

PUCRS

ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

BRUNO LOPES ABBADI

**ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE *Mycobacterium tuberculosis*
FRENTE A NOVOS COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

BRUNO LOPES ABBADI

**ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE *Mycobacterium tuberculosis* FRENTE A
NOVOS COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador:

Prof^o Dr. Cristiano Valim Bizarro

Coorientadora:

Dra. Anne Drumond Villela

Porto Alegre
2018

Ficha Catalográfica

A122e Abbadi, Bruno Lopes

Elucidação do mecanismo de resistência de *Mycobacterium tuberculosis* frente a novos compostos com atividade antimicobacteriana / Bruno Lopes Abbadi . – 2018.

102 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Valim Bizarro.

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

1. Resistência a antibiótico. 2. Desenvolvimento de fármacos. 3. MIC. 4. Mutantes espontâneos. 5. Tuberculose. I. Bizarro, Cristiano Valim. II. Villela, Anne Drumond. III. Título.

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

Bibliotecário responsável: Marcelo Votto Texeira CRB-10/1974

BRUNO LOPES ABBADI

**ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE *Mycobacterium tuberculosis* FRENTE A
NOVOS COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de ____.

BANCADA EXAMINADORA:

Prof^o Dr. Afonso Luís Barth

Prof^o Dr. Jeverson Frazzon

Prof^a Dra. Sílvia Dias de Oliveira

Porto Alegre

2018

Dedico esta tese à minha mãe Thais e à minha avó Vania, pelo amor ***incondicional***.

AGRADECIMENTOS

A vida do doutorando ao longo dos quatro anos pode ser bastante solitária. Boa parte do tempo, nós, doutorandos, conduzimos experimentos sozinhos, erramos sozinhos e temos que identificar e solucionar os *constant*es contratempos também sozinhos. ***Não é fácil.*** Aprender o mais rapidamente possível a lidar com a frustração diante de um resultado negativo ou de um erro experimental é o caminho mais seguro e *saudável* para aguentar esta longa jornada. Porém, lidar com essa frustração é algo de difícil dominação. Em muitos momentos fraquejamos. Nosso desejo de conduzir um novo experimento diminui. O medo de não vencer o prazo aumenta. Algumas perdas ao longo da trajetória nos entristecem. Surge a ansiedade. Vejo o jovem doutorando como um Galileu, ávido pelo conhecimento, enquanto que o *quase* doutor como um jogador no final de campeonato, esgotado. ***Felizmente,*** não estamos sozinhos nessa vida. Somos ajudados de diferentes formas por diversas pessoas. É seguro dizer que, sem elas, a finalização desta jornada não seria possível. Algumas pessoas deram o seu apoio na forma de trabalho. Outras, na forma de carinho, atenção e palavras de apoio. Independentemente de onde veio e de como foi a ajuda, quero expressar aqui meu ***muito obrigado*** a todos vocês.

Ao meu orientador, **Cristiano Bizarro**, agradeço pela confiança que sempre depositou no meu trabalho, pelo respeito, pela paciência nas horas de aflição e pelos ensinamentos que me passaste. Certamente foi um modelo de caráter e honradez. Que nossa parceria perdure muitos anos!

À minha coorientadora, **Anne Villela**, agradeço pelo imenso apoio dado desde o meu mestrado, pela ajuda na condução dos experimentos, pelas boas risadas durante o dia, pelas conversas sobre a vida, pela confiança depositada. Foste um modelo de profissional que certamente seguirei. Obrigado pela paciência, pela parceria e pela ajuda. Levarei nossa amizade pra sempre. Boa sorte na tua nova jornada canadense!

Ao **professor Diógenes Santos** (*in memoriam*), que infelizmente não terei a honra de tê-lo presente na minha defesa, agradeço por toda a confiança que teve no meu trabalho e por todo o apoio que deste para que eu o realizasse. Tenho consciência de que nunca mediste esforços para que eu desenvolvesse meus projetos. Muito obrigado!

Aos **professores Luiz Augusto Basso e Pablo Machado**, agradeço pela parceria de trabalho, pelas sugestões e orientações nos momentos de dificuldade e pela amizade. Desejo que nosso trabalho juntos renda ainda mais frutos nos próximos anos.

Aos **amigos de fé**, Dai, Fê Sub, Mari, Paulo e Rogério (*in memoriam*), agradeço pela amizade. A parceria de vocês certamente foi a força que me fez seguir em frente. Tê-los por perto tornou o doutorado mais leve. Obrigado pelas palavras de apoio, pelos cafezinhos na copa, pelos almoços sempre divertidos, pelas cervejadas fora do expediente, pelo ombro amigo e por estarem disponíveis nas horas de necessidade. Obrigado pela confiança em compartilharem seus momentos felizes e tristes. Desejo a todos vocês muitas felicidades e sucesso. Contem sempre comigo.

Aos **amigos e amigas do CPBMF** e da **Quatro G**, sendo eles ou elas alunos de iniciação científica, mestrandos, doutorandos, pós-docs, pesquisadores, funcionários, técnicos, *desta era e de outras anteriores*, agradeço pelo companheirismo, pelo apoio, pelo carinho e pelas boas risadas. Vocês tornam o ambiente de trabalho mais leve e divertido.

À minha **mãe Thais** e à minha **avó Vania**, agradeço pelo carinho, pela educação, pelo estímulo, pelo apoio, pela confiança, pelo colo, pela paciência, pela preocupação, pela torcida, pela vida. Vocês duas são os modelos que uso para conduzir a minha vida. Agradeço também ao meu **dindo Jorge** e ao meu **primo Cícero** por sempre estarem por perto. Muito obrigado por me fazerem feliz!

Ao **Kauê**, agradeço pela *enorme* paciência, pela alegria contagiante, por tornar a minha vida mais tranquila e feliz. *“Existem pessoas que sabem ser sol mesmo quando a vida está nublada”*. Muito obrigado!

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul** e ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular** pela excelência acadêmica. Sinto-me honrado em fazer parte dessa instituição e de ter sido graduado por esse programa de pós-graduação.

À **CAPES** pelo *importantíssimo* apoio financeiro na forma de uma bolsa integral de quatro anos, que tornou esse doutorado possível. Obrigado! Desejo que muitos outros doutorandos e doutorandas possam ter essa mesma oportunidade.

