agradeço ao Bruno por dividirmos a bancada e risadas; à Mariane, por ser uma inspiração pessoal a profissional; ao Rogério (in memoriam) por ser a melhor companhia que se pode ter. Ainda, meus amigos da época do colégio, Gabriel, Juan Pablo, Débora, Helena e Juliana foram muito presentes neste período e eu agradeço por isso. E a Bruna, que é minha amiga desde, literalmente, o primeiro dia de faculdade.

Finalmente, um grande agradecimento é direcionado aos meus pais, que me incentivam a continuar meus estudos e me dão o suporte necessário para buscar meus sonhos. Aos meus irmãos, Flávia e Davi, que estão todos os dias ao meu lado, dividindo suas peripécias diárias.

Agradeço ao Pedro por ser este companheiro compreensivo e presente. Que, além disso, me estimula sempre, mesmo que meus desejos profissionais signifiquem que fiquemos longe.

Este trabalho não seria possível sem a ajuda da Anne, que além de co-orientadora virou uma grande amiga, que eu adoro. Agradeço também ao professor Cristiano Bizarro que também contribuiu substancialmente para este trabalho.

Por fim, agradeço todas as oportunidades que me foram dadas pela PUCRS e também pelo apoio financeiro obtido pela CAPES.

*Walking with a friend in the dark
is better than walking alone in the light*

Helen Keller

RESUMO

A alta incidência da tuberculose, em âmbito mundial, é de grande preocupação. Para combater esta doença, diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Dentre os pilares que compõem a *End TB strategy*, podemos destacar a pesquisa intensiva e a inovação. Neste âmbito, o desenvolvimento de novos fármacos para tuberculose vem ganhando destaque. As 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas são moléculas que demonstraram resultados bactericidas promissores frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, o que nos motivou a realizar novos estudos para melhorar a atividade e realizar a caracterização química e biológica destas moléculas. A fim de continuar o desenvolvimento da série quinolínica, a identificação do seu alvo molecular foi o foco deste trabalho. Inicialmente, levantou-se a hipótese de que a DNA girase seria o alvo molecular, uma vez que as 2(quinolin-5-ilóxi) acetamidas possuem grande similaridade estrutural com as fluoroquinolonas. Apesar das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas terem apresentado menor atividade frente a isolados clínicos resistentes a ofloxacino, os resultados de atividade obtidos frente a uma mutante pontual de *gyrA* e frente à proteína indicam que a DNA girase não é o alvo destas moléculas. A nova estratégia para identificação de alvo envolveu a seleção de mutantes espontâneos para o composto líder 12L, caracterização desta cepa frente aos demais compostos da série e sequenciamento total do genoma. Este permitiu a identificação de uma única mutação (T313A) localizada na proteína QcrB, que é a subunidade B do complexo citocromo *bc1*. Esta mutação foi confirmada por sequenciamento de Sanger e o *docking* molecular aferiu a importância deste resíduo na interação proteína-composto. O complexo citocromo *bc1* está envolvido no transporte de elétrons na cadeia respiratória do bacilo, e por isso é um alvo molecular interessante, principalmente para combater a forma latente da doença. Esperamos que este trabalho contribua no processo de desenvolvimento das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas para o tratamento da tuberculose.

Palavras-chave: tuberculose, desenvolvimento de fármacos, identificação de alvo

ABSTRACT

The high incidence of tuberculosis is a great concern worldwide. Different strategies are being developed by the World Health Organization to fight tuberculosis. Amongst the three pillars that are part of the End TB Strategy, we can highlight the intensive research and innovation pillar. In this extent, the development of new drugs for tuberculosis treatment is a field that is gaining importance. The 2(quinolin-4-yloxy) acetamides are molecules that showed promising bactericidal effects in *Mycobacterium tuberculosis*, which motivated us to continue studying to improve their mycobactericidal activity and also perform their chemical and biological characterization. In order to continue the 2(quinolin-4-yloxy) acetamides derivatives development, the target identification of these molecules is a keystone and is also the focus of this study. Initially, it was hypothesized that DNA gyrase was their molecular target due to the great chemical similarities between the 2(quinolin-4-yloxy) acetamides and the fluoroquinolones. Despite our results that the 2(quinolin-4-yloxy) acetamides have diminished effects in ofloxacin resistant clinical isolates, the results obtained with the *gyrA* point mutant and with DNA gyrase protein revealed that this enzyme is not the molecular target of these compounds. The new target identification strategy involved the selection of spontaneous mutants for our lead compound 12L, characterization of this mutant strain against other 2(quinolin-4-yloxy) acetamides derivatives and whole genome sequencing. Whole genome sequencing data allowed the identification of a single mutation (T313A) in the QcrB protein, which is the B subunit of cytochrome *bc₁* complex. This mutation was confirmed by Sanger sequencing and molecular docking results confirmed the importance of this residue for protein-drug interaction. The cytochrome *bc₁* complex is involved in the electron transport of the bacilli's respiratory chain, and therefore it appears to be an interesting target, especially to treat the latent form of the disease. We hope that this work contributes to the 2(quinolin-4-yloxy) acetamides development for tuberculosis treatment.

Keywords: tuberculosis, drug development, target identification

SUMÁRIO

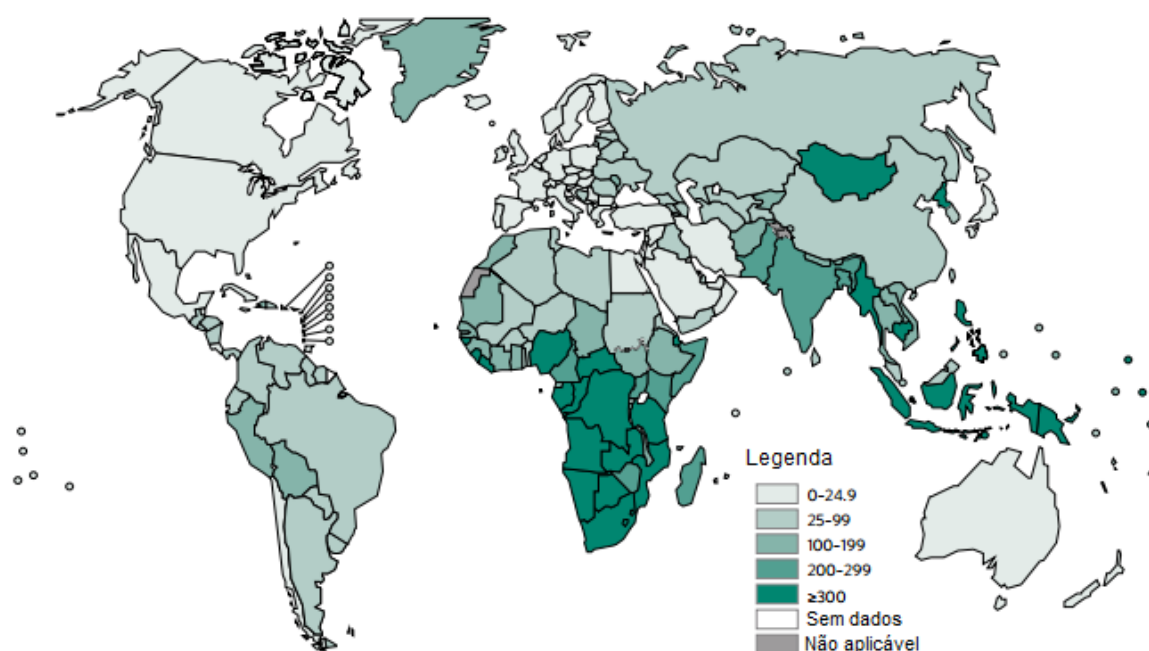
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Tuberculose	10
1.2. Desenvolvimento de novos fármacos.....	14
1.3. Complexo Citocromo bc1	17
1.4. 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas	18
1.5. DNA girase.....	19
1.6. Quinolonas	23
1.7. Manipulação genética em <i>M. tuberculosis</i>	25
1.7.1. <i>Recombineering</i>	26
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS:	31
3.1. Objetivo geral:.....	31
3.2. Objetivos Específicos:	31
4. ARTIGO CIENTÍFICO	32
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
6. REFERÊNCIAS	58
ANEXOS:	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tuberculose

A tuberculose humana é considerada um problema de saúde pública, uma vez que, apenas no ano de 2015, houve o relato de 10,4 milhões de novos casos no mundo (WHO, 2016). O principal agente causador da tuberculose é o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, entretanto as espécies *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum* também são capazes de causar esta doença (Ducati *et al.*, 2006). Adicionalmente, a tuberculose foi a principal causa de morte por doenças infecciosas no ano de 2015, tendo superado as estatísticas do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (WHO, 2016).

Figura 1 - Estimativa de novos casos de tuberculose (todas as formas) por 100.000 habitantes por ano no mundo



Fonte: Adaptado de Global Tuberculosis Report, WHO, 2016

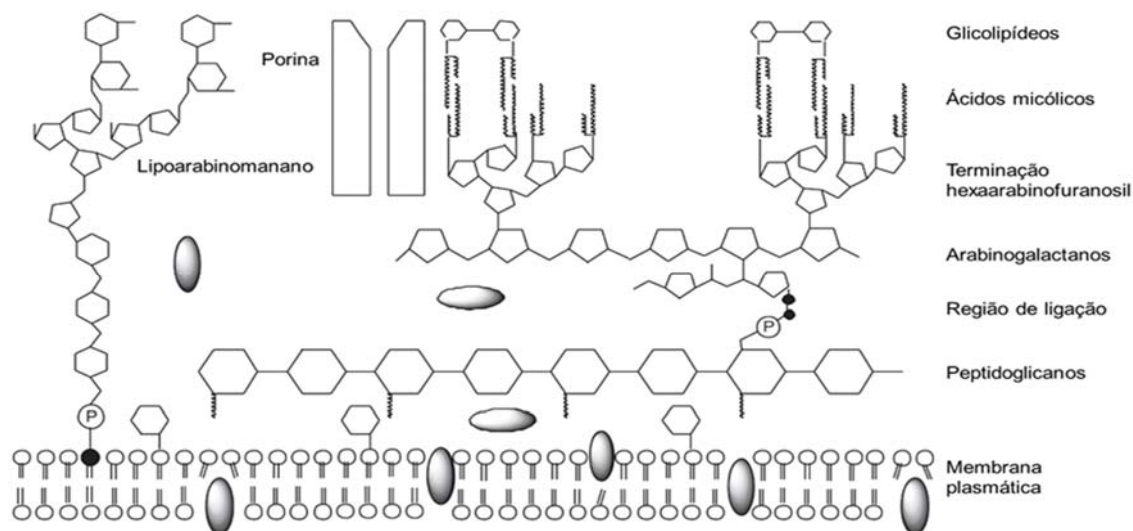
O Brasil, juntamente com a Federação Russa, Índia, China e África do Sul representam 50% de todos os casos de tuberculose no mundo (**Figura 1**). O Brasil teve 81.137 casos relatados de tuberculose no ano de 2015, destes, 82% foram testados para o vírus do HIV e 15% destes foram HIV positivos. No país, a cobertura de tratamento da tuberculose é de 87% (WHO, 2016). O Estado do Rio Grande do Sul está entre os cinco estados com maior incidência de tuberculose no país (41 casos/100.000 habitantes). Em novembro de 2016, a Secretaria Estadual

de Saúde do Rio Grande do Sul se reuniu para sensibilizar os gestores de 19 municípios prioritários para o combate à tuberculose. O objetivo é aumentar o percentual de cura de 62,5% para 75% ao ano, além de reduzir a taxa de abandono do tratamento de 15% para 5% nos próximos anos. Dentre estes municípios está a cidade de Porto Alegre, com 1.458 novos casos no ano de 2015 (SES, 2016).

M. tuberculosis caracteriza-se por ser um microrganismo intracelular, aeróbico facultativo, e que infecta tipicamente os pulmões, sendo transmitido através da inalação de aerossóis contendo a micobactéria expelidos por indivíduos portadores da forma ativa da doença (Smith, 2003; Russell *et al.*, 2010; Koul *et al.*, 2011; Lawn e Zumla, 2011). Após sua entrada nos pulmões, os bacilos são prontamente fagocitados por macrófagos alveolares, desencadeando uma resposta inflamatória local com a mobilização de células mononucleadas que, na maior parte dos casos, irão conter, mas não eliminar a infecção. Esta ação dos macrófagos acaba resultando em um agregado de células compacto, denominado granuloma (Lawn e Zumla, 2011). A maioria dos indivíduos infectados apresenta a doença em estado latente, na qual o microrganismo permanece no hospedeiro em um estado não-replicativo. Apesar da doença não ser transmissível na sua forma latente, os indivíduos infectados representam um importante reservatório da doença, uma vez que um terço da população mundial se encontra nesta situação e a reativação pode ocorrer (Ducati *et al.*, 2006; Koul *et al.*, 2011). O rápido diagnóstico e início do tratamento são fundamentais para um melhor prognóstico. Primeiramente, uma triagem é realizada com o exame de intradermoreação (PPD), cujo protocolo prevê a aplicação intradérmica de uma proteína purificada chamada tuberculina na face anterior do antebraço. Caso o indivíduo apresente uma reação positiva (>5mm de vermelhidão) deve-se prosseguir com os demais testes, que consistem no raio-X torácico e testes microbiológicos. Os testes microbiológicos envolvem cultivo do escarro em meio de Löwestein-Jensen que pode levar de três a oito semanas; e a baciloscopia (NIH, 2007).

M. tuberculosis distingue-se por ser um bacilo cujo envelope celular é altamente hidrofóbico, o qual atua como uma barreira de contenção, que dificulta a efetividade de fármacos. Além disso, este envelope complexo se liga de tal forma aos corantes convencionais que não é possível realizar a etapa decolorante da coloração de Gram, sendo este o motivo pelo qual é chamado de álcool-ácido resistente (Ducati *et al.*, 2006). Dentre as estruturas que compõem este envelope celular, destacam-se três componentes principais: peptidoglicanos, arabinogalactanos e ácidos micólicos (**Figura 2**) os quais estão covalentemente ligados (Takayama *et al.*, 2005; Ducati *et al.*, 2006; Marrakchi *et al.*, 2014).

Figura 2 - Representação do envelope celular micobacteriano.



Fonte: Adaptado de Ducati *et al*, 2006

O tratamento recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para os portadores de cepas não resistentes tem duração de seis meses e consiste na administração de fármacos de primeira-linha (**Tabela 1**). Para estes pacientes faz-se uso de isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida durante dois meses, seguido por mais quatro meses de tratamento com isoniazida e rifampicina. Cerca de 90% dos casos de portadores de cepas sensíveis a estes medicamentos obtêm sucesso após a conclusão do tratamento (Koul *et al.*, 2011; WHO, 2016). Contudo, devido aos efeitos adversos, ao longo período de duração e à complexidade do regime, muitos pacientes abandonam ou não aderem corretamente ao tratamento. Este fenômeno desencadeia o restabelecimento da infecção na sua forma ativa, o que facilita a permanência e disseminação da doença e, ainda, o surgimento de cepas resistentes (Koul *et al.*, 2011; Lawn e Zumla, 2011; Cooper, 2013).

Tabela 1 - Principais fármacos utilizados no tratamento da TB

Classificação	Medicamento
Primeira-linha	Isoniazida
	Rifampicina
	Pirazinamida
	Etambutol
Segunda-linha	Estreptomicina
	Canamicina
	Amicacina
	Capreomicina
	Ciclosserina
	Ofloxacina
	Etionamida
	Ácido para-amino salicílico

Fonte: Adaptado de Zumla *et al.*, 2013.

A incidência de cepas resistentes aos fármacos de primeira-linha representa uma crescente ameaça ao combate à tuberculose. O aumento dos casos de tuberculose multirresistente a fármacos (MDR-TB) foi observado em diversos países, sendo um problema que causa grande preocupação (Calligaro *et al.*, 2014; WHO, 2016). Estas cepas apresentam resistência à isoniazida e à rifampicina e requerem um regime de tratamento que envolve a administração de fármacos de segunda-linha (**Tabela 1**), que são menos efetivos e mais tóxicos. Em 2006, a OMS reportou a identificação de cepas de tuberculose extensivamente resistentes a fármacos (XDR-TB), as quais não respondem ao tratamento com isoniazida e rifampicina e também são resistentes a três ou mais medicamentos de segunda-linha (Koul *et al.*, 2011; Calligaro *et al.*, 2014; WHO, 2016).