RESUMO

Os dados epidemiológicos relacionados à tuberculose (TB) indicam que ainda existe uma carga elevada desta doença no mundo todo. Além disso, o surgimento de cepas resistentes aos fármacos impõe uma nova ameaça na prevenção da propagação da TB. Portanto, é fundamental buscar continuamente novos candidatos para o desenvolvimento de medicamentos. No Capítulo 2 desta tese é apresentado o composto IQG-607, que é um complexo metálico que tem sido reportado como uma molécula anti-TB promissora contra cepas de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida (INH). Estudos prévios sugeriram que o composto inibe a enzima selvagem *trans*-2-enoil-[ACP] redutase dependente de NADH (InhA) e algumas das suas variantes estruturais, na ausência de NAD⁺ ou NADH e sem necessitar da enzima KatG. O IQG-607 também mostrou um perfil toxicológico favorável *in vivo*, com uma menor toxicidade em comparação à INH. No entanto, ainda existe uma lacuna em relação à atividade do IQG-607 contra cepas que carregam mutações no gene *katG*, as quais são as alterações genéticas mais comuns em isolados clínicos resistentes à INH. Sendo assim, este estudo focou em elucidar o mecanismo de resistência (MOR) do *Mycobacterium tuberculosis*, o principal agente causador da TB, ao composto IQG-607. Primeiramente, a concentração inibitória mínima (MIC) do IQG-607 foi estabelecida contra oito isolados clínicos multirresistentes a fármacos (MDR), os quais foram resistentes ao nosso composto. Então, variantes espontâneas foram selecionadas, usando-se altas concentrações do composto em meio ágar 7H10, e seus genomas completos foram sequenciados; os resultados revelaram alterações no gene *katG*. Uma cepa laboratorial, carregando o gene *katG*(S315T) variante, foi desenvolvida para acessar o efeito desta única mutação na atividade do composto, através da determinação de MIC e por meio de um modelo de infecção de macrófagos. Os resultados mostraram que essa mutação de fato foi suficiente para conferir resistência ao IQG-607. Finalmente, a resistência observada para a cepa que expressa a proteína InhA(S94A) variante sugeriu que o IQG-607 tem esta enzima como seu alvo molecular. No Capítulo 3, dois novos compostos, denominados Labio-16 e Labio-17, são apresentados, os quais foram previamente selecionados para interagir e inibir a enzima InhA, e que já tinham mostrado ser ativos contra a cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Um conjunto de experimentos foi conduzido para elucidar os seus mecanismos de ação (MOA) e para compreender o MOR do *M. tuberculosis* contra eles, similar àquele usado para estudar

o IQG-607. Até o momento, os resultados sugerem que a InhA não é o alvo molecular desses compostos. Outros experimentos estão em andamento em nosso laboratório, para avaliar em um modelo murino da infecção da TB os seus potenciais como candidatos a fármacos anti-TB.

Palavras-chave: Resistência a antibiótico. Desenvolvimento de fármacos. MIC. Mutantes espontâneos. Tuberculose. Sequenciamento completo do genoma.

ABSTRACT

Epidemiologic data regarding tuberculosis (TB) show that there is still a high burden of this disease worldwide. In addition, the emergence of drug-resistant strains imposes a new threat in preventing TB spread. Therefore, it is pivotal to continuously find new candidates for drug development. In the Chapter 2 of this thesis, the compound IQG-607 is presented, which is a metal complex that has been reported as a promising anti-TB molecule against isoniazid (INH)-resistant strains of *M. tuberculosis*. Previous studies suggested that the compound inhibits both the wild-type NADH-dependent *trans*-2-enoyl-[ACP] reductase (InhA) enzyme and some of its structural mutants in the absence of NAD⁺ or NADH and without requiring KatG enzyme. IQG-607 has also shown a favorable toxicological profile *in vivo*, with a considerable lesser toxicity compared to INH. However, there is still a gap regarding the activity of IQG-607 against strains carrying mutations in the *katG* gene, which are the most common genetic alterations in clinical isolates resistant to INH. Therefore, this study focused in elucidating the mechanism of resistance (MOR) of the *Mycobacterium tuberculosis*, the main causative agent of TB, to compound IQG-607. First the minimum inhibitory concentration (MIC) of IQG-607 was established against eight multi-drug resistant (MDR) clinical isolates, which were resistant to our compound. Then spontaneous mutants were selected using high concentrations of compound in 7H10 agar medium, and their whole genomes were sequenced; the results revealed alterations in the *katG* gene. A laboratory strain carrying the mutant *katG*(S315T) gene was developed to assess the effect of this single mutation in the compound activity both by MIC determination and by a macrophage infection model. Results showed that this mutation was indeed sufficient to confer resistance to IQG-607. Finally, the resistance observed for a strain expressing a mutant InhA(S94A) protein suggested that IQG-607 has this enzyme as its molecular target. In the Chapter 3, two new compounds, called Labio-16 and Labio-17, are presented, which were previously selected to interact and inhibit the InhA enzyme and that had already shown to be active against *M. tuberculosis* H37Rv strain. A set of experiments were conducted to elucidate their mechanism of action (MOA) and to understand the MOR of the *M. tuberculosis* against them, similar to those carried for studying IQG-607. So far, results suggested that the InhA is not the molecular target of these compounds. Other experiments

are undergoing in our laboratory to evaluate in a murine model of TB infection their potential as anti-TB drug candidates.

Keywords: Antibiotic resistance. Drug development. MIC. Spontaneous mutants. Tuberculosis. Whole-genome sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estimativas das taxas de incidência e mortalidade da TB no mundo.	16
Figura 2. Principais causas de mortes no mundo em 2015.	17
Figura 3. Estimativa da taxa de incidência da TB no Brasil e no mundo.	19
Figura 4. Coloração do <i>M. tuberculosis</i> pela técnica de Ziehl-Neelsen.	21
Figura 5. Representação gráfica da complexa parede celular micobacteriana.	22
Figura 6. Modo de infecção pelo <i>M. tuberculosis</i> e desenvolvimento da doença.	23
Figura 7. Fórmula estrutural de diferentes compostos com ação antimicobacteriana.	27
Figura 8. Um composto anti-TB deve percorrer um difícil caminho até encontrar o seu alvo.	31
Figura 9. Estrutura química dos ácidos micólicos encontrados no <i>M. tuberculosis</i>	33
Figura 10. Rota de biossíntese dos ácidos micólicos micobacterianos.	35
Figura 11. Mecanismo proposto para a autoativação do IQG-607.	44
Figura 12. Efeito do tratamento dos compostos Labio-16/17 sobre a biossíntese dos ácidos micólicos em <i>M. tuberculosis</i>	73
Figura 13. Cinética de morte de uma cultura de <i>M. tuberculosis</i> na presença do composto Labio-17.	75

LISTA DE SIGLAS

Anti-TB – Anti-tuberculose

CFU – Unidades formadoras de colônia

EMB – Etambutol

ETH – Etionamida

FAS – Sintases de ácidos graxos

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

INH – Isoniazida

InhA – *trans*-2-enoil-ACP redutase dependente de NADH

KatG – enzima catalase-peroxidase

LTBI – Infecção latente da tuberculose

MBC – Concentração bactericida mínima

MDR-TB – Tuberculose multirresistente a fármacos

MXF – Moxifloxacino

MIC – Concentração inibitória mínima

MOA – Mecanismo de ação

MOR – Mecanismo de resistência

MTBC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PZN – Pirazinamida

PYR – Piridomicina

RIF – Rifampicina

RR-TB – Tuberculose resistente à rifampicina

TB – Tuberculose

TCR - Triclosan

XDR-TB – Tuberculose extensivamente resistentes a fármacos

WT – tipo selvagem (do inglês *wild-type*)

SUMÁRIO

Capítulo 1

1	INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1	Dados epidemiológicos da tuberculose no mundo e no Brasil	16
1.2	A microbiologia do <i>M. tuberculosis</i>	20
1.3	Desenvolvimento de novos candidatos a fármacos anti-TB	24
1.4	A enzima InhA: um importante alvo validado para fármacos anti-TB	32
1.5	Mecanismo de ação da isoniazida	36
1.6	Mecanismo de resistência à isoniazida	38

Capítulo 2

1.7	O composto pentaciano(isoniazida)ferrato(II) (IQG-607) como candidato a fármaco para o tratamento da TB	42
2	OBJETIVOS	48
2.1	Objetivo Geral	48
2.2	Objetivos Específicos	48
3	ARTIGO CIENTÍFICO	49

Capítulo 3

1.8	Identificação de novos inibidores da enzima InhA de <i>M. tuberculosis</i>	62
4	OBJETIVOS	66
4.1	Objetivo Geral	66
4.2	Objetivos Específicos	66
5	METODOLOGIA	67
5.1	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) frente aos isolados clínicos MDR-TB e às cepas laboratoriais resistentes à INH	67
5.2	Teste de inibição da biossíntese dos ácidos micólicos	68

5.3	Avaliação do efeito combinado entre os compostos Labio-16/17 com outros fármacos anti-TB	68
5.4	Cinética de morte dos compostos Labio-16/17 frente ao <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	69
5.5	Modelo de infecção pelo <i>M. tuberculosis</i> em camundongos	70
5.6	Seleção de mutantes espontâneos para os compostos Labio-16 e Labio-17	70
6	RESULTADOS PARCIAIS.....	71
6.1	Os compostos Labio-16/17 são ativos frente a isolados clínicos MDR-TB e a cepas laboratoriais resistentes à INH	71
6.2	Os compostos Labio-16/17 não agem sobre a via de biossíntese dos ácidos micólicos.....	72
6.3	Os compostos Labio-16/17 não interferem na ação de outros fármacos anti-TB	73
6.4	O compostos Labio-17 exerce um efeito bacteriostático sobre o <i>M. tuberculosis</i>	74

Capítulo 4

7	DISCUSSÃO GERAL	77
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXO A	94
	ANEXO B	95
	ANEXO C	96
	ANEXO D	97
	ANEXO E	98
	ANEXO F.....	99
	ANEXO G.....	100
	ANEXO H.....	101

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Dados epidemiológicos da tuberculose no mundo e no Brasil

1.2 A microbiologia do *M. tuberculosis*

1.3 Desenvolvimento de novos candidatos a fármacos anti-TB

1.4 A enzima InhA: um importante alvo validado para drogas anti-TB

1.5 Mecanismo de ação da isoniazida

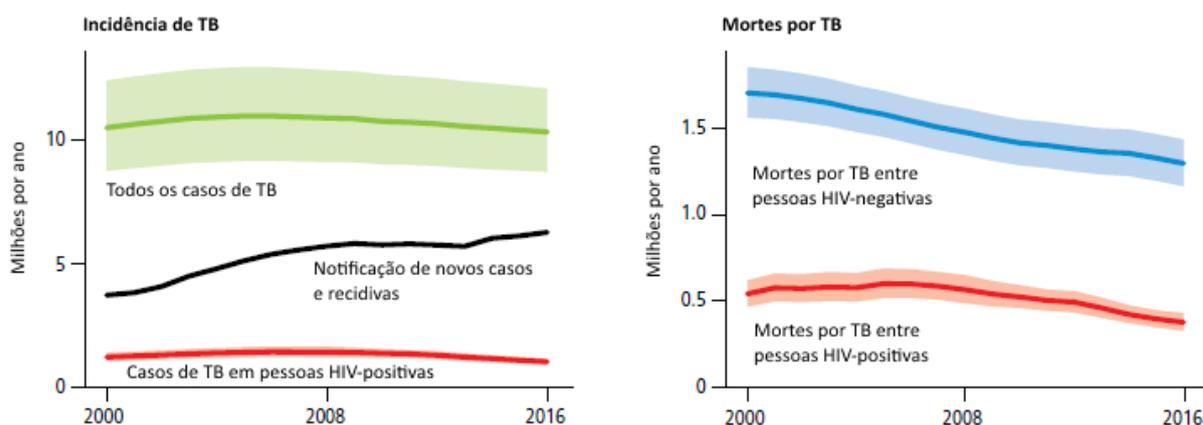
1.6 Mecanismos de resistência à isoniazida

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Dados epidemiológicos da tuberculose no mundo e no Brasil

Apesar do número de mortes e da taxa de incidência da doença estarem diminuindo globalmente [1,2] (**Figura 1**), a epidemia da **tuberculose (TB)** ainda é um fato alarmante. De acordo com o levantamento da Organização Mundial da Saúde (**OMS**), no ano de 2016, estima-se que ocorreram 6,3 milhões de novos casos (incidência) e 1,3 milhões de mortes (mortalidade) por TB em todo o mundo [2]. Sendo assim, a TB esteve na nona posição entre as 10 maiores causas de mortes globais em 2015 (**Figura 2**), e é considerada a maior causadora de óbitos entre as doenças infecciosas [2]. A distribuição dos novos casos de TB é heterogênea e concentra-se principalmente em seis países: Índia, Indonésia, China, Nigéria, Paquistão e África do Sul [2,3]. Além de ser responsável por boa parte dos novos casos, a Índia também reúne mais de um quarto do número de mortes e de casos de TB mundialmente [2].