O tratamento da tuberculose resistente a fármacos é muito mais complexo do que o administrado para tratar os casos sensíveis, pois este envolve, como descrito anteriormente, a administração de quimioterápicos menos potentes e mais tóxicos. Ainda, a duração do tratamento pode ser superior a 24 meses e a taxa de sucesso é relativamente baixa: em 2010, por exemplo, apenas 48% dos casos de MDR-TB detectados foram tratados com sucesso (Calligaro *et al.*, 2014; Dartois, 2014; WHO, 2016). Para um tratamento ideal deve-se planejar a estratégia terapêutica com base nos resultados de testes de susceptibilidade a fármacos realizados com isolados clínicos de cada paciente. No entanto, devido à infraestrutura laboratorial inadequada em diversos países, a realização deste teste é limitada (Zumla *et al.*, 2013; WHO, 2016). Contudo, com a disponibilidade do GeneXpert, um método molecular

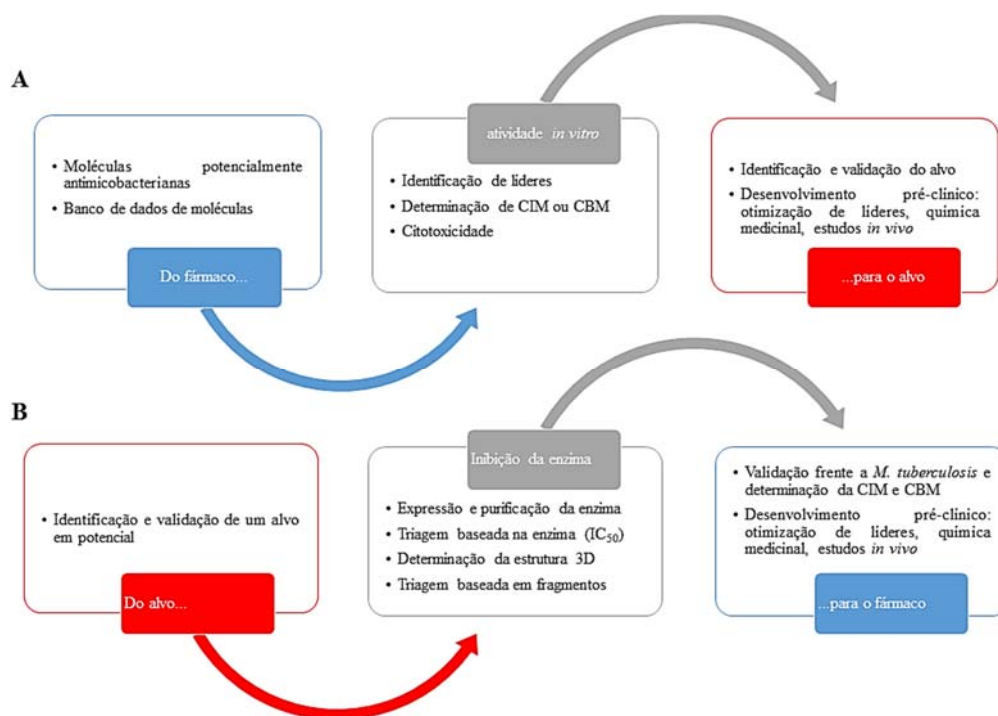
automatizado capaz de detectar a presença do bacilo e a resistência à rifampicina, a cobertura de detecção chegou a 30%, sendo que novas metodologias estão sendo desenvolvidas para aumentar ainda mais a cobertura diagnóstica (WHO, 2016).

Apesar da incidência da tuberculose no mundo estar em declínio (1,5% ao ano), existem preocupações pela OMS pois a meta de diminuição de 4-5% ao ano não foi atingida e, além disso, os casos de MDR-TB e XDR-TB têm aumentado nos últimos anos. No ano de 2014, a OMS aprovou a *End TB strategy*, que visa à diminuição de mortes em 90% e a diminuição da incidência em 80% até o ano de 2030 comparado com 2015. Este programa possui como indicadores: (1) redução da porcentagem do número absoluto de mortes por tuberculose; (2) diminuição da porcentagem da taxa de incidência de tuberculose e (3) a porcentagem de famílias acometidas por tuberculose com custos catastróficos devido à tuberculose. Este programa possui três pilares e componentes, sendo o primeiro relacionado ao paciente, visando o diagnóstico precoce, tratamento e prevenção da doença. O segundo, políticas e sistemas de apoio para evitar a propagação da doença, com a participação da comunidade. O terceiro sendo focado na pesquisa intensiva e inovação, na busca de novas estratégias de intervenção (WHO, 2016).

1.2. Desenvolvimento de novos fármacos

A resistência a fármacos é um problema alarmante, especialmente pelo aumento da incidência de MDR e XDR-TB (Zumla *et al.*, 2013; WHO, 2016). Uma das estratégias para combater esta doença é o desenvolvimento e implementação de novos medicamentos. Quatro principais metodologias para a descoberta de novos fármacos vêm sendo empregadas: (1) descoberta de novos candidatos a fármacos; (2) reposicionamento de fármacos existentes, (3) modulação das funções do hospedeiro para aumentar o índice de cura e (4) desenvolvimento de novas vias de administração de medicamentos. No âmbito da descoberta de novos fármacos, existem duas estratégias principais: fármaco-para-alvo, também chamada de triagem fenotípica; e alvo-para-fármaco, também conhecida como “baseada no alvo”. Ambas as estratégias estão descritas na **figura 3**. Atualmente, a descoberta de novos inibidores para o tratamento da tuberculose utilizando a estratégia de triagem fenotípica de compostos tem tido resultados mais promissores (Lechartier *et al.*, 2014).

Figura 3 - Estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos para tuberculose



Nota: A figura demonstra as duas principais estratégias para o desenvolvimento de fármacos para a tuberculose. É importante ressaltar que um alvo identificado por triagem fenotípica (A) pode ser utilizado para estudo seguindo o fluxograma da estratégia baseada no alvo (B). CIM, concentração inibitória mínima; CBM, concentração bactericida mínima.

Fonte: adaptado de Lechartier *et al*, 2014

Os novos fármacos devem, de forma ideal, ter as seguintes características: um novo mecanismo de ação para atenuar a resistência cruzada; atividade bactericida rápida para diminuir a duração do tratamento; propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas otimizadas; baixo potencial de interação com outros fármacos, especialmente com os utilizados no tratamento do HIV; além de excelente perfil de segurança para uso em crianças e grávidas (Hoagland *et al.*, 2016).

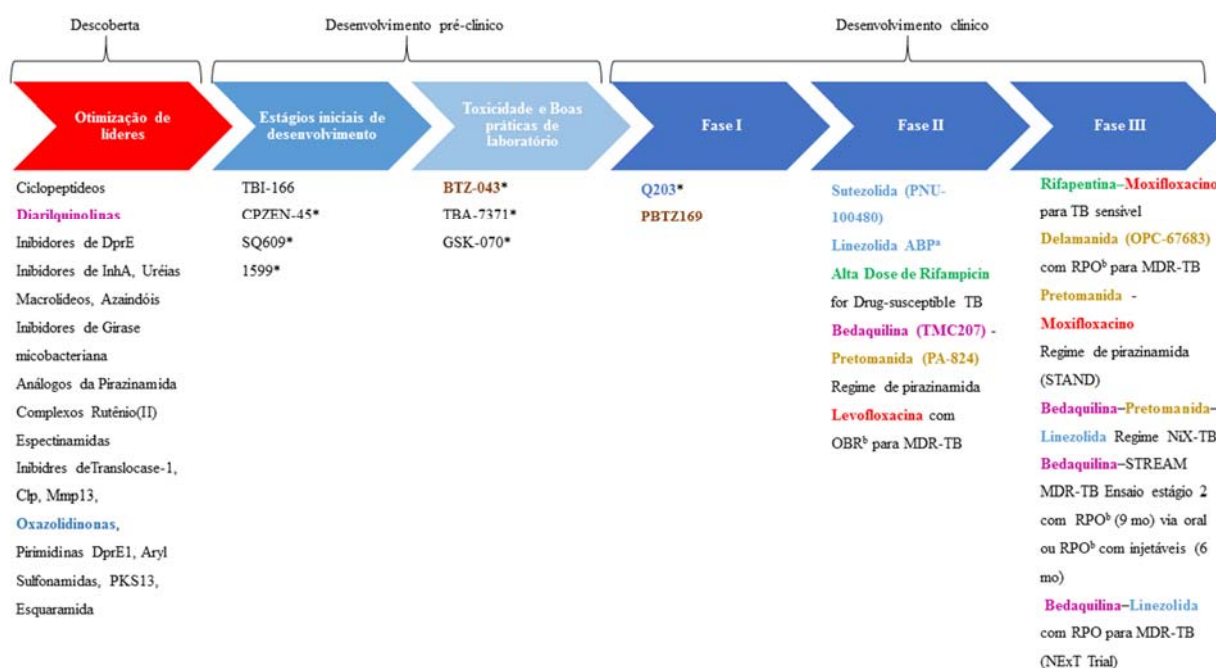
Em dezembro de 2012, a bedaquilina foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) como parte do tratamento de MDR-TB pulmonar (Chan *et al.*, 2013), sendo o primeiro fármaco anti-tuberculose aprovado desde a rifampicina, nos anos 1970 (Villemagne *et al.*, 2012). Para a descoberta do alvo desta molécula, foi utilizada a seleção de mutantes espontâneos seguida de sequenciamento completo do genoma. Estes resultados indicaram uma mutação no gene que codifica a enzima ATP sintase de *M. tuberculosis* (Andries *et al.*, 2005). A bedaquilina foi classificada como uma diarilquinolina e é capaz de inibir a síntese de adenosina trifosfato

(ATP) da micobactéria, sendo eficaz tanto em cepas suscetíveis como em MDR-TB (Leibert *et al.*, 2014).

Apesar do sucesso clínico da bedaquilina, durante os testes clínicos, foi possível observar o desenvolvimento de efeitos adversos sérios, como distúrbios e injúrias hepáticas e, principalmente, o alongamento do intervalo Q-T observado no eletrocardiograma (Chan *et al.*, 2013). Além da bedaquilina, a delamanida foi condicionalmente aprovada para o tratamento de XDR-TB e TDR-TB em função de efeitos adversos devidos sua alta lipofilicidade (Hoagland *et al.*, 2016). Esta molécula é um pró-fármaco que é ativado pela enzima dezaflavina dependente de nitroredutase (Rv3547), e forma um intermediário com o derivado de desnitroimidazooxazol que atua inibindo a síntese de ácidos micólicos (Xavier e Lakshmanan, 2014; Hoagland *et al.*, 2016).

Figura 4 - Fluxograma de moléculas em estudo para o tratamento da tuberculose^a

Nota: ^a Atividade antibactericida precoce; ^b Regime prévio otimizado;



Classes químicas: **fluoroquinolonas**, **rifamicina**, **oxazolidona**, **nitroimidazol**, **diarilquinolina**, **benzotiazinona**, **amida imidazopiridina**

* novas classes químicas

Fonte: Adaptado de WHO Global Tuberculosis Report, 2016

Desde o surgimento da bedaquilina, enzimas envolvidas no metabolismo energético do bacilo tem se tornado um alvo interessante para a descoberta de novos fármacos, especialmente para que sejam efetivos contra a forma latente da doença (Kim *et al.*, 2015). Neste cenário, podemos destacar a molécula Q203, que no ano de 2013 foi caracterizada como sendo uma

molécula potente para o combate da tuberculose (Petthe *et al.*, 2013). Neste estudo, os autores demonstraram que o Q203 possui atividade intracelular em modelo de macrófagos, atividade frente a isolados clínicos multirresistentes, ausência de citotoxicidade e alta especificidade frente ao *M. tuberculosis*. Além disso, este composto não demonstrou cardiotoxicidade em modelo de *zebrafish* nem provocou mutagênese em modelos *in vitro*. Ensaio farmacocinéticos demonstraram sua grande biodisponibilidade e estabilidade biológica. Associado a todas estas características, a seleção de mutantes espontâneos para o Q203 revelou que seu alvo se tratava de uma proteína do complexo citocromo *bc₁*, um complexo envolvido na respiração e metabolismo energético do bacilo (Petthe *et al.*, 2013). Atualmente, esta molécula encontra-se em ensaios clínicos de fase I (**Figura 4**), e validou a citocromo *bc* como sendo um bom alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para a tuberculose.

1.3.Complexo Citocromo *bc₁*

Alguns estudos buscaram verificar, através do perfil transcricional, a mudança metabólica do *M. tuberculosis* em ambientes com depleção de O₂ (Boshoff *et al.*, 2004; Boshoff e Barry, 2005). Estes possibilitaram a compreensão da cadeia respiratória do bacilo e revelaram a necessidade de investigar sua função e regulação a nível molecular (Boshoff e Barry, 2005). As micobactérias possuem uma cadeia respiratória ramificada na qual os elétrons se movimentam dos complexos NADH desidrogenase e succinato desidrogenase para o *pool* menaninona-menaquinol, de onde são transferidos para um citocromo *c* oxidase do tipo *aa₃* via complexo citocromo *bc₁* ou diretamente para o citocromo tipo *bd* menaquinol oxidase (Kana *et al.*, 2001; Boshoff e Barry, 2005; Weinstein *et al.*, 2005).

O complexo respiratório citocromo *bc₁* é composto por três subunidades: proteína Rieske ferro-enxofre (QcrA), subunidade citocromo B (QcrB) e subunidade citocromo C (QcrC) (Ko e Choi, 2016). Este complexo é codificado pelo operon QcrCAB (Kim *et al.*, 2015). Através de estudos de mutagênese, QcrB se mostrou como sendo uma proteína essencial para a viabilidade do bacilo (Sasseti *et al.*, 2003; Griffin *et al.*, 2011). A subunidade B tem papel chave na função do complexo *bc*, uma vez que coordena todas as partes deste complexo (Ko e Choi, 2016).

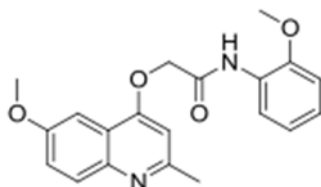
Diversos grupos de pesquisa identificaram a QcrB do complexo citocromo *bc₁* como sendo o alvo molecular de novos compostos (Petthe *et al.*, 2013; Rybniker *et al.*, 2015; Phummarin *et al.*, 2016). Esta proteína é a subunidade B do citocromo *bc₁* oxidase e está envolvida no metabolismo energético, mais especificamente, no transporte de elétrons (Cole, 2016). Sua função é consistente com os achados de que inibidores que atuam nesta via causam

uma depleção dos níveis de ATP do bacilo (Petthe *et al.*, 2013; Rybniker *et al.*, 2015). Dentre os candidatos a fármacos que atuam nesta enzima, o Q203 é o mais avançado nas etapas de desenvolvimento, estando em fase clínica I. Este composto possui potente inibição do crescimento micobacteriano, mesmo frente a cepas MDR e XDR-TB, além de possuir uma baixa toxicidade (Petthe *et al.*, 2013). Para a identificação do alvo molecular da Q203, foram selecionados mutantes espontâneos e estes possuíam uma mutação T313A na proteína QcrB. Este aminoácido aparentemente está localizado no sítio de ligação do menaquinol, próximo ao local de interação da proteína QcrA (Petthe *et al.*, 2013; Cole, 2016). Além disso, este resíduo alinha-se com uma Ala-277 do citocromo *b* humano, desta forma, os humanos possuem uma resistência intrínseca a estes compostos (Petthe *et al.*, 2013; Abrahams *et al.*, 2016; Cole, 2016). Além destas moléculas, ainda foi identificada outra classe de moléculas amida não-imidazopiridinas que também parecem inibir a QcrB (Arora *et al.*, 2014). Neste estudo os pesquisadores também hipotetizaram que algumas cepas eram capazes de superar a inibição do complexo *bc₁* através da superexpressão dos genes da citocromo *bd* oxidase e *cydDC*, que são um complexo respiratório alternativo. Esta hipótese foi confirmada quando este complexo foi inativado e as cepas se tornaram altamente sensíveis aos compostos testados (Arora *et al.*, 2014).

A essencialidade do citocromo *bc₁* em *M. tuberculosis* associada com as diferenças desta enzima em relação à humana, tornam esta proteína um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose.

1.4. 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas

Uma triagem fenotípica de grande escala foi realizada pela GalaxoSmithKline (GSK) em 2013 (Ballell *et al.*, 2013) e, neste estudo, 177 pequenas moléculas com características farmacológicas relevantes e com atividade frente ao *M. tuberculosis* foram identificadas. As 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas constituem uma das classes químicas de compostos descritas neste trabalho. Neste estudo, estas moléculas exibiram considerável atividade inibitória frente ao crescimento de *M. tuberculosis*, apresentando valores de CIM menores que 1 μ M e com baixa citotoxicidade quando testados em células HepG2 ($IC_{50} > 50 \mu$ M) (Ballell *et al.*, 2013). Dentre os três derivados da classe 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas reportados, o composto GSK358607A (**Figura 5**) apresentou melhor atividade frente ao *M. tuberculosis* com CIM de 0,70 μ M e com significativo índice de seletividade (Ballell *et al.*, 2013).

Figura 5 – Estrutura química do GSK358607A

Fonte: Ballell *et al.*, 2013

Alguns grupos de pesquisa selecionaram os compostos mais ativos identificados pela GSK para realizar estudos de relação estrutura-atividade e otimização de suas propriedades (Giacobbo *et al.*, 2016; Phummarin *et al.*, 2016; Pissinate *et al.*, 2016; Pitta *et al.*, 2016). Uma característica importante de sua estrutura é que possuem um anel quinolínico, que está presente em diversos fármacos anti-tuberculose, como a bedaquilina, mefloquina e fluoroquinolonas (Lilienkampf *et al.*, 2009; Pitta *et al.*, 2016).

Os estudos com esta classe de moléculas são recentes, mas revelaram sua alta eficiência antimicobacteriana e sua baixa citotoxicidade frente a células HepG2 e Vero (Pissinate *et al.*, 2016; Pitta *et al.*, 2016), além de alta estabilidade biológica (Giacobbo *et al.*, 2016), alta efetividade intracelular (Giacobbo *et al.*, 2016; Pitta *et al.*, 2016) e baixa cardiotoxicidade em modelos de *zebrafish* (Pissinate *et al.*, 2016). Recentemente foi publicado um artigo que sugere que as 2-(quinolin-4-ilóxi) acetamidas tem como alvo a QcrB de *M. tuberculosis* (Phummarin *et al.*, 2016). Neste trabalho, os derivados de 2-(quinolin-4-ilóxi) acetamidas foram testados frente a cepas contendo mutações no gene *qcrB* e apresentaram resistência. Entretanto, conforme os demais trabalhos que fazem a determinação de alvo de novos compostos, ainda há a necessidade de confirmação e validação do alvo destas moléculas por meio da seleção de mutantes espontâneos e sequenciamento completo do genoma (Andries *et al.*, 2005; Pethe *et al.*, 2013; Rybniker *et al.*, 2015; Abrahams *et al.*, 2016).