Figura 1. Estimativas das taxas de incidência e mortalidade da TB no mundo.



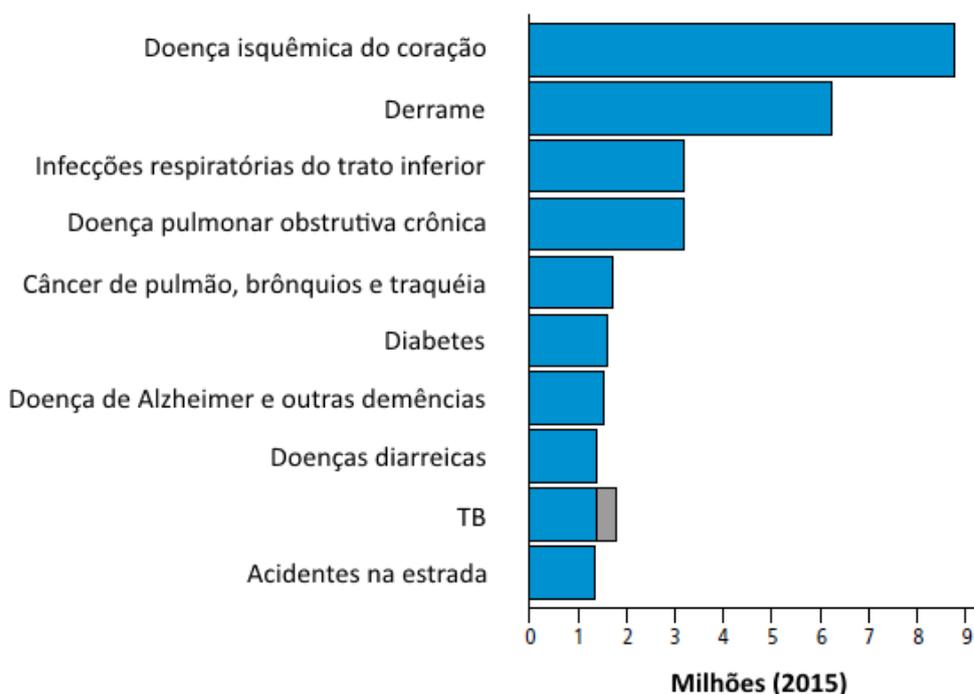
Fonte: adaptado de [2].

Nota: globalmente, as taxas de mortalidade e de incidência da TB estão caindo 3 e 2%, respectivamente.

Outro dado bastante preocupante está relacionado à prevalência da **TB latente (LTBI**, do inglês *latent TB infection*) na população. Estima-se que dois bilhões de pessoas estão

infectadas pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, considerada o principal agente etiológico da TB, porém não apresentam sintomas clínicos detectáveis da doença e não a transmitem para outros indivíduos [4]. Somente de 5 a 15% destes casos de LTBI progridem para a forma **ativa** da doença, na qual há sinais clínicos e transmissão do bacilo entre os indivíduos. Contudo, a LTBI representa um reservatório em potencial da doença, uma vez que a bactéria permanece viável dentro do hospedeiro em um estado não-replicativo, mas que pode voltar a se reproduzir em condições favoráveis de crescimento [4]. Até o presente momento, não é possível prever quais pessoas com LTBI irão progredir para a forma ativa da doença [4]. Portanto, quando há detecção de um indivíduo nesta situação, a OMS recomenda que se dê início à terapia preventiva, com a administração de **isoniazida (INH)** por um período de 6 a 9 meses [3].

Figura 2. Principais causas de mortes no mundo em 2015.



Fonte: adaptado de [2].

Nota: em cinza estão indicadas as mortes causadas por TB entre pessoas HIV-positivas. De acordo com a Classificação Internacional de Doenças, óbitos resultantes de TB entre pessoas HIV-positivas são oficialmente classificadas como mortes causadas por HIV/AIDS.

Um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da TB ativa é a infecção concomitante com o **vírus da imunodeficiência humana (HIV)**. Estima-se que, em 2016, 10%

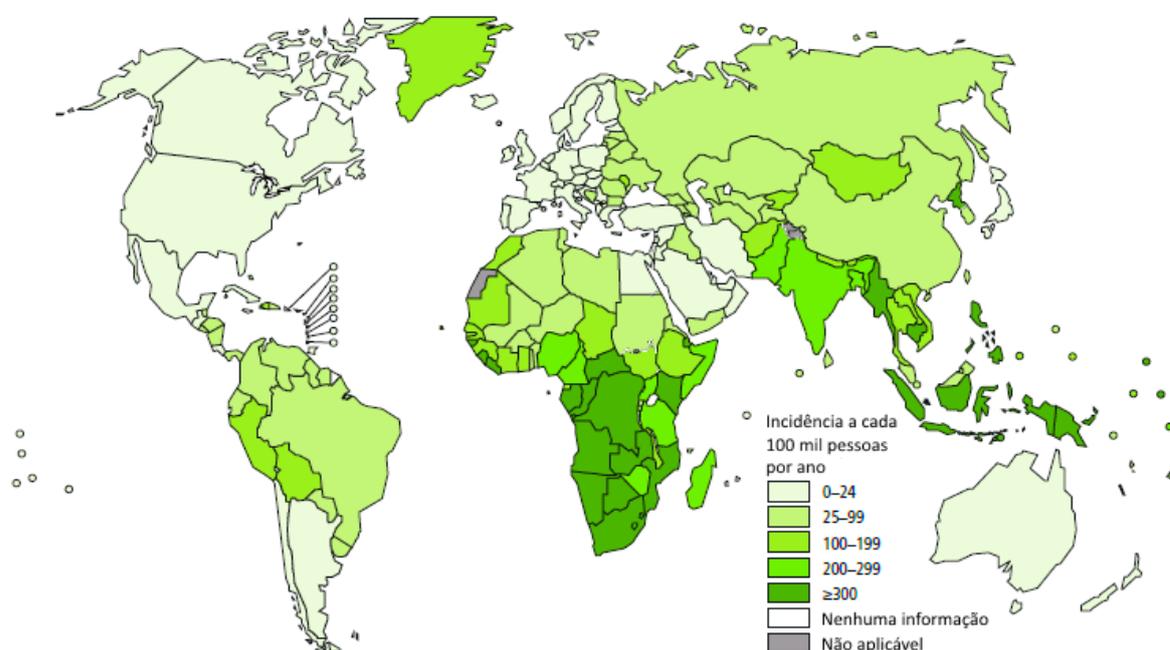
dos casos incidentes e 374 mil mortes por TB ocorreram entre pacientes HIV-positivos [2,3]. Em princípio, o favorecimento desta coinfeção deve-se ao efeito negativo que a replicação ativa do vírus exerce sobre a resposta imunológica do hospedeiro, o que dificulta, por exemplo, a formação do granuloma necessário para conter, e em alguns casos até erradicar, a infecção pelo *M. tuberculosis* [5,6]. Outros determinantes sociais e comportamentais também podem contribuir para o desenvolvimento da doença, como, por exemplo, a desnutrição da população, a poluição do ar, o diabetes mellitus tipo 2, o uso excessivo de álcool e o tabagismo [3].

Outro dado alarmante vem do surgimento de cepas de *M. tuberculosis* que são resistentes aos principais fármacos utilizados na terapia. Em 2016, estima-se que ocorreram 490 mil novas infecções por **cepas multirresistentes (MDR-TB)**, definidas como resistentes à rifampicina e à isoniazida) e 110 mil por cepas **RR-TB** (resistentes apenas à rifampicina) [2]. A distribuição geográfica destas cepas resistentes também é bastante heterogênea. Na África Subsaariana, na Europa Ocidental e na América do Norte, por exemplo, a prevalência de MDR-TB é consideravelmente baixa (aproximadamente 1% dos casos), enquanto que na região da antiga União Soviética este valor eleva-se para >20% [3]. Além disso, casos de **TB extensivamente resistente** a drogas (**XDR-TB**, definidos como cepas MDR resistentes também a pelo menos uma fluoroquinolona e um agente injetável de segunda linha) já foram reportados em 117 membros da OMS, o que dificulta ainda mais as tentativas de erradicação da doença [2]. Acredita-se que a expansão da TB-resistente deva-se principalmente à transmissão entre indivíduos de cepas previamente resistentes, e não à aquisição *de novo* de resistência ao longo de um tratamento [3,7]. Diante disso, torna-se essencial não somente desenvolver novas terapias anti-tuberculose (**anti-TB**), mas também estabelecer estratégias de prevenção efetivas para controlar a transmissão de cepas resistentes dentro de uma população.

A situação da TB no Brasil ainda é bastante preocupante, apesar dos últimos dados de mortalidade também indicarem uma tendência de redução. Estima-se que 87 mil brasileiros contraíram a doença em 2016, colocando o Brasil na lista dos 20 países com o maior número de casos incidentes no mundo [2] (**Figura 3**). Além disso, os dados deste mesmo ano indicaram que a TB matou em torno de 5,4 mil pessoas no país, sendo que destas 1,9 mil eram HIV-positivas [2]. A TB está distribuída por todo o país, porém 13 capitais apresentam taxas de mortalidade acima da média (>2,5 mortes por 100 mil habitantes):

Manaus e Belém (região Norte), Recife, Maceió, São Luís, Salvador e Teresina (região Nordeste), Cuiabá (região Sudoeste), Rio de Janeiro (região Sudeste) e Porto Alegre (região Sul) [8]. Alguns fatores estão associados a esta elevada taxa de mortalidade nestas regiões, como, por exemplo, maior desigualdade de renda, maiores taxas de migração, maior proporção de indivíduos pobres e também maiores coeficientes de coinfeção HIV/TB [8].

Figura 3. Estimativa da taxa de incidência da TB no Brasil e no mundo.



Fonte: adaptado de [2].

Nota: o Brasil encontra-se na faixa de 25-99 casos a cada 100 mil habitantes.

Porto Alegre é considerada uma das capitais com o maior número de novos casos de TB no Brasil. No ano de 2014 foram notificados 1.368 casos da doença na capital gaúcha (92,9 casos por 100 mil habitantes) e 65 óbitos (4,4 casos por 100 mil habitantes) [9]. Além de apresentar uma alta prevalência de TB na população, a cidade também conta com uma alta prevalência de portadores de HIV: em torno de 27% dos indivíduos com TB são HIV-positivos [9,10]. Sabe-se que um dos determinantes sociais associados à alta incidência de TB numa dada região é o baixo nível de educação da população. Paradoxalmente, a capital gaúcha apresenta um nível bastante baixo de analfabetismo (2,27%), e, portanto, outros fatores, além da alta incidência de HIV na população, devem estar associados ao aumento da

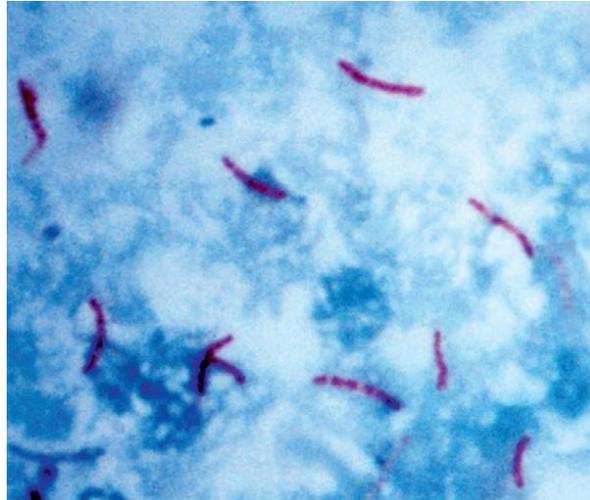
incidência desta doença no município, como, por exemplo, a deficiência e a desorganização do sistema público de saúde [10].

Diante deste cenário alarmante da TB no mundo e no Brasil, torna-se evidente a necessidade de se manter os estudos sobre a doença, tanto para compreender a biologia básica do bacilo, quanto para se desenvolver novos compostos anti-TB e novas ferramentas de diagnóstico. Boa parte dos avanços no combate à TB teve origem nas pesquisas básicas sobre a biologia do *M. tuberculosis*, e, portanto, torna-se essencial conhecer as características celulares e também o ciclo de vida deste organismo.