1.5.DNA girase

O processo de replicação de DNA é bastante complexo, e envolve um conjunto de proteínas capazes de coordenar as reações que culminam na formação de uma fita de DNA-filha idêntica à fita mãe. Durante este processo, ocorre o desenrolamento e abertura da dupla fita de DNA; o espaço entre as duas fitas é chamada de forquilha de replicação. Com o deslocamento desta forquilha de replicação, ocorre o superenrolamento da fita de DNA a jusante, levado a uma tensão na dupla fita (chamada de supertorção positiva), sendo que a

tensão formada a montante da forquilha é chamada de supertorção negativa (Alberts *et al.*, 1997). Esta tensão é aliviada com o auxílio das proteínas DNA-topoisomerases, que diferem entre procariotos e eucariotos (Alberts *et al.*, 2010).

Em eucariotos, existem dois tipos de topoisomerases: a topoisomerase I e II. A enzima topoisomerase I é responsável pela clivagem de uma das fitas de DNA, possibilitando que as fitas girem livremente uma em relação à outra. Enquanto a proteína topoisomerase I estiver ligada ao DNA, ela manterá a energia liberada pela clivagem da ligação fosfodiéster; a religação ocorre de forma rápida e sem gasto de energia, e é catalisada pela enzima DNA ligase. A proteína topoisomerase II realiza uma quebra em ambas as fitas de DNA utilizando ATP. O processo de desenrolamento promovido pela topoisomerase II pode ser descrito em três passos principais: (1) clivagem reversível de uma dupla-hélice; (2) passagem da segunda dupla-hélice, que está próxima, pela abertura; (3) religação da quebra e dissociação do DNA. Dessa forma, as topoisomerases do tipo II podem separar dois círculos de DNA entrelaçados (Alberts *et al.*, 2010).

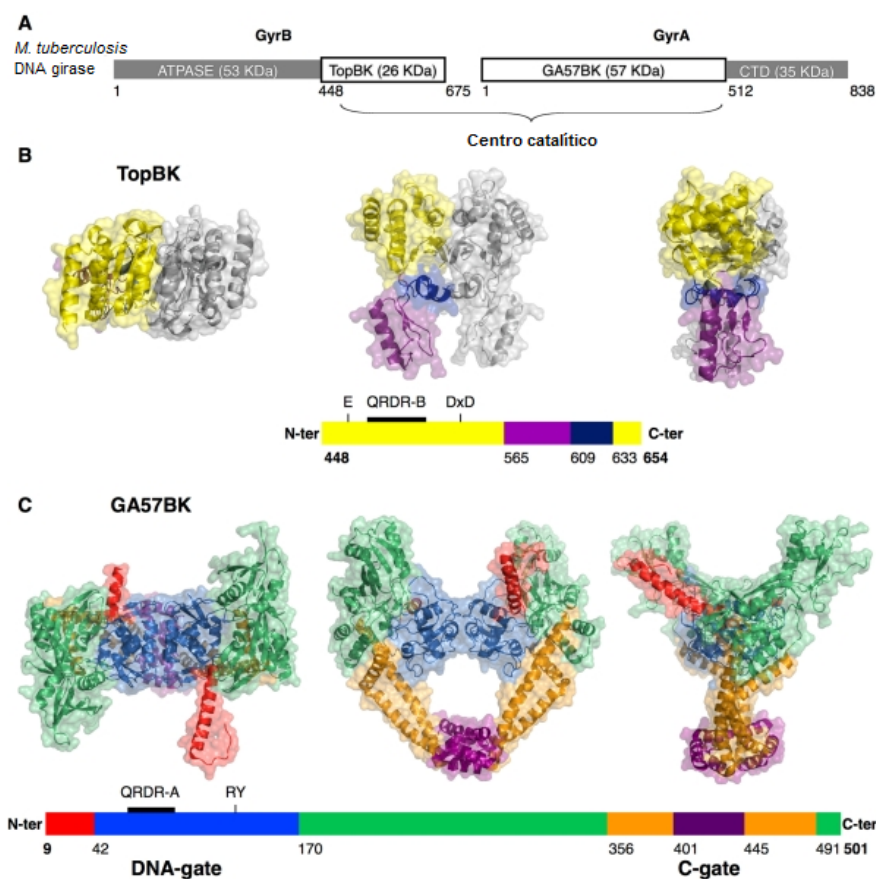
Em procariotos, a topoisomerase II, também chamada de DNA girase, promove o relaxamento do DNA superenrolado através de uma quebra temporária na dupla-fita de DNA, o que facilita o processo de replicação. Ainda, a DNA girase é a única enzima capaz de catalisar o superenrolamento negativo da fita de DNA, sendo essencial para que a replicação, transcrição e recombinação sejam eficientes (Aubry *et al.*, 2004). Esta proteína é composta por duas subunidades A e duas subunidades B, de modo que se liga ao DNA na forma de tetrâmero e é capaz de compactar o DNA em um superenrolamento negativo (Drlica e Zhao, 1997).

A DNA girase também desempenha outras funções dentro da célula: ela mantém um nível de supertorções negativas, o que ativa o cromossomo para todos os processos que envolvem a separação da dupla fita de DNA. Este nível de supertorção depende de sinais extracelulares que a DNA girase é capaz de reconhecer, promovendo a supertorção do DNA. Ainda, esta enzima facilita o movimento dos complexos da replicação e transcrição através desta adição de supertorções negativas. Por fim, esta proteína promove a remoção de nós do DNA e auxilia na movimentação e enrolamento do DNA (Drlica e Zhao, 1997).

Como descrito anteriormente e ilustrado na **figura 6**, a DNA girase de *M. tuberculosis* é um tetrâmero formado por quatro subunidades, sendo duas delas chamadas de A e duas de B. Estas subunidades são codificadas pelos genes *gyrA* (Rv0006) e *gyrB* (Rv0005), os quais estão localizados na posição 7.302 e 5.240 do DNA genômico de *M. tuberculosis*, respectivamente (Lew *et al.*, 2011). A estrutura da DNA girase ainda não pôde ser completamente elucidada,

porém a organização estrutural e bioquímica de seus domínios funcionais foi determinada por cristalografia. A subunidade A consiste em dois domínios, o domínio conjunto de clivagens N-terminal e um domínio carboxiterminal, chamado de CTD. A subunidade B consiste em um domínio ATPase seguido por um domínio Tropin (domínio conservado em topoisomerasas). O tropin GyrB e o domínio conjunto de clivagens de GyrA provém de subunidades separadas e juntos formam o centro da enzima. O domínio conjunto de clivagem contém uma tirosina catalítica responsável pela clivagem e religação do DNA dupla hélice. O domínio de conjunto de clivagens liga-se ao segmento de DNA chamado de segmento G. O domínio N-terminal ATPase dimeriza-se ao ligar-se a ATP, capturando o DNA para ser transportado (segmento T). O segmento T é então passado através da quebra temporária no segmento G aberto pelos domínios conjunto de clivagens, o DNA é liberado assim como o segmento T, e a enzima retorna ao seu estado inicial. Em 2010, Piton e colaboradores caracterizaram estruturalmente dois componentes do centro catalítico da DNA girase de *M. tuberculosis*. Neste estudo, a estrutura do domínio conjunto de clivagens em GyrA revela novas interações promissoras para desenho de novos fármacos. Ainda, foram obtidas estruturas com alta resolução do domínio Tropin em GyrB, que revelou duas regiões desordenadas que possuem papel essencial durante a reação catalítica da DNA girase (Piton *et al.*, 2010).

Figura 6 - Organização dos domínios e estruturas dos domínios individuais do centro catalítico da DNA girase de *M. tuberculosis*



Nota: **A** Organização dos domínios da DNA girase de *M. tuberculosis*. O centro catalítico é composto pelo domínio Tropin e o domínio conjunto de clivagens. **B** Três visualizações ortogonais do domínio Tropin dimérico. **C** Três visualizações do domínio conjunto de clivagens dimérico.

Fonte: Adaptado de Piton *et al*, 2010

Logo após a descoberta da DNA girase, começou-se a suspeitar que esta proteína fosse o alvo molecular das quinolonas. Hoje em dia, sabe-se que a DNA girase é, de fato, o alvo desta classe de fármacos. Estes medicamentos podem promover a morte celular de duas maneiras: (1) inibindo a atividade da DNA girase e/ou (2) evitando que esta enzima se desligue do DNA. É importante ressaltar que, como a topoisomerase II de eucariotos é bastante diferente da de procariotos, há uma alta seletividade e especificidade na ação destes fármacos, o que diminui as chances de toxicidade (Sharma *et al.*, 2009).

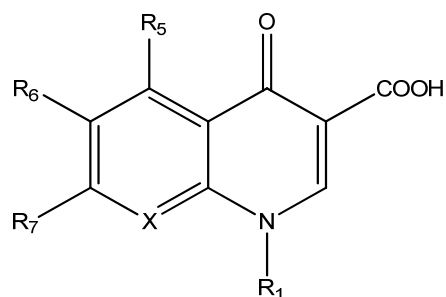
Porém, com o processo de pressão seletiva através do uso indiscriminado de antibióticos e os processos de adaptação bacteriana, foram selecionadas mutações nos genes que codificam esta proteína, levando ao surgimento de micobactérias resistentes. Na sequência codificadora

da DNA girase existem regiões altamente conservadas que são determinantes de resistência às quinolonas (QRDR), estas são os principais pontos para o aparecimento de mutações. Estas QRDR foram reportadas em diversas espécies bacterianas, inclusive *M. tuberculosis* (Maruri *et al.*, 2012). Maruri e colaboradores realizaram um estudo avaliando as mutações presentes em cepas resistentes de isolados clínicos. Neste trabalho, os autores encontraram que 64% das cepas analisadas (n=1220) possuíam mutação na região QRDR de *gyrA* e 0.5% fora desta região. Ainda, na avaliação de 534 cepas para mutação em *gyrB* os autores relataram que em 3% das amostras a mutação se encontrava dentro de QRDR e em 2% dos casos mutações fora de QRDR. Diversos estudos relatam cepas resistentes provenientes de isolados clínicos que possuem mutações nestas regiões, sendo as mais comuns em cepas de *M. tuberculosis* no gene *gyrA* e raramente no *gyrB* (Takiff *et al.*, 1994; Kocagöz *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996; Aubry *et al.*, 2006; Maruri *et al.*, 2012; Alvarez *et al.*, 2014; Mayer e Takiff, 2014). As principais posições onde se encontraram mutações foram nos aminoácidos 90 e 94 da proteína GyrA e 510 da GyrB.

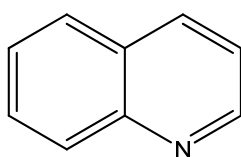
O aminoácido da posição 94 de GyrA encontrado na cepa selvagem é um ácido aspártico que, quando modificado, geralmente é substituído por uma glicina, histidina, tirosina ou asparagina. O aminoácido 510 da GyrB selvagem é a asparagina, que geralmente é substituída por um ácido aspártico. Estas mutações nos genes *gyrA* e *gyrB* foram diretamente relacionadas com a resistência às quinolonas (Alangaden *et al.*, 1995; Kocagöz *et al.*, 1996; Aubry *et al.*, 2006; Maruri *et al.*, 2012; Mayer e Takiff, 2014).

1.6. Quinolonas

A primeira quinolona descoberta foi o ácido nalidíxico e, a partir de sua estrutura básica, os demais compostos clinicamente importantes da classe foram derivatizados. A estrutura química básica de uma quinolona é composta por um ácido 4-piridona-3-carboxílico associado a um 5,6-naftilpiridina (**Figura 7**) (Emami *et al.*, 2005). Esta pode ser modificada de diferentes formas como, por exemplo, através de uma reação de fluoração é possível obter uma fluoroquinolona ou, também, alterações estruturais que originam seu tautômero quinolínico (hidroxiquinolina) (**Figura 8**). Estas modificações permitem o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos, visando aumentar a atividade contra bactérias resistentes; reduzir a taxa de resistência emergente; melhorar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico do fármaco, a fim de aumentar a seletividade (Sharma *et al.*, 2009).

Figura 7 - Estrutura básica de uma quinolona.

Fonte: adaptado de Emami *et al.*, 2005.

Figura 8 - Estrutura básica de uma quinolina.

Fonte: adaptado de Marella *et al.*, 2013

As quinolonas podem ser classificadas de acordo com seu espectro de atividade e perfil farmacocinético, conforme demonstrado na **tabela 2** (Oliphant e Green, 2002; Sharma *et al.*, 2009).

Tabela 2 - Classificação das fluoroquinolonas

Geração	Fármacos	Propriedades características
Primeira	Ácido nalidíxico	Ativo contra algumas bactérias Gram negativas
	Ácido oxolínico	Alta afinidade por ligação a proteínas
	Ácido pipemídico	Meia-vida curta
Segunda	Norfloxacino	Ligação a proteínas (50%)
	Enoxacina	Meia-vida mais longa que os anteriores
	Ciprofloxacino	Atividade melhorada contra bactérias Gram negativas
	Ofloxacino	
	Lomefloxacino	
Terceira	Temafloxacino	Ativa contra bactérias Gram negativas
	Esparafloxacino	Ativa contra bactérias Gram positivas
	Grepafloxacino	
Quarta	Clinafloxacino	Demonstram extensiva atividade contra ambas as cepas bacterianas
	Trovafloxacino	
	Moxifloxacino	Ativa contra anaeróbios e bactérias atípicas
	Gatifloxacino	

Fonte: Adaptado de Sharma *et al.*, 2009

Conforme descrito anteriormente, as quinolonas possuem como mecanismo de ação a inibição da enzima DNA girase, o que promove a quebra das fitas de DNA e consequente morte celular (Oliphant e Green, 2002). Uma vez que a topoisomerase II de eucariotos possui uma atividade (endonuclease) e estrutura diferente da girase de procariotos (gera supertorções), ocorre um processo de seletividade, o que confere maior especificidade e menor toxicidade a estes fármacos (Sharma *et al.*, 2009). A maioria das fluoroquinolonas tem como alvo a subunidade A da proteína, entretanto a novobiocina, que é um produto natural da classe das aminocumarinas, é o único fármaco aprovado que possui a subunidade B como alvo (Chopra *et al.*, 2012). As características farmacocinéticas destes medicamentos são bastante favoráveis: são bem absorvidos após administração oral e possuem ótima biodisponibilidade, pois não se ligam a proteínas plasmáticas. Após a administração oral, as quinolonas possuem boa penetração em diversos fluídos e tecidos, exceto no sistema nervoso central. Ainda, estes compostos são excretados por vias renais e não renais, o que diminui as chances de toxicidade. Esta classe de medicamentos é comumente usada para o tratamento de infecções urinárias, prostatite, doenças respiratórias, doenças sexualmente transmissíveis, gastroenterites e infecções de pele e mucosas (Oliphant e Green, 2002; Sharma *et al.*, 2009).

Como as micobactérias não possuem a topoisomerase IV, a resistência às fluoroquinolonas está diretamente relacionada a mutações que ocorrem nos genes que codificam a DNA girase, principalmente na região QRDR de *gyrA*, mas também na região QRDR de *gyrB*. Além disso, diferentes mutações podem causar diferentes graus de resistência antibiótica (Mayer e Takiff, 2014). Os mecanismos pelos quais os microrganismos desenvolvem resistência são diversos, porém os principais relacionados a esta classe de medicamentos são: (1) mutação espontânea na região QRDR da enzima DNA girase, principalmente na subunidade A, o que diminui a afinidade do fármaco pelo complexo DNA girase-DNA; (2) mecanismos de resistência que demoram a aparecer em uma população, como a excreção do fármaco de dentro da célula através de bombas de efluxo, o que geralmente está associado a mutações em genes que codificam porinas. Porinas são proteínas de membrana através das quais as quinolonas entram na célula (Sharma *et al.*, 2009). Em *M. tuberculosis*, o primeiro mecanismo de resistência é o mais comumente encontrado (Palomino e Martin, 2014).