1.2 A microbiologia do *M. tuberculosis*

O *M. tuberculosis* foi primeiramente identificado pelo cientista alemão Robert Koch em março de 1882 [11]. Esta micobactéria pertence a um complexo de organismos também denominado de *M. tuberculosis* (**MTBC**), no qual estão contidas outras sete espécies e subespécies de micobactérias que causam doença em humanos ou em outros animais, como o *M. africanum* subtipo 1 (clado 1 e 2 - humanos), *M. pinnipedii* (mamíferos marinhos), *M. bovis* subsp. *caprae* comb. nov. (cabras), *M. bovis* (bovinos), *M. microti* (roedores) e *M. canetti* (desconhecido) [11,12]. O *M. tuberculosis* é uma bactéria patogênica humana que se apresenta na forma de bacilos, com um diâmetro entre 0,3 e 0,5 μm (**Figura 4**). Por apresentarem uma parede celular bastante impermeável, as micobactérias não podem ser identificadas pela técnica de coloração de Gram, e desta forma não são classificadas nem como organismos Gram-positivos, nem como Gram-negativos, e sim como bactérias álcool-ácido resistentes pela técnica de Ziehl-Neelsen [11]. Apesar de sobreviver em microambientes hipóxicos dentro do hospedeiro, o *M. tuberculosis* é considerado um organismo aeróbico, que se reproduz mais eficientemente em tecidos ricos em oxigênio, como, por exemplo, nos pulmões [11]. Em relação ao seu tempo de geração, ele é considerado uma micobactéria de crescimento lento, pois leva em torno de 15 a 20 horas para se dividir, enquanto que outras espécies do gênero, como o *M. smegmatis*, são consideradas micobactérias de crescimento rápido, uma vez que levam em média de 2 a 3 horas para se reproduzirem [13]. Outras características celulares desta micobactéria incluem a ausência de uma cápsula externa e a incapacidade de locomoção e de formação de esporos [11].

Figura 4. Coloração do *M. tuberculosis* pela técnica de Ziehl-Neelsen.

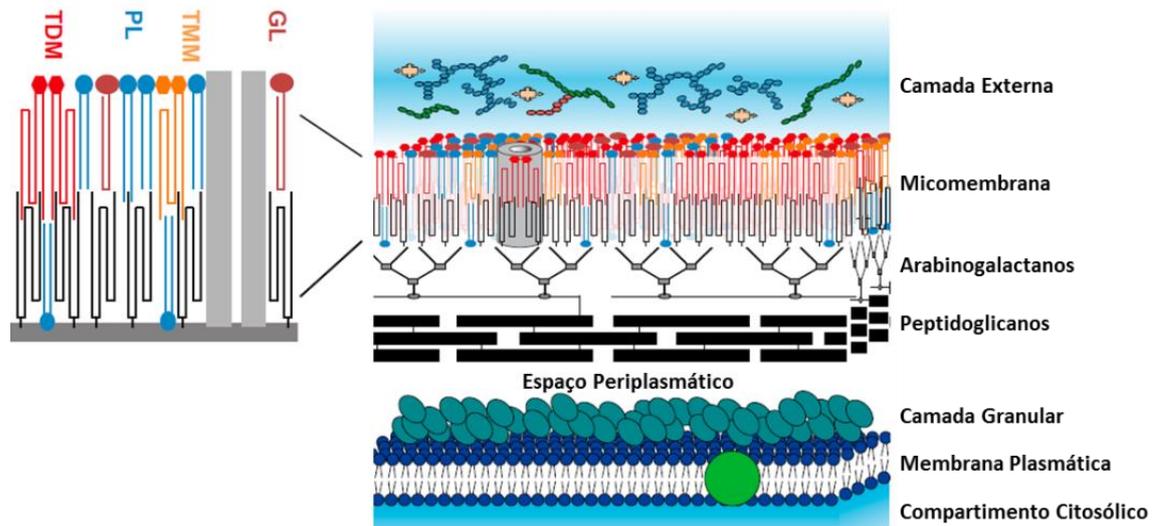


Fonte: Retirado de [11].

Nota: os bacilos foram isolados do escarro de um paciente com tuberculose. Aumento de 1000x.

Uma das principais características do *M. tuberculosis* é a sua complexa parede celular, rica em lipídios e estruturalmente semelhante às paredes celulares de organismos Gram-positivos (**Figura 5**) [11]. Entretanto, algumas características desta estrutura, como, por exemplo, a incapacidade de reter a coloração de Gram, a presença de porinas na camada lipídica externa (semelhante às membranas externas das bactérias Gram-negativas) e a presença de um espaço periplasmático entre a membrana interna e a camada de peptidoglicanos, fazem com que a parede celular do *M. tuberculosis* também apresente semelhanças com aquela observada em organismos Gram-negativos [14].

Figura 5. Representação gráfica da complexa parede celular micobacteriana.



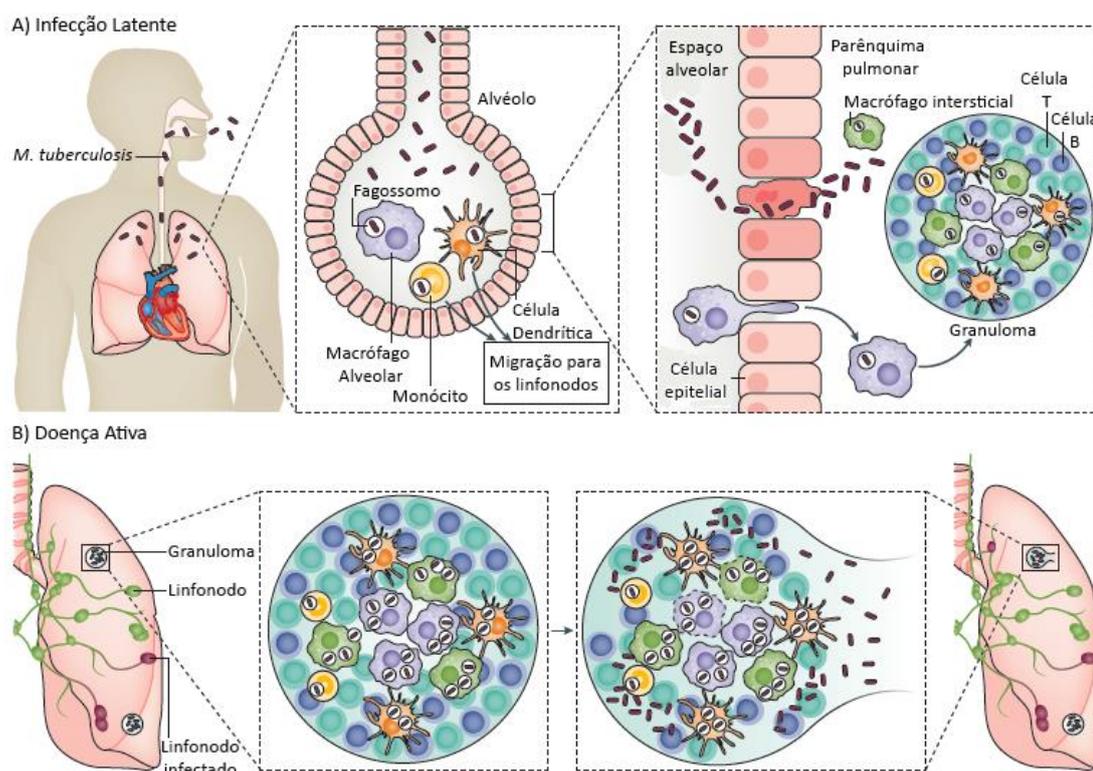
Fonte: Adaptado de [15,16].

Nota: A **camada externa** da parede celular micobacteriana é formada principalmente por polissacarídeos (ex.: glucanos) e proteínas, e possui poucos lipídios em sua composição. A **micomembrana** atua como uma barreira bastante impermeável devido ao seu alto conteúdo lipídico e é formada por duas porções: uma mais externa, composta por glicolipídios, como a trealose monomicolato (**TMM** - laranja), a trealose dimicolato (**TDM** - vermelho), e os fosfolipídios (**PL** – azul escuro); e outra mais interna, formada pelos **ácidos micólicos** (cinza escuro), que podem estar ancorados aos **arabinogalactanos** [15,16]. Na micomembrana também estão presentes proteínas **porinas** (cinza claro), que permitem a passagem de moléculas hidrofílicas pela micomembrana [14]. A camada de **peptidoglicanos** (10 a 15 nm) está covalentemente ligada aos arabinogalactanos e tem como funções manter o formato e proteger a célula da pressão de turgor osmótica [14]. A **camada granular** é rica em proteínas e localiza-se logo acima da **membrana plasmática**.

O ciclo de vida do *M. tuberculosis* depende do seu hospedeiro humano para ser completado. Um indivíduo infectado e com a doença ativa transmite a micobactéria pelos aerossóis, que são expelidos pelas vias aéreas principalmente ao tossir, e estima-se que ele possa infectar até 10 pessoas ao ano [3,17]. Somente de 5 a 15% das pessoas contaminadas pelo bacilo irão desenvolver a doença na sua forma ativa que, se não tratada corretamente, é fatal na metade das ocorrências [3,18]. A exposição ao *M. tuberculosis* pode resultar em dois eventos possíveis: a completa eliminação do patógeno pelo sistema imunológico do hospedeiro, tanto pela resposta imune inata quanto pela resposta adaptativa, ou a persistência do bacilo no corpo em um estado latente, em que não há sintomas da doença ou danos ao tecido pulmonar (**Figura 6**) [3,11]. Estima-se que uma a cada três pessoas no

mundo carreguem o bacilo na sua forma latente, o que representa um impressionante reservatório em potencial da doença [11,19].

Figura 6. Modo de infecção pelo *M. tuberculosis* e desenvolvimento da doença.



Fonte: Adaptado de [3].

Nota: A) O *M. tuberculosis* entra no hospedeiro humano pelas vias aéreas, onde encontra os macrófagos, os monócitos e as células dendríticas nos alvéolos pulmonares. Caso não haja eliminação do bacilo, o mesmo entra no parênquima pulmonar por meio da migração do macrófago infectado, o qual irá desencadear uma resposta inflamatória no tecido pelo recrutamento de outros macrófagos. A migração de células dendríticas e de monócitos infectados para os linfonodos recruta linfócitos T e B para o local da infecção, os quais em conjunto com os macrófagos irão formar uma estrutura bem característica da doença chamada de **granuloma**. **B)** Nos casos em que o sistema imunológico do hospedeiro não consegue conter a infecção, a carga bacteriana se torna bastante elevada, dificultando assim a ação do granuloma em conter a disseminação da bactéria pelo tecido e para outras partes do corpo, incluindo o cérebro. Neste estágio da doença, há lesões no tecido pulmonar e o indivíduo pode apresentar alguns sintomas, como a tosse seca, a febre e o emagrecimento. Com o rompimento do granuloma, a bactéria então consegue alcançar novamente o trato respiratório e é expelida durante a tosse, podendo assim contaminar outros indivíduos sadios [3].

Diante dos fatos apresentados, é visível que a TB é uma doença bastante complexa e que requer estratégias elaboradas para ser controlada. Os próximos tópicos abordarão as

formas de tratamento já disponíveis para a TB, as suas fraquezas e limitações e os desafios para se desenvolver novos candidatos a fármacos anti-TB.