1.7. Manipulação genética em *M. tuberculosis*

Inicialmente, os estudos genéticos em micobactérias estavam focados nas espécies de crescimento rápido e não patogênicas como, por exemplo, o *Mycobacterium smegmatis*, uma vez que não é necessária a manipulação deste organismo em laboratório de nível de

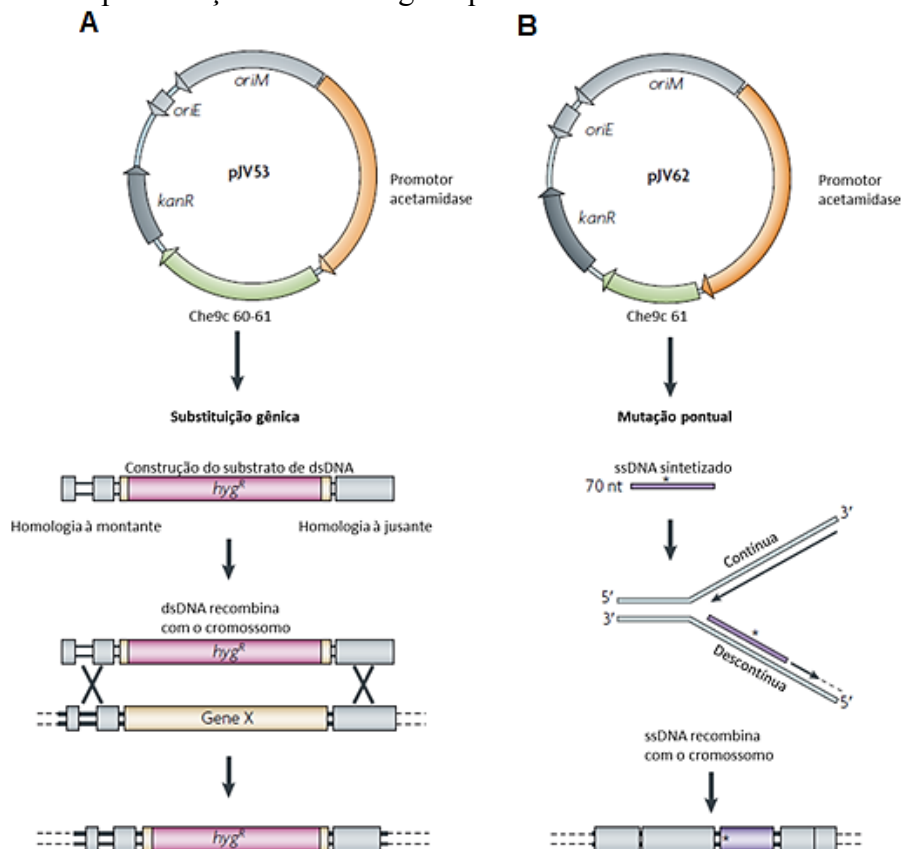
biossegurança 3 e os experimentos são relativamente rápidos. As dificuldades de se trabalhar com *M. tuberculosis* são seu crescimento lento (aproximadamente três semanas para visualização de colônias em meio sólido), alto índice de recombinação homóloga ilegítima e também baixa eficiência de transformação (Smith, 2003). Nas últimas duas décadas, alguns métodos de manipulação genética em *M. tuberculosis* foram desenvolvidos e se mostraram eficazes, como a (i) interrupção direta de um gene selvagem por um cassete que confere resistência antibiótica (canamicina, higromicina e estreptomicina); (ii) inativação global de genes utilizando um DNA exógeno, (iii) complementação com a utilização de vetores integrativos; (iv) método anti-senso, onde um RNA anti-senso é utilizado para diminuir a expressão de determinado gene (Smith, 2003). A alta incidência da tuberculose estimulou o desenvolvimento de pesquisas em busca do melhor entendimento do metabolismo do *M. tuberculosis* e da biologia do bacilo, com o objetivo de encontrar novas alternativas terapêuticas. Para isso, ferramentas moleculares para manipulação genética deste microrganismo foram surgindo, porém, como citado anteriormente, estas técnicas apresentam um alto nível de recombinação homóloga ilegítima, o que acaba por dificultar a construção de um mutante pelo mecanismo de troca alélica (Husson *et al.*, 1990). Sendo assim, um método capaz de aumentar a frequência de recombinação homóloga simplificaria e tornaria mais eficaz este tipo de experimento. Através da descoberta e do desenvolvimento de sistemas que promovem uma recombinação homóloga eficiente, estudos envolvendo construção de mutantes foram otimizados para a utilização de fagos que facilitem a manipulação genética de micobactérias.

1.7.1. *Recombineering*

O termo “*recombineering*” se refere à engenharia genética utilizando a expressão de proteínas que aumentam a eficiência de recombinação. Esta técnica se baseia na expressão de recombinases codificadas por bacteriófagos, cuja finalidade é de aumentar a frequência de recombinação homóloga, permitindo a construção de nocautes gênicos, deleções, inserções, mutações pontuais, clonagem *in vivo*, mutagênese de cromossomos bacterianos artificiais, plasmídeos e construção de bibliotecas genômicas (Marinelli *et al.*, 2012). O *recombineering* foi inicialmente descrito para *Escherichia coli*, onde se observou que a expressão das proteínas RecE e RecT do profago Rac levam a altos níveis de recombinação homóloga. RecE é uma 5’-3’ exonuclease dependente de DNA fita dupla, enquanto a RecT é uma proteína que se liga a DNA fita simples que promove o anelamento de sequências complementares de DNA, troca de fitas e invasão de fitas (Van Kessel e Hatfull, 2007; Marinelli *et al.*, 2012).

Entretanto, em *M. tuberculosis* o método de *E. coli* não se mostrou eficaz. Estudos com micobacteriófagos mostraram que o fago Che9c possui as proteínas gp60 e gp61, homólogas ao RecE e RecT do profago Rac, respectivamente, e possuem atividade comprovada em micobactérias. A expressão destas recombinases em *M. tuberculosis* leva a um aumento substancial na frequência de recombinação homóloga (Van Kessel e Hatfull, 2007; 2008; Van Kessel *et al.*, 2008).

Figura 9 – Representação das estratégias que utilizam o sistema de *Recombineering*



Nota: Plasmídeos pJV53 e pJV62 expressam Che9C gp60 e gp61 ou somente gp61 a fim de aumentar a eficiência de recombinação homóloga de DNA fita dupla e DNA fita simples, respectivamente. **A:** nocaute gênico é obtido através da transformação com um fragmento linear dupla fita chamado de substrato de troca alélica, que contém 800-1000 pb de homologia de sequência com o locus alvo, intercalado com um gene de resistência antibiótica (como a higromicina: *hyg^R*). **B:** cepa contendo mutação pontual é construída através da transformação com DNA fita simples de 70 pb e contendo uma mutação centralizada (representada pelo *). Este DNA fita simples irá anelar na fita descontínua da forquilha de replicação, levando à recombinação.

Fonte: adaptado de van Kessel *et al.*, 2008.

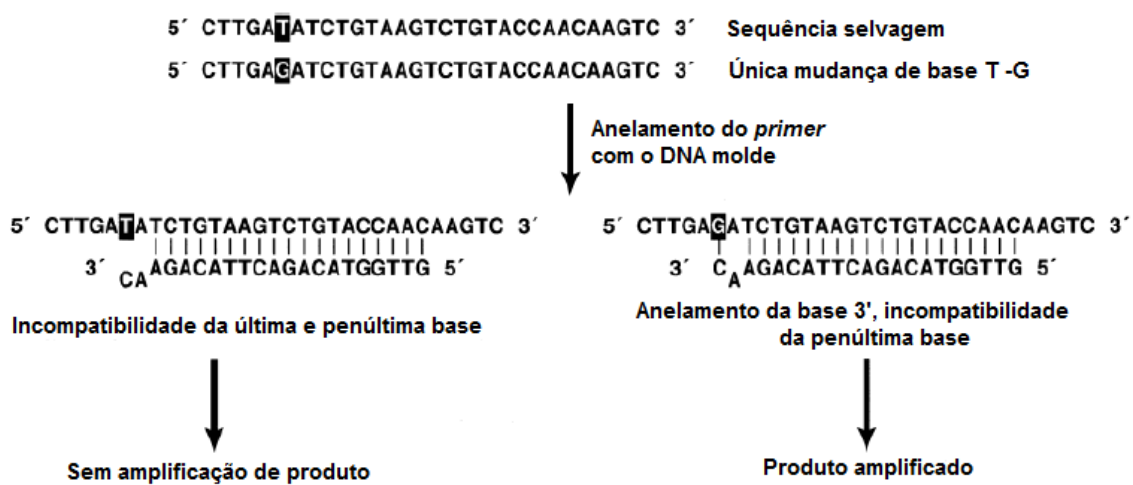
A técnica de *recombineering* mostrou ser eficiente tanto na obtenção de bactérias nocaute como de cepas contendo mutações pontuais, conforme demonstrado na **Figura 9** (Van Kessel e Hatfull, 2008; Van Kessel *et al.*, 2008). O trabalho publicado por van Kessel e Hatfull

em 2008 mostrou que a expressão das proteínas gp60 e gp61 em *M. tuberculosis* associadas a um DNA fita dupla linear, contendo entre 800-1000 pb de homologia de sequência com as regiões flanqueadoras do gene de interesse e intercalado por um gene de resistência a antibiótico (exemplo: higromicina), é o suficiente para que o evento de recombinação homóloga ocorra, levando à troca do alelo selvagem pelo substrato de troca alélica (AES) e gerando uma cepa nocaute (**Figura 9A**) (Van Kessel *et al.*, 2008). Na figura, o plasmídeo pJV53 contém os genes gp60 e gp61 clonados sob regulação de um promotor induzível por acetamidase. Porém os autores relatam que a eficiência da técnica de *recombineering* pode ser limitada pela baixa eficiência de transformação das células eletrocompetentes de *M. tuberculosis*. Segundo os dados do trabalho, somente uma célula viável em 1000 células efetivamente recebe o DNA transformado.

Além disso, conforme demonstrado na figura, o plasmídeo pJV62 contém apenas o gene que codifica a proteína gp61 clonado sob controle de um promotor induzível por acetamidase. Com este gene sendo expresso em *M. tuberculosis*, é possível realizar uma transformação com um fragmento linear de DNA fita simples de 70 pb, complementar à fita descontínua da forquilha de replicação e possuindo uma mutação pontual centralizada (que pode ou não gerar resistência antibiótica), permitindo a obtenção de cepas contendo mutações pontuais (**Figura 9B**). Um problema encontrado quando se utiliza um fragmento que não gera resistência, é o fato de que 99,9% das células não são efetivamente transformadas. Nestes casos, os autores sugerem a co-transformação do fragmento linear com um plasmídeo (replicativo ou integrativo) contendo um gene de resistência antibiótica (como por exemplo, higromicina), que vai efetivamente selecionar as células competentes. As colônias selecionadas podem ser analisadas através da técnica de MAMA-PCR (do inglês *Mismatch Amplification Mutation Assay*) (Van Kessel e Hatfull, 2008). Esta técnica utiliza oligonucleotídeos iniciadores específicos, com uma única incompatibilidade de sequência na porção 3', permitindo a diferenciação do alelo selvagem para o mutante, conforme demonstrado na **Figura 10** (Cha *et al.*, 1992; Swaminathan *et al.*, 2001).

Desta forma, o sistema de *recombineering* se mostrou uma poderosa ferramenta para manipulação genética de *M. tuberculosis*.

Figura 10 - Esquema demonstrando a metodologia de MAMA-PCR



Fonte: Adaptado de Swaminathan *et al.*, 2001

2. JUSTIFICATIVA

A tuberculose tem sido o foco de grande preocupação por atingir cerca de 30% da população mundial. Devido ao aumento da incidência de cepas MDR e XDR-TB, a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos e tratamentos alternativos se torna evidente. A triagem fenotípica de bibliotecas de compostos tem se mostrado uma estratégia promissora na descoberta de novos candidatos a fármacos para o tratamento da tuberculose. Utilizando esta metodologia, em 2013, Ballell e colaboradores identificaram diversas classes químicas de compostos com características farmacológicas interessantes e atividade antimicobacteriana. Dentre os compostos sugeridos por Ballell e colaboradores, as 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas se destacaram pela potente atividade antimicobacteriana e baixa citotoxicidade. Entretanto, apesar de diversos estudos terem demonstrado que as 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas são compostos bastante promissores devido sua potente atividade inibitória frente ao *M. tuberculosis*, sua alta estabilidade biológica, atividade frente a isolados clínicos resistentes e também baixa toxicidade, a identificação do alvo molecular faz-se necessária para que estes compostos possam prosseguir nas etapas de desenvolvimento de candidatos a fármacos. Para isto, o presente trabalho se propõe a desenvolver uma estratégia para identificação e validação do alvo molecular das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas em *M. tuberculosis* utilizando ferramentas genéticas.

3. OBJETIVOS:

3.1. Objetivo geral:

Identificar o alvo molecular das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas.

3.2. Objetivos Específicos:

- Determinar a CIM das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis*;
- Construir uma cepa de *M. tuberculosis* mutante condicional para a DNA girase;
- Determinar a CIM das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas frente a cepas mutantes condicionais para a DNA girase;
- Construir cepas de *M. tuberculosis* contendo mutações pontuais nos genes que codificam a proteína GyrA (D94G) e GyrB (N499D);
- Determinar a CIM das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas frente a cepas mutantes pontuais de GyrA (D94G) e GyrB (N499D)
- Avaliar a inibição da DNA girase pelas 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas em ensaio de superenrolamento de DNA;
- Selecionar mutantes espontâneos de *M. tuberculosis* frente às 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas;
- Determinar a CIM dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose e das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas frente aos mutantes espontâneos;
- Realizar o sequenciamento completo do genoma dos mutantes espontâneos;
- Avaliar as interações do composto 12L com a proteína QcrB por estudos de *docking* molecular.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

O seguinte artigo está de acordo com as normas da revista *International Journal of Antimicrobial Agents*, para a qual foi submetido.

1 **Activity of 2(quinolin-4-yloxy)acetamides in *Mycobacterium tuberculosis* clinical**
2 **isolates and identification of their molecular target by whole genome sequencing**

3

4 Fernanda Teixeira Subtil^{a,b}, Anne Drumond Villela^{a*}, Bruno Lopes Abbadi^{a,b}, Valnês S.
5 Rodrigues-Junior^a, Cristiano Valim Bizarro^{a,b}, Luis Fernando Saraiva Macedo Timmers^{a,e},
6 Osmar Norberto de Souza^{b,e}, Kenia Pissinate^a, Pablo Machado^a, Alexandre López-Gavín^d,
7 Griselda Tudó^d, Julian González-Martín^d, Luiz Augusto Basso^{a,b,c}, Diógenes Santiago
8 Santos^{a,b,*}

9

10 *^aInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Centro de Pesquisas*
11 *em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,*
12 *PUCRS, Av. Ipiranga 6681 – Prédio 92A Tecnopuc, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil*

13 *^bPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre,*
14 *Brazil*

15 *^cPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre,*
16 *Brazil*

17 *^dServei de Microbiologia, CDB, Hospital Clínic de Barcelona–ISGlobal, Universitat de*
18 *Barcelona, Barcelona, Spain*

19 *^eLaboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas, PUCRS, Porto*
20 *Alegre, Brazil*

21 *Corresponding authors. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Centro
22 de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, PUCRS, Avenida Ipiranga, 6681,
23 TECNOPUC Prédio 92A, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel./fax: +55 51
24 33203629. E-mail address: anne.villela@pucrs.br(A.D. Villela) or diogenes@pucrs.br(D.S.
25 Santos).

26

27 **ABSTRACT**

28 The 2(quinolin-4-yloxy)acetamides have been reported as promising molecules for tuberculosis
29 treatment. Recent studies demonstrated its potent antimycobacterial activity, as well as its
30 biological stability and synergism with rifampicin. The identification of the molecular target is

31 an essential step towards the development of a novel drug candidate. Here we report the target
32 identification of the 2(quinolin-4-yloxy)acetamides. We found that these compounds are active
33 against isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin and ethionamide resistant clinical
34 isolates from *M. tuberculosis*. The initial evidence that DNA gyrase might be the target of
35 2(quinolin-4-yloxy)acetamides, based on high MIC values against ofloxacin-resistant clinical
36 isolates and structural similarities with fluoroquinolones, was discarded by experiments
37 performed with *M. tuberculosis* GyrA point mutant and DNA gyrase supercoiling inhibition
38 assay. We selected spontaneous mutants for compound 21 and observed that these strains were
39 also resistant to all 2(quinolin-4-yloxy)acetamides derivatives. The spontaneous mutants had
40 their genomes sequenced and the results revealed a single mutation in *qcrB* gene (T313A)
41 suggesting that the 2(quinolin-4-yloxy)acetamides target the cytochrome *bc₁* complex. The
42 protein-compound interaction was further investigated by molecular docking. These findings
43 reinforce the relevance of these compounds as promising candidates for the treatment of
44 multidrug-resistant tuberculosis.

45

46 **Keywords:** Tuberculosis; Clinical isolates; Quinoloxacetamides; Drug discovery; Target
47 identification

48

49 1. Introduction

50 Tuberculosis is a major health problem worldwide, leading to 1.5 million deaths and 10.4
51 million new cases in 2015 [1]. The emergence of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)
52 and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) cases, that are resistant to the main drugs
53 used to treat tuberculosis, makes the development of novel drugs essential to control
54 tuberculosis pandemic [2, 3]. A promising strategy to discover new drugs for tuberculosis
55 treatment is the phenotypic screening of molecules, which is based on the identification of
56 potential antimycobacterial agents by its ability to inhibit *Mycobacterium tuberculosis* growth
57 in culture medium or inside infected macrophages [2]. Once a lead compound is obtained, its
58 molecular target is usually identified by selecting spontaneous mutants and performing whole-
59 genome sequencing (WGS). The genes containing mutations found in this way could be
60 involved with drug's mechanism of action or resistance, which is confirmed through the use of
61 genetic manipulation techniques [2, 4, 5].

62 The screening of chemical libraries of compounds with satisfactory Minimal Inhibitory
63 Concentration (MIC) against live mycobacteria has delivered several promising drug
64 candidates [2, 6]. Amongst the molecules suggested by Ballel *et al* in 2013, the 2-(quinolin-4-
65 yloxy)acetamides were described as non-cytotoxic compounds with potent anti-tubercular
66 activity [6]. Further Structure-Activity-Relationship studies were published [7-9] and
67 demonstrated that chemical derivatives of these molecules showed a more potent effect against
68 the bacilli. Although these compounds have low blood stability and also hERG affinity, further
69 chemical optimization was able to circumvent these undesirable effects [9]. It was also showed
70 that these molecules have an intracellular activity similar to isoniazid and rifampicin in a
71 macrophage model as well as great efficacy against drug-resistant clinical isolates [7, 8].
72 Interestingly, these compounds have a synergistic effect in combination with rifampicin in the
73 checkerboard assay [8], revealing the potential use of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides in
74 combination chemotherapy for tuberculosis treatment.

75 In this study, we performed MIC determination for 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides
76 derivatives against *M. tuberculosis* clinical isolates resistant to isoniazid, rifampicin,
77 ethambutol, streptomycin, ethionamide and ofloxacin; evaluated DNA gyrase as the molecular
78 target by experiments carried out with *M. tuberculosis* GyrA point mutant and DNA gyrase
79 supercoiling assay; selected spontaneous mutants for a 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide
80 derivative, performed its phenotypic characterization, and WGS for molecular target
81 identification; and molecular docking studies to evaluate target-compound interactions.

82 2. Materials and methods

83 2.1. Activity of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives against *M. tuberculosis* clinical 84 isolates

85 MIC of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives 16-23 (**Table 1**) [8] were determined
86 for CDCT-2 (0727/11), CDCT-3 (193,194/10) and CDCT-27 (0128/09) strains, which are *M.*
87 *tuberculosis* multidrug-resistant clinical isolates. This assay was carried out as described
88 previously [8]. MICs of the 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives 1-15 (**Table 1**) [7] were
89 also determined against eleven quinolone resistant and three drug-susceptible *M. tuberculosis*
90 clinical isolates from Hospital Clínic de Barcelona (Barcelona, Spain), as described previously
91 [10]. An isolate was considered quinolone-resistant if it showed a MIC value above 1 µg/mL
92 to ofloxacin. The following commercialized fluoroquinolones were tested as a control:
93 ofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

94 2.2. Activity of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives against *M. tuberculosis* DNA gyrase 95 point mutant

96 2.2.1. Construction of *gyrA* point mutant

97 *M. tuberculosis* H37Rv strain was transformed with pNIT-ET plasmid and grown in
98 Middlebrook 7H10 agar 10% OADC (BD) containing 30 µg/mL apramycin at 37°C. pNIT-ET,
99 a nitrile-inducible plasmid [11], contains gp60 and gp61 genes from mycobacteriophage Che9c,
100 which encode recombinering proteins [12]. After 3 weeks, a single colony was cultivated in 5
101 mL Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10% OADC, 0.05% Tween-80, 0.2% glycerol,
102 and 30 µg/mL apramycin, and subcultivated in 50 mL of the same medium. After OD₆₀₀ reached
103 0.3-0.4, the expression of gp60 and gp61 genes were induced with 5 µM of isovaleronitrile
104 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The next day (OD₆₀₀ 0.8 - 1), electrocompetent cells
105 were prepared and transformed with 100 ng of a 70 bp oligonucleotide that anneals to the
106 lagging strand (5'-
107 cagcgaccagggtggccatgcgccaccaggctg**cc**gtagatcgacgcgctgcccggtgtagttg-3') and contains
108 a centralized point mutation in GyrA (D94G, in bold). After 3 days of recovery in Middlebrook
109 7H9 broth supplemented with 10% OADC, 0.05% Tween-80 and 0.2% glycerol, transformants
110 were plated on Middlebrook 7H10 agar 10% OADC containing 30 µg/mL apramycin and 0.125,
111 0.25 or 0.5 µg/mL moxifloxacin. Colonies were screened for mutations by mismatch
112 amplification assay (MAMA)-PCR [13] using the oligonucleotides PM_*gyrA*_F 5'-
113 gttcgtgtgttcgctcaagt-3', PM_*gyrA*_R 5'-atgcgccaccaggctgt-3', or PM_*gyrA*_MAMA_R 5'-

114 atgcgcaccaggctcc-3'. Clones containing the mutation identified by MAMA-PCR were also
115 evaluated by target DNA sequencing (Sanger).

116 2.2.2. Determination of minimal inhibitory concentration

117 The MIC determination for each 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivative 1-23 (**Table**
118 **1**) [7, 8] and for isoniazid (INH), rifampicin (RIF), ethambutol (ETB), moxifloxacin (MOX),
119 streptomycin (STR), and D-cycloserin (D-Cic) against *M. tuberculosis gyrA* point mutant strain
120 was performed as described previously [8]. Three tests were carried out independently, and
121 MIC values reported here were observed in at least two experiments or were the highest value
122 observed among the three assay replicates.

123 2.3. Activity of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives against DNA gyrase protein

124 2.3.1. Gene cloning, protein expression and purification

125 The *gyrA* and *gyrB* cloning, protein expression and purification protocols were adapted
126 from Aubry *et al* [14] with minor modifications. Briefly, *gyrA* and *gyrB* genes were amplified
127 from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA using the oligonucleotides C_*gyrA*_F (5'-
128 ttttcatatgacagacacgacgttgcc-3') and C_*gyrA*_R (5'-ttttctcgagattgcccgctctggtctgc-3'); C_*gyrB*_F
129 (5'- ttttcatatggctgcccagaaaaagaag-3') and C_*gyrB*_R (5'-ttttctcgaggacatccaggaaccgaacatc-3');
130 forward (F) oligonucleotides containing NdeI and reverse (R) XhoI enzyme restriction sites
131 (underlined). The *gyrA* and *gyrB* genes were cloned into pET29a(+) and pET19b(+) (Novagen,
132 Darmstadt, Hessen, Germany), respectively. GyrA and GyrB proteins were expressed in
133 *Escherichia coli* BL21plySs(DE3) (Novagen, Darmstadt, Hessen, Germany), and purified using
134 His Spin Trap column (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, United States).

135 2.3.2. DNA gyrase supercoiling assay

136 The activity of the purified DNA gyrase was assessed by a supercoiling assay, where
137 different concentrations of the enzyme were evaluated by its ability to convert 0.5 µg of relaxed
138 pBR322 plasmid (Inspiralis, Norwich, UK) into its supercoiled form. Before performing the
139 assay, 30 µM of each purified GyrA and GyrB subunits were incubated in the same
140 concentration (equimolar) at room temperature for 25 minutes. The assay protocol was carried
141 out as described by Inspiralis (Gyrase Supercoiling Protocol), with minor modifications. The
142 enzyme concentration of 0.1 µM was chosen to perform a screening test using a range of
143 concentrations from 50 µM to 0.5 µM of compounds 7 and 14, and from 5 µM to 0.05 µM of
144 moxifloxacin (positive control of inhibition). The reaction mix was incubated for 1 hour and 30

145 minutes at 37°C and stopped with 30 µL of chloroform:isoamyl alcohol 24:1 (v:v) (Sigma-
146 Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 30 µL of stop buffer (Inspiralis). Agarose gel electrophoresis
147 was performed using 0.5x TBE buffer for 120 minutes at 75V. The gel was stained in a 0.5
148 µg/mL ethidium bromide bath for 30 minutes and visualized in ChemiDoc MP (Bio-Rad,
149 Hercules, CA, USA). The conversion of the relaxed DNA to its supercoiled form was observed
150 in the gel.

151 *2.4. Selection and phenotypic characterization of compound 21 spontaneous mutants from M.* 152 *tuberculosis*

153 Wild-type *M. tuberculosis* H37Rv strain (10^7 CFU) was plated into Middlebrook 7H10
154 agar supplemented with 10% OADC and containing 5.12, 10.24 or 20.48 µg/mL of compound
155 21, a 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivative, and incubated for 3 weeks at 37°C. Three
156 colonies were selected and inoculated separately in 5 mL Middlebrook 7H9 broth containing
157 10 % OADC, 0.05 % Tween-80 and glycerol 0.2 %. Suspensions from these cultures were
158 prepared, and MIC was determined for all 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives (**Table 1**)
159 [7, 8], as described above (Materials and Methods section 2.2.2).

160 *2.5. Whole genome sequencing of compound 21 spontaneous mutants*

161 Genomic DNA from three compound 21 spontaneous mutants and H37Rv strain were
162 extracted according to the protocol described previously [15]. WGS was performed using the
163 MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) by the company Neopropecta, Brazil, to
164 assess the molecular target of the 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivative 21. WGS data was
165 analyzed using MEGA 7 software [16].

166 *2.6. Structure prediction of QcrB protein from M. tuberculosis and docking with compound 21*

167 The interaction between the compounds and the QcrB subunit was evaluated by
168 molecular docking. The QcrB structure of *M. tuberculosis* was modeled using the subunit A of
169 the cytochrome *bc1* from *Rhodobacter sphaeroides* (PDB ID 2QJY) as a template [17, 18] and
170 the program I-TASSER [19] with its parameters set to their default values. The receptor and
171 ligand structures were prepared using AutoDockTools [20], whilst docking simulations were
172 performed with AutoDock4.2 [20], allowing flexibility to the ligands. The estimated energy of
173 binding (FEB) was provided by AutoDock4, and the binding mode was defined according to
174 the most populated cluster. The experiments employed the structure of QcrB from *M.*
175 *tuberculosis*. To ensure that compound 21 would be properly docked, a 3D-grid with
176 dimensions, 50 x 50 x 50 with spacing of 0.375 Å, was used to define the active site limiting

177 the search space to this region. The grid was defined in the Qp site region based on data
178 published previously [4, 18]. The Lamarckian Genetic Algorithm was employed with 100 runs
179 and the remaining parameters were set to their default values, except for number of evaluations,
180 which was set to 2,500,000.

181 **3. Results and discussion**

182 *3.1 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives are active against M. tuberculosis clinical* 183 *isolates resistant to isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin and ethionamide*

184 The 2(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives 16-23 (**Table 1**) [8] were tested against
185 CDCT-2 (0727/11), CDCT-3 (193,194/10) and CDCT-27 (0128/09) strains, which are
186 multidrug-resistant clinical isolates, resistant to isoniazid and rifampicin, with mutations in
187 *rpoB* (526 CAC-GAC, 516 GAC-GTC, wild-type, respectively) and *katG* (315 AGC-ACC).
188 CDCT-2 has also a mutation in the promoter region of *inhA* gene (C(-15)T), while the
189 correspondent promoter regions from CDCT-3 and 27 are wild-type. CDCT-2 is also resistant
190 to streptomycin and ethambutol, and CDCT-27 to ethambutol. As shown in **Table 2**, the
191 resistant phenotype for isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin and ethionamide did
192 not interfere with the 2(quinolin-4-yloxy)acetamides inhibition of *M. tuberculosis* growth.
193 These results corroborated with the previous findings [7, 8], and the lack of cross-resistance
194 with the currently used anti-tubercular agents makes the 2(quinolin-4-yloxy)acetamides
195 derivatives promising candidates for the treatment of MDR-TB.

196 *3.2 M. tuberculosis ofloxacin-resistant clinical isolates are resistant to 2-(quinolin-4-* 197 *yloxy)acetamide derivatives*

198 The MIC of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives 1-15 (**Table 1**) [7] was also
199 determined for eleven ofloxacin-resistant and three ofloxacin-sensitive clinical isolates. As
200 shown in **Table 3**, several 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides derivatives presented a higher MIC
201 value against the ofloxacin-resistant than against the sensitive strains. For instance, the MIC
202 values for the compounds 11, 12, 13, 15 and 13 against ofloxacin-resistant clinical isolates,
203 increased up to 64x, 32x, 16x, 16x and 8x, respectively, when compared with the sensitive
204 strains (**Table 3**). Interestingly, the Q7 clinical isolate shows a mild resistance to ofloxacin (2
205 $\mu\text{g/mL}$) and to all 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides derivatives, while Q1, Q2, Q8 and Q11
206 strains display strong resistance to ofloxacin and also to most 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides
207 derivatives (**Table 3**). GyrA D94H and A90V mutations present in Q1 and Q2 strains,
208 respectively, confer resistance to ofloxacin, but only moderately increases the MIC for

209 moxifloxacin (**Table 3**), which is consistent with other findings [21, 22]. Therefore, the
210 increased MIC values against ofloxacin-resistant clinical isolates, together with the structural
211 similarities shared by fluoroquinolones and 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides [9] raised the
212 hypothesis that DNA gyrase might be the molecular target of this chemical class. Since the
213 clinical isolates were partially characterized, it is not possible to guarantee that the mutations
214 found on specific DNA sequenced parts of their genomes are directly related to the resistant
215 phenotype.

216 3.3 *M. tuberculosis* GyrA D94G point mutant is sensitive to 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide 217 derivatives

218 In order to evaluate if the 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives resistance against
219 *M. tuberculosis* clinical isolates was related to the DNA gyrase mutation, a *M. tuberculosis*
220 strain containing a point mutation in *gyrA* gene (GyrA D94G) was constructed using
221 recombinering techniques [23]. After the transformation of *M. tuberculosis* H37Rv strain with
222 GyrA D94G oligonucleotide, five colonies were observed on plates. All clones were screened
223 by MAMA-PCR, and two GyrA D94G mutants were identified. Point mutant clones were
224 submitted to target DNA sequencing (Sanger) and the single nucleotide change was confirmed
225 (data not shown). One point mutant of GyrA D94G was used to perform the MIC determination
226 of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives. As shown in **Table 4**, the MIC for moxifloxacin
227 and ofloxacin increased for GyrA D94G point mutant when compared with H37Rv strain, while
228 the MIC values for other validated anti-tubercular drugs (isoniazid, rifampicin, streptomycin
229 and ethambutol) did not change. These results validated phenotypically the *M. tuberculosis*
230 GyrA D94G point mutant strain, which is only resistant to fluoroquinolones. However, the MIC
231 of the 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives against the GyrA D94G point mutant did not
232 change when compared with H37Rv strain (**Table 4**), diverging from the results found for the
233 *M. tuberculosis* ofloxacin-resistant clinical isolates (**Table 3**). Therefore, the DNA gyrase
234 mutation in GyrA D94G position, which is one of the most frequent mutations found in clinical
235 isolates resistant to fluoroquinolones [21, 24, 25], is not involved in the mechanism of inhibition
236 of *M. tuberculosis* growth by 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides. These results indicate that either
237 DNA gyrase is not the molecular target of these compounds or it is the target but its aspartic
238 acid at position 94 is not involved in its interaction with the enzyme. To address this question,
239 the ability of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides to inhibit DNA gyrase was evaluated by a
240 supercoiling assay.

241 3.4 DNA gyrase supercoiling activity is not inhibited by 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides

242 DNA gyrase is a type II topoisomerase that introduces negative supercoils into DNA at
243 the expense of ATP hydrolysis [14]. The DNA gyrase activity was analyzed by monitoring the
244 conversion of relaxed DNA to its supercoiled form in agarose gel electrophoresis experiment.
245 We found that the positive control, moxifloxacin, successfully inhibited DNA gyrase's activity
246 at a minimum concentration of 2.5 μ M, while the compounds 7 and 14 did not inhibit DNA
247 gyrase activity at any tested concentration (Supplementary **Fig. S1**). These results corroborated
248 with MIC determination for GyrA D94G point mutant, which suggested that DNA gyrase is not
249 the molecular target of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides.

250 3.5 Compound 21-resistant spontaneous mutants are resistant to all 2-(quinolin-4- 251 yloxy)acetamide derivatives and have a unique mutation in *qcrB* gene

252 To identify the molecular target of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides, the compound 21
253 was chosen among the derivatives to select for resistant spontaneous mutants, due to its great
254 anti-mycobacterial and intracellular activity as well as its metabolic stability [7]. Three clones
255 of compound 21-resistant spontaneous mutants were selected from plates containing 10.24
256 μ g/ml of compound 21 for further characterization. The MIC for validated anti-tubercular drugs
257 was determined for the selected spontaneous mutants. These three selected clones were not
258 resistant to isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin, ofloxacin and moxifloxacin,
259 presenting MIC values comparable to those found for H37Rv strain (**Table 4**). The MIC was
260 also determined for all the 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives (**Table 1**) [7, 8] against
261 one clone resistant to compound 21. As shown in **Table 4**, the selected spontaneous mutant was
262 resistant not only to compound 21 but also to all 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives
263 tested. These results suggest that all 2(quinolin-4-yloxy)acetamide derivatives have the same
264 molecular target. To identify the mutation involved in 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide
265 resistance, the WGS of the three selected clones of spontaneous mutants resistant to compound
266 21 were performed and compared with the *M. tuberculosis* H37Rv sequence. We also
267 resequenced the wild-type H37Rv strain using the same bacterial stock employed to perform
268 the screening for spontaneous mutants resistant to compound 21, in order to discard any
269 artefactual difference due to previous variations eventually present in our bacterial stock of
270 H37Rv when compared with the reference H37Rv genome. The sequence analysis revealed the
271 same substitution at the *qcrB* gene coding sequence of a nucleotide adenine at position 937 by
272 a guanine in the three clones (**Fig. 1A**). This mutation led to the amino acid change T313A (**Fig.**

273 **1B**). The *qcrB* gene was also amplified by PCR from the genomic DNA of the three selected
274 clones and submitted to target DNA sequencing, which confirmed the WGS data (data not
275 shown).

276 The *qcrB* gene encodes the subunit B of the cytochrome *bc₁* complex. This respiratory
277 complex is part of the electron transport chain, which is required for ATP synthesis. This
278 complex catalyzes the electron transfer from ubiquinol to cytochrome *c* [4]. Since the discovery
279 of Bedaquiline, a great interest in the development of new drugs that target the energy
280 metabolism is emerging, aiming to target the nonreplicating *M. tuberculosis* [26-28].

281 Recently, the molecular targets of Q203, an imidazopyridine amide, and Lanzoprazole,
282 a proton pump inhibitor belonging to the same class as omeprazole, were identified as the
283 cytochrome *bc₁* complex by WGS, where the mutation in *qcrB* gene that led to the amino acid
284 change T313A was identified [4, 18]. During the course of our study, Phummarin *et al* tested
285 the 2(quinolin-4-yloxy)acetamides against resistant *M. tuberculosis* strains containing different
286 mutations in *qcrB*, and suggested the molecular target of this chemical class as the cytochrome
287 *bc₁* complex [29], but no direct target identification was performed. In this work, we selected
288 spontaneous mutants resistant to our lead compound 21, following the same target identification
289 strategies used for several approved and under study anti-tubercular drugs, such as Bedaquiline
290 and Q203 [4, 5].

291 3.6. Molecular docking of QcrB protein from cytochrome *bc₁* complex with compound 21

292 The WGS results indicated that the subunit B of the cytochrome *bc₁* complex is the
293 molecular target of the 2(quinolin-4-yloxy)acetamides. Even though this complex is formed by
294 three subunits and is located in a single operon, the only relevant mutation found in WGS data
295 was in subunit B. Therefore, molecular docking experiments were carried out to evaluate how
296 the QcrB protein mutation T313A could interfere with the interaction of QcrB with compound
297 21. We obtained three clusters of conformations of compound 21 into the binding cavity of
298 QcrB protein, which were denominated as C1, C2 and C3, respectively. C1 have thirty four, C2
299 nine, and C3 thirty five structures. However, the difference observed for the free energy of
300 binding (FEB) values is within the intrinsic AutoDock4 error (-2.5 kcal/mol), making it difficult
301 to provide structural evidence about the best conformation based on the QcrB FEB values,
302 which were equal to -8.70, -8.51, and -8.26 kcal/mol for clusters C1, C2 and C3, respectively.
303 Therefore, we have chosen the two most populated clusters to describe the conformation of the
304 compound into the Q_p cavity. **Fig. 2** shows the conformation of the cluster C1 and C3. All

305 conformations of clusters C1 and C3 present the nitrogen of the conjugated ring positioned
306 close to the hydroxyl group of the T313. Because of the hydrophobicity of both compound and
307 binding cavity, the polar interaction between the T313 side chain and inhibitor could be
308 important to its stabilization. In addition, we suggest that the spontaneous mutation of T313A
309 confers resistance to 2(quinolin-4-yloxy)acetamides due to the lack of this interaction (N-OH).
310 These results indicate that the threonine side chain could be important for compound
311 stabilization. Since the alanine does not have the hydroxide on its side chain, the interaction
312 between the nitrogen in compound 21 and QcrB protein may be compromised. This residue is
313 located at the middle of a 12-residue helix and this region is important as it plays key roles in
314 the binding of Q_P inhibitors. The Q_P site is known as quinol oxidation site in various species
315 [30], and is essential for cell survival [31]. Interestingly, when the Q_P site is aligned with the
316 human cytochrome, it meets an Ala-277 [30], meaning that humans possibly have an intrinsic
317 resistance to 2(quinolin-4-yloxy)acetamides.

318 **4. Conclusions**

319 The 2(quinolin-4-yloxy)acetamides are active against clinical isolates resistant to
320 isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin and ethionamide, which make this chemical
321 class promising candidates for the treatment of MDR-TB. The understanding of 2(quinolin-4-
322 yloxy)acetamide mechanism of action is an important step towards its development as a future
323 anti-tubercular drug. The initial evidence that DNA gyrase might be the target of 2(quinolin-4-
324 yloxy)acetamides based mainly on high MIC values against ofloxacin-resistant clinical isolates,
325 was discarded by experiments performed with *M. tuberculosis* GyrA point mutant and DNA
326 gyrase supercoiling inhibition assay, and afterwards, QcrB protein was identified as the
327 molecular target by WGS. These findings emphasized that data from clinical isolates should be
328 interpreted carefully, since these strains are usually partially characterized, and in some cases,
329 the few mutations identified by target DNA sequencing are not related to the resistant
330 phenotype. The selection of spontaneous mutants followed by WGS was found to be an efficient
331 strategy to identify the 2(quinolin-4-yloxy)acetamide molecular target. Further studies are still
332 needed to assess pharmacological characteristics of the 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides.

333

334 *Acknowledgements:* We acknowledge Dr. Vinay Nandicori from National Institute of
335 Immunology (New Delhi, India) for providing the pNIT-ET plasmid, and Dr. Silvana Spindola
336 de Miranda from Federal University of Minas Gerais (Belo Horizonte, Brazil) for providing the

337 CDCT-2 (0727/11), CDCT-3 (193,194/10), and CDCT-27 (0128/09) *Mycobacterium*
338 *tuberculosis* clinical isolates.

339 *Funding:* This work was supported by the National Institute of Science and Technology
340 in Tuberculosis, Brazil [Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES], National Council for
341 Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq) [grant number 441720/2014-5 to
342 A.D.V.], and Brazilian Development Bank (BNDES) [grant number 14.2.0914.1]. F.T.S
343 acknowledges the fellowship by Coordination for the Improvement of Higher Education
344 Personnel (CAPES). D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06) and L.A.B. (CNPq, 520182/99-5) are
345 Research Career Awardees of CNPq.

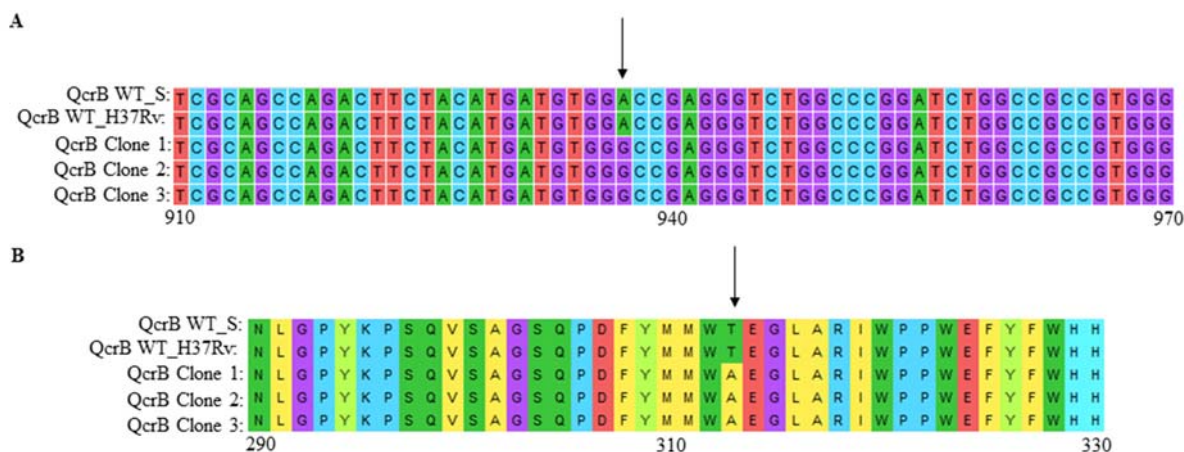
346 *Competing interests:* None declared.

347 **References**

- 348 [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Geneva: WHO press, 2016.
- 349 [2] Lechartier B, Rybniker J, Zumla A, Cole ST. Tuberculosis drug discovery in the post-post-
350 genomic era. *EMBO Mol Med* 2014;6:158-68.
- 351 [3] Cole ST. Inhibiting *Mycobacterium tuberculosis* within and without. *Philos Trans R Soc*
352 *Lond B Biol Sci* 2016;371.
- 353 [4] Pethe K, Bifani P, Jang J, Kang S, Park S, Ahn S, et al. Discovery of Q203, a potent clinical
354 candidate for the treatment of tuberculosis. *Nat Med* 2013;19:1157-60.
- 355 [5] Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Göhlmann HW, Neefs JM, Winkler H, et al. A
356 diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*
357 2005;307:223-7.
- 358 [6] Ballell L, Bates RH, Young RJ, Alvarez-Gomez D, Alvarez-Ruiz E, Barroso V, et al.
359 Fueling open-source drug discovery: 177 small-molecule leads against tuberculosis.
360 *ChemMedChem* 2013;8:313-21.
- 361 [7] Pissinate K, Villela AD, Rodrigues-Junior V, Giacobbo BC, Grams ES, Abbadi BL, et al.
362 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides are active against drug-susceptible and drug-resistant
363 *Mycobacterium tuberculosis* strains. *ACS Med Chem Lett* 2016;7:235-9.
- 364 [8] Giacobbo BC, Pissinate K, Rodrigues-Junior V, Villela AD, Grams ES, Abbadi BL, et al.
365 New insights into the SAR and drug combination synergy of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides
366 against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Med Chem* 2016;126:491-501.
- 367 [9] Pitta E, Rogacki MK, Balabon O, Huss S, Cunningham F, Lopez-Roman EM, et al.
368 Searching for new leads for tuberculosis: design, synthesis, and biological evaluation of novel
369 2-quinolin-4-yloxyacetamides. *J Med Chem* 2016;59:6709-28.
- 370 [10] Rodrigues-Junior VS, Villela AD, Gonçalves RS, Abbadi BL, Trindade RV, López-Gavín
371 A, et al. Mefloquine and its oxazolidine derivative compound are active against drug-resistant
372 *Mycobacterium tuberculosis* strains and in a murine model of tuberculosis infection. *Int J*
373 *Antimicrob Agents* 2016;48:203-7.
- 374 [11] Parikh A, Kumar D, Chawla Y, Kurthkoti K, Khan S, Varshney U, et al. Development of
375 a new generation of vectors for gene expression, gene replacement, and protein-protein
376 interaction studies in mycobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:1718-29.
- 377 [12] van Kessel JC, Hatfull GF. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Methods*
378 2007;4:147-52.

- 379 [13] Swaminathan S, Ellis HM, Waters LS, Yu D, Lee EC, Court DL, et al. Rapid engineering
380 of bacterial artificial chromosomes using oligonucleotides. *Genesis* 2001;29:14-21.
- 381 [14] Aubry A, Pan XS, Fisher LM, Jarlier V, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* DNA
382 gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity.
383 *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1281-8.
- 384 [15] Hosek J, Psvastova P, Moravkova M, Pavlik I, Bartos M. Methods of mycobacterial DNA
385 isolation from different biological material: a review. *Veterinarni Medicina* 2006;51:180-92.
- 386 [16] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis
387 Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870-4.
- 388 [17] Esser L, Elberry M, Zhou F, Yu CA, Yu L, Xia D. Inhibitor-complexed structures of the
389 cytochrome *bcI* from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biol Chem*
390 2008;283:2846-57.
- 391 [18] Rybniker J, Vocat A, Sala C, Busso P, Pojer F, Benjak A, et al. Lansoprazole is an
392 antituberculous prodrug targeting cytochrome *bcI*. *Nat Commun* 2015;6:7659.
- 393 [19] Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure
394 and function prediction. *Nat Methods* 2015;12:7-8.
- 395 [20] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4
396 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*
397 2009;30:2785-91.
- 398 [21] Mayer C, Takiff H. The molecular genetics of fluoroquinolone resistance in
399 *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spectr* 2014;2:MGM2-0009-2013.
- 400 [22] Sirgel FA, Warren RM, Streicher EM, Victor TC, van Helden PD, Böttger EC. *gyrA*
401 mutations and phenotypic susceptibility levels to ofloxacin and moxifloxacin in clinical isolates
402 of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1088-93.
- 403 [23] van Kessel JC, Hatfull GF. Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-
404 stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets. *Mol*
405 *Microbiol* 2008;67:1094-107.
- 406 [24] Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C, et al. A
407 systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant
408 *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J Antimicrob*
409 *Chemother* 2012;67:819-31.
- 410 [25] Cohen KA, Bishai WR, Pym AS. Molecular basis of drug resistance in *Mycobacterium*
411 *tuberculosis*. *Microbiol Spectr* 2014;2:MGM2-0036-2013.

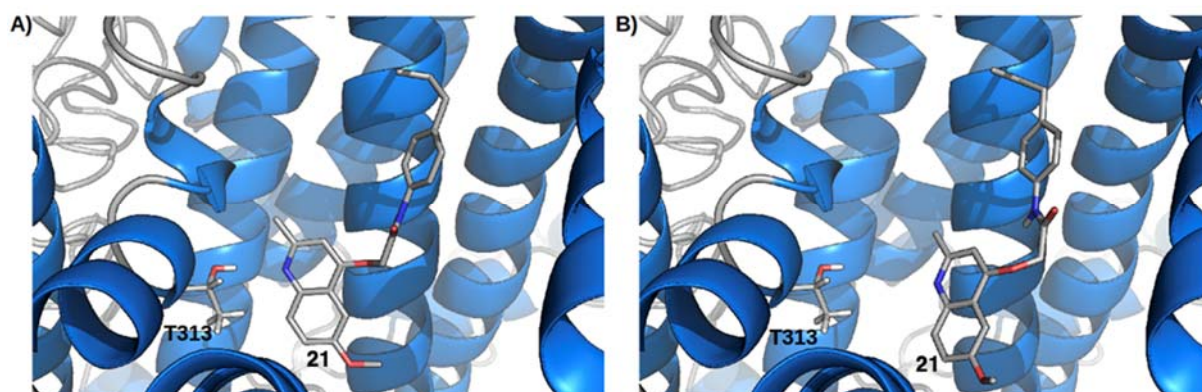
- 412 [26] Rao SP, Alonso S, Rand L, Dick T, Pethe K. The protonmotive force is required for
413 maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium*
414 *tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:11945-50.
- 415 [27] Arora K, Ochoa-Montaña B, Tsang PS, Blundell TL, Dawes SS, Mizrahi V, et al.
416 Respiratory flexibility in response to inhibition of cytochrome C oxidase in *Mycobacterium*
417 *tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:6962-5.
- 418 [28] Kim MS, Jang J, Ab Rahman NB, Pethe K, Berry EA, Huang LS. Isolation and
419 characterization of a hybrid respiratory supercomplex consisting of *Mycobacterium*
420 *tuberculosis* cytochrome *bcc* and *Mycobacterium smegmatis* cytochrome *aa3*. J Biol Chem
421 2015;290:14350-60.
- 422 [29] Phummarin N, Boshoff HI, Tsang PS, Dalton J, Wiles S, Barry 3rd CE, et al. SAR and
423 identification of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides as *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome
424 *bc1* inhibitors. Medicina Chemistry Communications 2016;7:2122-7.
- 425 [30] Ko Y, Choi I. Putative 3D Structure of QcrB from *Mycobacterium tuberculosis*
426 cytochrome *bc1* complex, a novel drug-target for new series of antituberculosis agent Q203.
427 Bulletin of the Koreal Chemical Society 2016;37:725-31.
- 428 [31] Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by
429 high density mutagenesis. Mol Microbiol 2003;48:77-84.

430 **Figures and legends**

431

432 **Figure 1. Analysis of whole genome sequencing (WGS) data from compound 21**
 433 **spontaneous mutants comparing with *M. tuberculosis* H37Rv (control) using MEGA 7**
 434 **software. A. WGS nucleotide alignment of control and compound 21 spontaneous mutants. B.**
 435 **WGS amino acid sequence alignment. The mutation ACC to GCC at nucleotide position 937**
 436 **or T313A (amino acid) is indicated by an arrow. QcrB_WT_S is the standard sequence from**
 437 **Tuberculist database; QcrB_WT_H37Rv is the sequence from H37Rv strain obtained by WGS,**
 438 **QcrB clone 1, 2 and 3 are the sequences from compound 21 spontaneous mutants' clones 1, 2,**
 439 **and 3 obtained by WGS.**

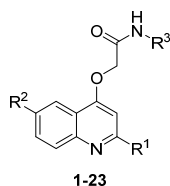
440



441

442 **Figure 2. Molecular docking results of QcrB protein with compound 21. The best docking**
 443 **poses of the cluster C1 (A), and C3 (B) into the Q_p binding cavity. The tertiary structure of**
 444 **QcrB protein is represented in ribbon, the helices are colored in blue and loops in grey. The**
 445 **residue T313 and the compound 21 are drawn as sticks and colored by CPK. Image generated**
 446 **with PyMOL program.**

447

448 **Tables**449 **Table 1** 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides derivatives used in this work.

450

Compounds ^a	ClogP ^b	R ¹	R ²	R ³
1	3.32	Me	MeO	MeO-2-C ₆ H ₄
2	3.05	Me	H	MeO-2-C ₆ H ₄
3	3.83	Me	MeO	Ph
4	3.91	Me	MeO	MeO-3-C ₆ H ₄
5	3.91	Me	MeO	MeO-4-C ₆ H ₄
6	3.34	Me	MeO	(MeO) ₂ -4-C ₆ H ₃
7	3.68	Me	MeO	Me-2-C ₆ H ₄
8	5.17	Me	MeO	CF ₃ -4-C ₆ H ₄
9	3.95	Me	MeO	Cl-2-C ₆ H ₄
10	4.80	Me	MeO	Cl-3-C ₆ H ₄
11	4.80	Me	MeO	Cl-4-C ₆ H ₄
12	4.95	Me	MeO	Br-4-C ₆ H ₄
13	3.86	Me	MeO	Bn
14	5.01	Me	MeO	2-Naphthyl
15	3.89	Me	MeO	
16	4.38	Pr	MeO	MeO-2-C ₆ H ₄
17	4.85	Me	MeO	
18	4.78	Me	MeO	(Me) ₂ -3,4-C ₆ H ₃
19	4.33	Me	MeO	Me-4-C ₆ H ₄
20	4.86	Me	MeO	Et-4-C ₆ H ₄
21	5.39	Me	MeO	Pr-4-C ₆ H ₄
22	5.92	Me	MeO	Bu-4-C ₆ H ₄
23	6.45	Me	MeO	Pent-4-C ₆ H ₄

451 ^aCompound 1 was first described by Ballell *et al.* [6]; compounds 2-15 and 16-23 were
 452 synthesized as described previously by Pissinate *et al.* [7] and Giacobbo *et al.* [8], respectively.

453 ^bClogP calculated by ChemBioDraw Ultra, version 13.0.0.3015.

454

455 **Table 2** Minimal inhibitory concentrations (MICs) of the 2(quinolin-4-yloxy)acetamide
 456 derivatives against *M. tuberculosis* H37Rv and clinical isolates resistant to isoniazid,
 457 rifampicin, streptomycin, ethambutol and ethionamide.

Compounds	Strains – MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^a			
	H37Rv	CDCT-2	CDCT-27	CDCT-3
Isoniazid	0.312	>100	25	25
Rifampicin	0.04	>100	0.4	6.25
Streptomycin	0.625	6.25	0.3	0.39
Ethambutol	1.25	25	50	6.25
Ethionamide	6.25	>100	12.5	3.13
16	0.01	<0.002	0.008	0.016
17	0.04	<0.002	0.008	0.008
18	0.04	<0.002	0.016	0.016
19	0.04	<0.002	0.031	0.031
20	0.02	<0.002	0.008	0.008
21	0.02	<0.002	0.004	0.008
22	0.08	<0.002	0.008	0.008
23	0.02	<0.002	<0.002	<0.002

458 ^aMIC values reported here were observed in two independent experiments or were the highest
 459 value observed among three independent assays.

460

461 **Table 3** Minimal inhibitory concentrations (MICs) of 2(quinolin-4-yloxy)acetamides against
 462 *M. tuberculosis* ofloxacin-resistant and ofloxacin-sensitive clinical isolates.

Compound s	Strains ^a (Ofloxacin-resistant and sensitive clinical isolates)– MIC (µg/mL)													
	Q1 _b	Q2 ^c	Q3	Q4 ^d	Q5 ^d	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	S1	S2	S3
Lev	8	4	2	2	1	1	2	2	1	1	2	0.5	0.25	0.5
Mox	1	0.25	0.25	0.25	0.125	0.25	0.125	0.25	0.135	0.125	0.5	0.125	0.125	0.125
Oflo	64	8	4	2	4	4	2	8	2	2	8	1	1	1
1	1	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0.06	0.5	0.5	1	0.5	0.125	0.06	0.125
3	1	1	2	1	2	1	0.5	2	1	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5
4	8	4	4	2	4	4	0.5	4	4	4	8	1	1	1
5	1	0.5	1	0.5	0.25	0.5	0.03	1	0.5	1	1	0.06	0.06	0.06
6	4	4	1	2	2	2	0.06	1	2	4	4	0.125	0.03	0.03
7	4	4	2	2	1	2	0.06	2	2	4	4	0.125	0.25	0.25
8	4	2	4	4	0.25	1	2	1	2	1	1	4	2	2
9	1	1	2	1	64	1	0.03	0.5	1	2	1	0.125	0.03	0.125
10	4	2	4	4	8	2	1	2	1	2	1	1	0.125	0.5
11	32	16	16	16	16	8	0.06	4	16	8	8	0.5	0.0125	0.125
12	16	8	8	16	16	2	0.06	2	8	4	2	0.5	0.0125	0.125
13	8	8	2	2	2	2	1	4	2	4	2	1	2	1
14	1	1	1	1	0.5	1	0.03	1	0.5	1	1	0.06	0.03	0.06
15	1	0.5	1	0.5	0.5	0.5	0.25	1	0.5	1	1	0.06	0.06	0.03

463 Lev, levofloxacin; Mox, moxifloxacin; Oflo, ofloxacin

464 ^a Q1-11, ofloxacin-resistant strains; S1-3, ofloxacin-sensitive strains

465 ^b Q1 has the *gyrA* mutation D94H (GAC → CAC)

466 ^c Q2 has the *gyrA* mutation A90V (GCG → GTG)

467 ^d Q4 and Q5 clinical isolates were also resistant to rifampicin and isoniazid

468

469 **Table 4** Minimal inhibitory concentrations (MICs) of the 2(quinolin-4-yloxy)acetamides
 470 against *M. tuberculosis* H37Rv, GyrA point mutant and compound 21 spontaneous mutants.

Compounds	Strains – MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^a		
	H37Rv	GyrA point mutant	Compound 21 mutant ^b
Isoniazid	0.312	0.312	0.312
Rifampicin	0.04	0.04	0.08
Streptomycin	0.625	0.625	0.625
Ethambutol	1.25	1.25	1.25
Ofloxacin	0.63	10	0.31
Moxifloxacin	0.08	5	0.16
1	0.156	0.04	>10
2	10	10	>10
3	0.156	0.04	10
4	0.312	0.156	>10
5	0.156	0.04	>10
6	0.156	0.156	>10
7	0.156	0.04	>10
8	0.31	0.31	>10
9	0.156	0.08	>10
10	0.08	0.31	>10
11	0.156	<0.02	>10
12	0.02	<0.02	>10
13	0.625	0.156	>10
14	<0.02	<0.02	>10
15	0.156	0.04	>10
16	0.01	<0.02	>10
17	0.04	<0.02	10
18	0.04	<0.02	>10
19	0.04	<0.02	10
20	0.02	<0.02	>10
21	0.02	<0.02	>10
22	0.08	<0.02	10
23	0.02	<0.02	>10

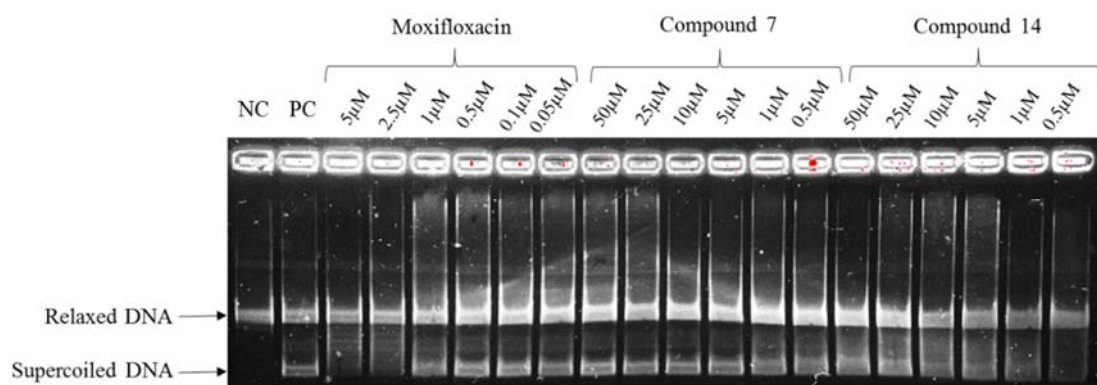
471 ^a MIC values reported here were observed in two independent experiments or were the highest
 472 value observed among three independent assays.

473 ^b MIC for all three spontaneous mutant clones were determined for isoniazid, rifampicin,
 474 ethambutol, streptomycin, ofloxacin and moxifloxacin. Since the same MIC results were
 475 obtained, one mutant was used to perform the MIC assay for all 2-(quinolin-4-yloxy)acetamide
 476 derivatives.

477

478

479 **Supplementary Figure S1.** DNA gyrase supercoiling activity is not inhibited by 2-(quinolin-
480 4-yloxy)acetamide derivatives 7 and 14. Relaxed pBR322 plasmid (0.5 mg) was incubated with
481 DNA gyrase (30 mM of each GyrA and GyrB subunits) in the presence of different
482 concentrations of moxifloxacin, compound 7 or 14. The reactions were stopped, and the DNA
483 products were analyzed by electrophoresis in agarose gel. Lanes NC and PC, Negative Control
484 without DNA gyrase and Positive Control with DNA gyrase and without inhibitor, respectively.
485



486

487

488

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tuberculose tem sido uma grande preocupação mundial e por isso tem se investido na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos na busca por alternativas de tratamento. Apesar das políticas de erradicação desta doença, ela se tornou a principal causa de morte por doença infecciosa no ano de 2015. Levando em consideração a *End TB strategy*, um dos pilares para a erradicação desta doença é a inovação. Desta forma, a descoberta de novas moléculas capazes de eliminar o bacilo faz parte deste pilar e se mostra essencial para atingirmos as metas desta estratégia.

A partir da publicação de Ballell e colaboradores, onde foram sugeridas diferentes classes de moléculas com características farmacológicas interessantes, o nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo uma série de compostos da classe das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas. Após diversos estudos de relação estrutura-atividade, avaliação de toxicidade em células e *zebrafish*, análise da atividade em diferentes cepas laboratoriais de *M. tuberculosis* e isolados clínicos resistentes, a identificação do alvo molecular faz-se necessária para dar continuidade as etapas de desenvolvimentos destes candidatos a fármacos. Para isto, o presente estudo buscou desenvolver uma estratégia para identificação e validação de alvos moleculares utilizando ferramentas genéticas.

Uma vez que as fluoroquinolonas, medicamento amplamente utilizado para o tratamento da tuberculose, validaram a DNA girase como um bom alvo para o tratamento da tuberculose, torna-se interessante o desenvolvimento de inibidores para esta enzima. Baseado em similaridade estrutural das fluoroquinolonas com as 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas, surgiu a hipótese de que ambas as classes tivessem o mesmo alvo. Desta forma, isolados clínicos resistentes a ofloxacino foram submetidos ao ensaio de CIM, onde foi observada resistência à serie química desenvolvida. Estes resultados corroboraram com a nossa hipótese. Para continuar o estudo de identificação de alvo, a técnica de *recombineering* foi utilizada para a construção de uma cepa laboratorial de *M. tuberculosis* contendo a mutação pontual no gene *gyrA* D94G, descrita como uma das principais mutações encontradas em isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a fluoroquinolonas (Maruri *et al.*, 2012; Cohen *et al.*, 2014; Mayer e Takiff, 2014). A resistência a fluoroquinolonas foi confirmada na mutante pontual, no entanto, a cepa se mostrou sensível a todos os compostos da série das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas. Os resultados obtidos indicaram que o resíduo de aminoácido D94 da subunidade GyrA da DNA girase não parece estar envolvido com o mecanismo de inibição das 2(quinolin-4-ilóxi)acetamidas) em *M. tuberculosis*, diferente das fluoroquinolonas. A fim de analisar se a

atividade inibitória das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas estava relacionada com a DNA girase, um teste de inibição composto-enzima foi realizado. Como a DNA girase catalisa a formação de superenrolamentos negativos na fita de DNA, um teste que verifica sua atividade é a observação da conversão de um DNA relaxado em sua forma superenrolada. Neste experimento, apenas o controle positivo, moxifloxacino, demonstrou inibição. Estes resultados negaram a nossa hipótese de que a DNA girase seria o alvo molecular das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas. A construção do mutante condicional para a DNA girase seria interessante para verificar se ao reduzir os níveis de expressão da proteína a CIM seria afetada, o que poderia confirmar o alvo molecular dos compostos, caso tivéssemos evidências de que este fosse a DNA girase. Entretanto, esta construção não foi finalizada por dificuldades experimentais.

Baseando-se na estratégia empregada por outros grupos para a identificação de alvo, prosseguiu-se, então, para a seleção de mutantes espontâneos resistentes ao composto 12L, derivado das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas. Selecionamos o composto 12L devido a sua alta atividade antimicobacteriana em ensaios de CIM e de macrófagos, além de sua alta estabilidade biológica. Após a obtenção dos mutantes, estes foram caracterizados fenotipicamente através da determinação da CIM. Todos os compostos da série das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas que foram testados se mostraram ineficazes contra o mutante espontâneo, enquanto que as fluoroquinolonas foram capazes de inibir o crescimento deste mutante. Estes resultados indicam que todos os compostos possuem um alvo molecular comum que mais uma vez não parece estar relacionado com a DNA girase. Em seguida, três clones mutantes espontâneos resistentes às 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas foram enviados para sequenciamento completo de genomas, realizado pela empresa Neopropecta (Brasil). A análise de resultados do sequenciamento completo mostrou que os 3 clones possuem uma substituição no nucleotídeo adenina da posição 937 por uma guanina no gene *qcrB*, que leva a uma alteração do aminoácido T313A. O gene *qcrB* codifica a subunidade B do complexo citocromo *bc1*. Estes resultados sugerem que o alvo molecular das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas é a subunidade B do citocromo *bc1* que é responsável pela transmissão de elétrons na cadeia respiratória do bacilo. Conforme descrito anteriormente, moléculas que atuam em alvos envolvidos no metabolismo energético se mostram promissoras frente à forma latente do bacilo. O combate da doença na sua forma latente é de extrema importância, uma vez que os indivíduos que possuem o bacilo na forma dormente podem se tornar uma fonte de transmissão de tuberculose. Micobactérias dormentes tem um baixo índice energético, portanto, moléculas que atuem impedindo a síntese de ATP podem ser eficazes neste contexto. Durante o desenvolvimento deste trabalho, outros estudos

foram publicados onde a atividade das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas foi relatada. Em novembro de 2016 Phummarin e colaboradores descreveram a atividade de seus derivados frente a cepas contendo diferentes mutações no gene *qcrB*. Seus achados demonstraram que estas cepas são resistentes às 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas e sugerem que seu alvo seja a subunidade B do complexo citocromo *bcl*. Apesar destes resultados, o nosso trabalho confirmou a QcrB como o alvo molecular desta série de compostos através da seleção de mutantes espontâneos seguida pelo sequenciamento completo do genoma, uma metodologia amplamente utilizada na determinação de alvos moleculares. Assim, nossos resultados corroboram e complementam os dados publicados recentemente a respeito do alvo molecular das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas.

A fim de melhor caracterizar a interação da molécula líder 12L com a proteína QcrB, o *docking* molecular foi realizado em parceria com o Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas da PUCRS. As estruturas putativas da QcrB selvagem e mutante foram baseadas na subunidade A de *Rhodobacter sphaeroides* (PDB ID 2QJY), onde na posição 313 encontramos uma treonina ou uma alanina, respectivamente (Rybniker *et al.*, 2015). Nestas análises, os resultados sugerem que a hidroxila presente na cadeia lateral da treonina é uma característica importante que está presente na proteína selvagem e que esta hidroxila é responsável por uma interação com o nitrogênio presente no núcleo da molécula 12L. Quando a ligação do composto 12L foi avaliada com a QcrB mutante, onde há uma alanina na posição 313, esta ligação não ocorreu, uma vez que a alanina não possui uma hidroxila na sua cadeia lateral. Desta forma, os resultados sugerem que esta interação OH-N é importante para a atividade farmacológica do composto 12L, porém os achados obtidos devem ser confirmados por estudos de cristalografia para melhor determinar a interação proteína-composto.

Para finalizar nossos estudos, pretendemos obter uma mutante pontual QcrB T313A e realizar um ensaio de CIM para validar esta proteína como sendo o alvo das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas. Além disso, como estas moléculas atuam no metabolismo energético do bacilo, iremos realizar um teste de toxicidade mitocondrial em células HepG2. Como as células HepG2 são resistentes a compostos com atividade tóxica frente a mitocôndria, devido a sua alta capacidade glicolítica, a substituição da glicose por galactose no meio DMEM fará com que se aumente o ritmo respiratório para que os níveis de ATP sejam mantidos. A oxidação da galactose para piruvato por meio de glicólise não fornece quantidades suficientes de ATP, desta forma, as células passam a necessitar da via mitocondrial para obter ATP. Nestas condições, as células estão mais suscetíveis a toxicantes mitocondriais (Marroquin *et al.*, 2007). Por fim,

sugere-se que moléculas que atuam no metabolismo energético são eficazes frente ao bacilo na sua forma latente. Para verificar esta hipótese, realizaremos testes de CIM das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas frente ao bacilo dormente (Taneja e Tyagi, 2007; Koul *et al.*, 2008).

A identificação de alvos moleculares é uma etapa essencial do desenvolvimento de novos fármacos. Este trabalho contribuiu para o melhor entendimento do mecanismo de ação das 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas em *M. tuberculosis* e possibilitou a identificação de um novo alvo molecular para o planejamento de fármacos. Outros estudos com estes compostos estão em andamento, como a determinação da farmacocinética, toxicidade aguda e crônica em células e ensaios pré-clínicos em camundongos, para que as 2(quinolin-4-ilóxi) acetamidas possam prosseguir nas etapas de desenvolvimento de um novo candidato a fármaco para tratar a tuberculose.

6. REFERÊNCIAS

ABRAHAMS, K. A. et al. Identification of KasA as the cellular target of an anti-tubercular scaffold. **Nat Commun**, v. 7, p. 12581, Sep 2016. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27581223> >.

ALANGADEN, G. J. et al. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutant strains of *Mycobacterium tuberculosis* selected in the laboratory and isolated from patients. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 8, p. 1700-3, Aug 1995. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7486904> >.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 3a Edição. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 438-439.

_____. **Biologia Molecular da Célula**. 5a Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. 278-279.

ALVAREZ, N. et al. The structural modeling of the interaction between levofloxacin and the *Mycobacterium tuberculosis* gyrase catalytic site sheds light on the mechanisms of fluoroquinolones resistant tuberculosis in Colombian clinical isolates. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 367268, 2014. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24877086> >.

ANDRIES, K. et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 307, n. 5707, p. 223-7, Jan 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591164> >.

ARORA, K. et al. Respiratory flexibility in response to inhibition of cytochrome C oxidase in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 11, p. 6962-5, Nov 2014. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25155596> >.

AUBRY, A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 4, p. 1281-8, Apr 2004. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15047530> >.

_____. Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and -hypersusceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of mutant enzymes. **Antimicrob Agents**

Chemother, v. 50, n. 1, p. 104-12, Jan 2006. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16377674> >.

BALLELL, L. et al. Fueling open-source drug discovery: 177 small-molecule leads against tuberculosis. **ChemMedChem**, v. 8, n. 2, p. 313-21, Feb 2013. ISSN 1860-7187. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23307663> >.

BOSHOFF, H. I.; BARRY, C. E. Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 1, p. 70-80, Jan 2005. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608701> >.

BOSHOFF, H. I. et al. The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action. **J Biol Chem**, v. 279, n. 38, p. 40174-84, Sep 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15247240> >.

CALLIGARO, G. L. et al. The medical and surgical treatment of drug-resistant tuberculosis. **J Thorac Dis**, v. 6, n. 3, p. 186-95, Mar 2014. ISSN 2072-1439. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24624282> >.

CHA, R. S. et al. Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene. **PCR Methods Appl**, v. 2, n. 1, p. 14-20, Aug 1992. ISSN 1054-9803. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1490171> >.

CHAN, B.; KHADEM, T. M.; BROWN, J. A review of tuberculosis: Focus on bedaquiline. **Am J Health Syst Pharm**, v. 70, n. 22, p. 1984-94, Nov 2013. ISSN 1535-2900. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24173008> >.

CHOPRA, S. et al. Evaluation of gyrase B as a drug target in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 2, p. 415-21, Feb 2012. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052686> >.

COHEN, K. A.; BISHAI, W. R.; PYM, A. S. Molecular Basis of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiol Spectr**, v. 2, n. 3, Jun 2014. ISSN 2165-0497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26103975> >.

COLE, S. T. Inhibiting *Mycobacterium tuberculosis* within and without. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 371, n. 1707, Nov 2016. ISSN 1471-2970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27672155> >.

COOPER, C. B. Development of *Mycobacterium tuberculosis* whole cell screening hits as potential antituberculosis agents. **J Med Chem**, v. 56, n. 20, p. 7755-60, Oct 2013. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23927683> >.

DARTOIS, V. The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, n. 3, p. 159-67, Mar 2014. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24487820> >.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, n. 3, p. 377-92, Sep 1997. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9293187> >.

DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption -- a review on tuberculosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697-714, Nov 2006. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160276> >.

EMAMI, S.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. Quinolones: Recent Structural and Clinical Developments. **Iraninan Journal of Pharmaceutical Research**, n. 3, p. 123-136, 2005.

GIACOBBO, B. C. et al. New insights into the SAR and drug combination synergy of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides against *Mycobacterium tuberculosis*. **Eur J Med Chem**, v. 126, p. 491-501, Nov 2016. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27914363> >.

GRIFFIN, J. E. et al. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 9, p. e1002251, Sep 2011. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21980284> >.

HOAGLAND, D. T. et al. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 102, p. 55-72, Jul 2016. ISSN 1872-8294. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27151308> >.

HUSSON, R. N.; JAMES, B. E.; YOUNG, R. A. Gene replacement and expression of foreign DNA in mycobacteria. **J Bacteriol**, v. 172, n. 2, p. 519-24, Feb 1990. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2153655> >.

KANA, B. D. et al. Characterization of the cydAB-encoded cytochrome bd oxidase from *Mycobacterium smegmatis*. **J Bacteriol**, v. 183, n. 24, p. 7076-86, Dec 2001. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717265> >.

KIM, M. S. et al. Isolation and Characterization of a Hybrid Respiratory Supercomplex Consisting of *Mycobacterium tuberculosis* Cytochrome *bcc* and *Mycobacterium smegmatis* Cytochrome *aa3*. **J Biol Chem**, v. 290, n. 23, p. 14350-60, Jun 2015. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25861988> >.

KO, Y.; CHOI, I. Putative 3D Structure of QcrB from *Mycobacterium tuberculosis* Cytochrome *bc1* Complex, a Novel Drug-Target for New Series of Antituberculosis agent Q203. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 37, p. 725-731, 2016.

KOCAGÖZ, T. et al. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 8, p. 1768-74, Aug 1996. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8843279> >.

KOUL, A. et al. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 483-90, Jan 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21270886> >.

_____. Diarylquinolines are bactericidal for dormant mycobacteria as a result of disturbed ATP homeostasis. **J Biol Chem**, v. 283, n. 37, p. 25273-80, Sep 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18625705> >.

LAWN, S. D.; ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 57-72, Jul 2011. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420161> >.

LECHARTIER, B. et al. Tuberculosis drug discovery in the post-post-genomic era. **EMBO Mol Med**, v. 6, n. 2, p. 158-68, Feb 2014. ISSN 1757-4684. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24401837> >.

LEIBERT, E.; DANCKERS, M.; ROM, W. N. New drugs to treat multidrug-resistant tuberculosis: the case for bedaquiline. **Ther Clin Risk Manag**, v. 10, p. 597-602, 2014. ISSN 1176-6336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25114537> >.

LEW, J. M. et al. TubercuList--10 years after. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 91, n. 1, p. 1-7, Jan 2011. ISSN 1873-281X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980199> >.

LILIENKAMPF, A. et al. Structure-activity relationships for a series of quinoline-based compounds active against replicating and nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **J Med Chem**, v. 52, n. 7, p. 2109-18, Apr 2009. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19271749> >.

MARELLA, A. et al. Quinoline: A versatile heterocyclic. **Saudi Pharm J**, v. 21, n. 1, p. 1-12, Jan 2013. ISSN 1319-0164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23960814> >.

MARINELLI, L. J.; HATFULL, G. F.; PIURI, M. Recombineering: A powerful tool for modification of bacteriophage genomes. **Bacteriophage**, v. 2, n. 1, p. 5-14, Jan 2012. ISSN 2159-7073. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666652> >.

MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, M. A.; DAFFÉ, M. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. **Chem Biol**, v. 21, n. 1, p. 67-85, Jan 2014. ISSN 1879-1301. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24374164> >.

MARROQUIN, L. D. et al. Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. **Toxicol Sci**, v. 97, n. 2, p. 539-47, Jun 2007. ISSN 1096-6080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17361016> >.

MARURI, F. et al. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 4, p. 819-31, Apr 2012. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22279180> >.

MAYER, C.; TAKIFF, H. The Molecular Genetics of Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiol Spectr**, v. 2, n. 4, p. MGM2-0009-2013, Aug 2014. ISSN 2165-0497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104201> >.

NIH. Tuberculosis (TB). 2007. Disponível em: < <https://www.niaid.nih.gov/topics/tuberculosis/understanding/Pages/Default.aspx> >. Acesso em: Jun 26.

OLIPHANT, C. M.; GREEN, G. M. Quinolones: a comprehensive review. **Am Fam Physician**, v. 65, n. 3, p. 455-64, Feb 2002. ISSN 0002-838X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11858629> >.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antibiotics (Basel)**, v. 3, n. 3, p. 317-40, Jul 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27025748> >.

PETHE, K. et al. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. **Nat Med**, v. 19, n. 9, p. 1157-60, Sep 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23913123> >.

PHUMMARIN, N. et al. SAR and identification of 2-(9-quinolin-4-yloxy)acetamides as *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome *bcl* inhibitors. **Medicina Chemistry Communications**, v. 7, n. 11, 2016, p. 2122-2127, 2016.

PISSINATE, K. et al. 2-(Quinolin-4-yloxy)acetamides Are Active against Drug-Susceptible and Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains. **ACS Med Chem Lett**, v. 7, n. 3, p. 235-9, Mar 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26985307> >.

PITON, J. et al. Structural insights into the quinolone resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e12245, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805881> >.

PITTA, E. et al. Searching for New Leads for Tuberculosis: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel 2-Quinolin-4-yloxyacetamides. **J Med Chem**, v. 59, n. 14, p. 6709-28, Jul 2016. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27348630> >.

RUSSELL, D. G.; BARRY, C. E.; FLYNN, J. L. Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. **Science**, v. 328, n. 5980, p. 852-6, May 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466922> >.

RYBNIKER, J. et al. Lansoprazole is an antituberculous prodrug targeting cytochrome *bcl*. **Nat Commun**, v. 6, p. 7659, Jul 2015. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26158909> >.

SASSETTI, C. M.; BOYD, D. H.; RUBIN, E. J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. **Mol Microbiol**, v. 48, n. 1, p. 77-84, Apr 2003. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12657046> >.

SES, S. E. D. S. D. R. G. D. S. Secretaria reúne os municípios no combate à tuberculose. 2016. Disponível em: < www.saude.rs.gov.br/conteudo/10352/?Secretaria_da_Saude_reune_municipios_prioritarios_n_o_combate_a_tuberculose >. Acesso em: Nov 21.

SHARMA, P. C.; JAIN, A.; JAIN, S. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. **Acta Pol Pharm**, v. 66, n. 6, p. 587-604, 2009 Nov-Dec 2009. ISSN 0001-6837. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20050522> >.

SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 3, p. 463-96, Jul 2003. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857778> >.

SWAMINATHAN, S. et al. Rapid engineering of bacterial artificial chromosomes using oligonucleotides. **Genesis**, v. 29, n. 1, p. 14-21, Jan 2001. ISSN 1526-954X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11135458> >.

TAKAYAMA, K.; WANG, C.; BESRA, G. S. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 1, p. 81-101, Jan 2005. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653820> >.

TAKIFF, H. E. et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* *gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, n. 4, p. 773-80, Apr 1994. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8031045> >.

TANEJA, N. K.; TYAGI, J. S. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. **J Antimicrob Chemother**, v. 60,

n. 2, p. 288-93, Aug 2007. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17586560> >.

VAN KESSEL, J. C.; HATFULL, G. F. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nat Methods**, v. 4, n. 2, p. 147-52, Feb 2007. ISSN 1548-7091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17179933> >.

_____. Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets. **Mol Microbiol**, v. 67, n. 5, p. 1094-107, Mar 2008. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18221264> >.

VAN KESSEL, J. C.; MARINELLI, L. J.; HATFULL, G. F. Recombineering mycobacteria and their phages. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 11, p. 851-7, Nov 2008. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923412> >.

VILLEMAGNE, B. et al. Tuberculosis: the drug development pipeline at a glance. **Eur J Med Chem**, v. 51, p. 1-16, May 2012. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421275> >.

WEINSTEIN, E. A. et al. Inhibitors of type II NADH:menaquinone oxidoreductase represent a class of antitubercular drugs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 12, p. 4548-53, Mar 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15767566> >.

WHO. **Global Tuberculosis Report** 2016.

XAVIER, A. S.; LAKSHMANAN, M. Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. **J Pharmacol Pharmacother**, v. 5, n. 3, p. 222-4, Jul 2014. ISSN 0976-500X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25210407> >.

XU, C. et al. Fluoroquinolone resistance associated with specific gyrase mutations in clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J Infect Dis**, v. 174, n. 5, p. 1127-30, Nov 1996. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8896523> >.

ZUMLA, A.; NAHID, P.; COLE, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 5, p. 388-404, May 2013. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23629506> >.

ANEXOS:

1. Carta de submissão deste trabalho para o *International Journal of Antimicrobial Agents*

Your recent submission to IJAA

International Journal of Antimicrobial Agents <eesserver@eesmail.elsevier.com>

seg 13/03/2017 11:44

Caixa de Entrada

Para: subtil-182@hotmail.com <subtil-182@hotmail.com>;

Dear Dr. Fernanda Teixeira Subtil,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: International Journal of Antimicrobial Agents

Corresponding Author: Diógenes Santos

Co-Authors: Fernanda Teixeira Subtil; Anne Drumond Villela; Bruno Lopes Abbadí; Valnês Rodrigues-Junior; Cristiano Valim Bizarro; Luis Fernando Saraiva Macedo Timmers; Osmar Norberto de Souza; Kenia Pissinate; Pablo Machado; Alexandre López-Gavín; Griselda Tudó; Julian González-Martín; Luiz Augusto Basso;

Title: Activity of 2(quinolin-4-yloxy)acetamides in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates and identification of their molecular target by whole genome sequencing

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at diogenes@puccs.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<https://ees.elsevier.com/ijaa/l.asp?i=85290&l=9JMVP0AQ>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

International Journal of Antimicrobial Agents

2. Artigo publicado no *European Journal of Medicinal Chemistry*

European Journal of Medicinal Chemistry 126 (2017) 491–501



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

New insights into the SAR and drug combination synergy of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides against *Mycobacterium tuberculosis*

Bruno Couto Giacobbo^{a,b}, Kenia Pissinate^a, Valnês Rodrigues-Junior^a, Anne Drumond Villela^a, Estêvão Silveira Grams^a, Bruno Lopes Abbadi^{a,b}, Fernanda Teixeira Subtil^{a,b}, Nathalia Sperotto^{a,c}, Rogério Valim Trindade^{a,b}, Davi Fernando Back^d, Maria Martha Campos^{a,b,c}, Luiz Augusto Basso^{a,b,c}, Pablo Machado^{a,b,*}, Diógenes Santiago Santos^{a,b,**}

^a Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^d Departamento de Química, Laboratório de Materiais Inorgânicos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2016

Received in revised form

20 November 2016

Accepted 21 November 2016

Available online 23 November 2016

Keywords:

Tuberculosis

Intracellular activity

Synergism

Drug-resistant strains

ABSTRACT

2-(Quinolin-4-yloxy)acetamides have been described as potent and selective *in vitro* inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) growth. Herein, a new series of optimized compounds were found to demonstrate highly potent antitubercular activity, with minimum inhibitory concentration (MIC) values against drug-susceptible and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in the submicromolar range. Furthermore, the most active compounds had no apparent toxicity to mammalian cells, and they showed intracellular activities similar to those of isoniazid and rifampin in a macrophage model of Mtb infection. Use of the checkerboard method to investigate the association profiles of lead compounds with first- and second-line antituberculosis drugs showed that 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides have a synergistic effect with rifampin. Ultimately, the good permeability, moderate rates of metabolism and low risk of drug-drug interactions displayed by some of the synthesized compounds indicate that 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides may yield candidates to use in the development of novel alternative therapeutics for tuberculosis treatment.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

3. Manuscrito submetido ao Journal of Biological Chemistry

IU-NH from Leishmania braziliensis

Thermodynamics, Functional and Structural Characterization of Inosine-Uridine Nucleoside Hydrolase from *Leishmania braziliensis*

Pedro Ferrari Dalberto[‡], Leonardo Kras Borges Martinelli[‡], Jose Fernando Ruggiero Bachega[§], Luis Fernando Saraiva Macedo Timmers[§], Antonio Frederico Michel Pinto[‡], Adilio da Silva Dadda[‡], Guilherme Oliveira Petersen[‡], Fernanda Teixeira Subtil[‡], Luiza Galina[‡], Anne Drummond Villela[‡], Kenia Pissinate[‡], Pablo Machado[‡], Cristiano Valim Bizarro[‡], Osmar Norberto de Souza[§], Edgar Marcelino de Carvalho Filho[¶], Luiz Augusto Basso^{‡1}, and Diogenes Santiago Santos^{‡1}

From [‡]Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), [§]Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas (LABIO), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre 90650-001, RS, Brazil, and [¶]Hospital Universitário Professor Edgar Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador 40110160, BA, Brazil

Running Title: *IU-NH from Leishmania braziliensis*

¹To whom correspondence may be addressed: Luiz A. Basso (e-mail: luiz.basso@pucrs.br) or Diogenes S. Santos (e-mail: diogenes@pucrs.br), Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 92A building at TECNOPUC, 4592 Bento Gonçalves avenue, Porto Alegre, RS – Brazil 90650-001, Telephone: +55 (51) 3320-3629.

Keywords: Leishmania, enzyme catalysis, hydrolase, protozoan, IU-NH, purine salvage, *Leishmania braziliensis*, biochemical characterization, crystallography

ABSTRACT

Leishmaniasis is considered one of the main endemic diseases in the world, and Brazil is among the countries which has the highest incidence of cutaneous and mucocutaneous forms of leishmaniasis caused mainly by *Leishmania braziliensis*. Although treatment to this disease is available, the first-line drugs against leishmaniasis have several limitations: parenteral administration, long duration of treatment, and serious toxicities. One key metabolic characteristic of these parasites is the lack of *de novo* purine biosynthesis pathway, making them auxotrophic to purines. Accordingly, they rely solely on the purine salvage pathway for nucleotide synthesis. A better understanding of the purine salvage pathway can reveal details of the biology of *L. braziliensis* that could, in turn, be used to develop new strategies to combat this parasite. The inosine-uridine nucleoside hydrolase from *L. braziliensis* (*LbIU-NH*) plays an important role in the salvage process and is an attractive drug target as there is no similar catalytic activity in mammals. Here, it is described cloning, heterologous protein expression, and a three-step purification protocol that yielded homogenous recombinant protein. Determination of *LbIU-NH* steady-state kinetic constants for inosine,

adenosine, cytidine and uridine are also reported. These data suggest that *LbIU-NH* displays characteristics of a nonspecific hydrolase. Thermodynamic profile suggests that α -D-ribose can bind to free enzyme with favorable enthalpic (ΔH) and entropic (ΔS) contributions. Thermodynamic activation parameters (E_a , ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger) for the *LbIU-NH*-catalyzed chemical reaction, pre-steady-state kinetics, solvent kinetic isotope effects, and pH-rate profiles are also presented. In addition, the crystal structure of *LbIU-NH* in complex with β -D-ribose and Ca^{2+} at 1.5 Å resolution is described.

INTRODUCTION

Trypanosomatidae family consists of protozoan parasites that can cause various diseases. Amongst its members, *Leishmania* is one of great importance, especially in Brazil, where the species *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) infant chagasi* have been identified.^{1,2} These protozoans are flagellated parasites that can cause several dermatological and visceral manifestations in mammals, known as leishmaniasis. This disease is an antrozoonose with great veterinary and medical significance.^{3,4} Its transmission is mediated by a female sand fly