1.3 Desenvolvimento de novos candidatos a fármacos anti-TB

A TB humana é uma doença curável e sabe-se que a maioria dos pacientes com TB ativa, que seguem o tratamento corretamente, consegue livrar-se do patógeno. O tratamento atual para a TB não resistente, preconizado pela OMS, consiste na administração diária de quatro fármacos de primeira linha combinados, sendo eles a **isoniazida (INH)**, a **rifampicina (RIF)**, o **etambutol (EMB)**, e a **pirazinamida (PZN)** (Tabela 1 e Figura 7), por dois meses (chamada de fase intensiva do tratamento), seguido por quatro meses de administração diária de INH e RIF (conhecida como fase de continuação) [2,3,20]. A eficiência do tratamento é monitorada pelo médico por meio de exames frequentes de raios-X do tórax, baciloscopia e cultura [3]. Entretanto, apesar de ser tratável, diversos fatores contribuem para a TB ainda permanecer bastante prevalente na população, como, por exemplo, o longo regime de tratamento, uma vez que o mesmo requer a administração diária de medicamentos durante seis meses [11]. O alívio rápido dos sintomas e a melhora no quadro clínico podem fazer com que o paciente não siga corretamente o tratamento ou, até mesmo, o abandone precocemente. A INH, por exemplo, é reconhecida por ter uma potente atividade bactericida precoce sobre as bactérias metabolicamente ativas, sendo capaz de reduzir de 1 a 1,5 \log_{10} as **unidades formadoras de colônias** (do inglês *colony-forming units* - **CFU**) em apenas cinco dias de terapia [19]. Entretanto, a eliminação das bactérias não-replicativas, também chamadas de **persistentes** (do inglês, *persisters*), só é atingida no final dos seis meses de tratamento e com a ação combinada dos outros três fármacos anti-TB [19]. Portanto, o abandono precoce do tratamento pode levar à incompleta eliminação do bacilo no corpo do hospedeiro, à reativação da doença e também ao favorecimento do advento de cepas com resistência aos fármacos [11,19]. Outros fatores também dificultam o sucesso do tratamento, como a intolerância e a toxicidade de alguns medicamentos, incluindo a própria INH, e a interação medicamentosa com os antirretrovirais em pacientes HIV-positivos [19,21].

Tabela 1. Principais fármacos utilizados no tratamento da TB e seus efeitos sobre a micobactéria.

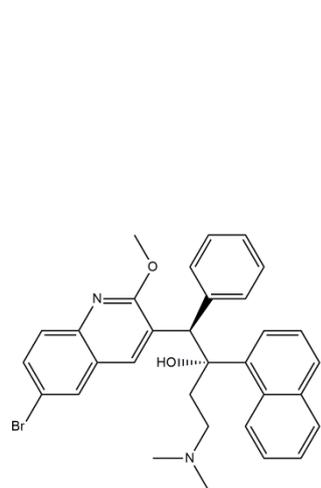
	Fármacos (ano da descoberta)	Alvo	Efeito
Fármacos de primeira linha	Isoniazida (1952)	Enoil-[ACP] redutase (InhA)	Inibe a síntese dos ácidos micólicos
	Rifampicina (1963)	RNA polimerase	Inibe a transcrição
	Pirazinamida (1954)	Subunidade 30S ribossomal	Inibe a tradução e acidifica o citoplasma
	Etambutol (1961)	Arabinosil transferases	Inibe a biossíntese de arabinogalactanos
Fármacos de segunda linha	Ácido <i>para</i> -amino salicílico (1948)	Dihidropteroato sintase	Inibe a biossíntese do folato
	Estreptomicina (1944)	Subunidade 30S ribossomal	Inibe a síntese de proteínas
	Etionamida (1961)	Enoil-[ACP] redutase (InhA)	Inibe a síntese dos ácidos micólicos
	Ofloxacino (1980)	DNA girase e DNA topoisomerase	Inibe o “superenrolamento” do DNA
	Capreomicina (1963)	Subunidades 30S e 50S ribossomais	Inibe a síntese de proteínas
	Canamicina (1957)	Subunidade 30S ribossomal	Inibe a síntese de proteínas
	Amicacina (1972)	Subunidade 30S ribossomal	Inibe a síntese de proteínas
	Cicloserina (1955)	D-alanina racemase e ligase	Inibe a síntese de peptidoglicanos

Fonte: Adaptado de [19].

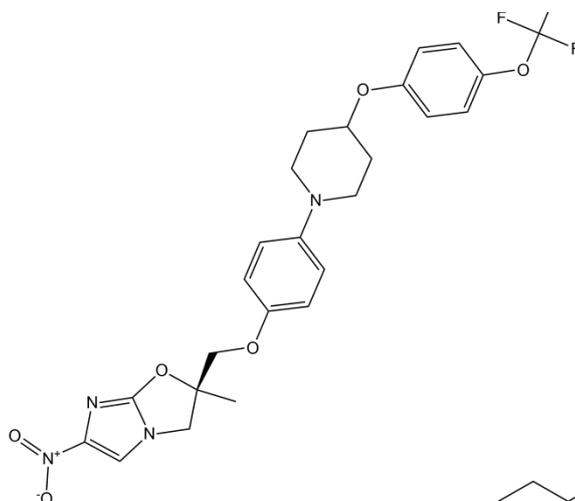
Os esforços atuais dos diferentes grupos de pesquisa em TB no mundo concentram-se principalmente na busca de novas opções terapêuticas para o tratamento da TB resistente, uma vez que a taxa de cura para a TB sensível aos fármacos é considerada bastante elevada. Estima-se que o sucesso nos tratamentos das MDR/RR-TB e XDR-TB sejam alcançados em apenas 52 e 28% dos casos, respectivamente [2]. Isso porque o tratamento da TB resistente requer ainda mais tempo para ser completado (até dois anos) e faz uso de medicamentos de segunda linha (**Tabela 1**) que podem apresentar maior toxicidade e menor eficácia, além de requererem vias de administração alternativas em alguns casos, como os aminoglicosídeos (canamicina, amicacina, estreptomicina) e as fluoroquinolonas injetáveis (gatifloxacino, ofloxacino) [19,21].

Para se desenvolver um composto anti-TB, certas propriedades são idealizadas. O novo candidato deve apresentar um perfil toxicológico favorável; ser mais potente que os fármacos atuais (ex.: rápida atividade bactericida), com o intuito de encurtar o tratamento; agir sobre novos alvos e rotas metabólicas, para que seja possível contornar os mecanismos de resistência já apresentados pela bactéria frente aos medicamentos vigentes; apresentar compatibilidade com os antirretrovirais; não prejudicar a ação dos outros fármacos anti-TB, uma vez que o tratamento é feito pela combinação entre diferentes compostos; e, preferencialmente, ser capaz de eliminar a bactéria nos seus diferentes estados fisiológicos, ou seja, tanto as micobactérias metabolicamente ativas, quanto àquelas que se encontram em estado não-replicativo [19,21,22]. Outras propriedades importantes do novo candidato são o baixo custo de produção, uma vez que boa parte dos casos de TB encontra-se em regiões pouco desenvolvidas; a alta estabilidade química; e a baixa taxa de seleção de mutantes espontâneos [21]. Entretanto, após décadas de pesquisa na área, apenas recentemente dois fármacos foram aprovados para uso clínico contra a TB, a bedaquilina e a delamanida (**Figura 7**), o que evidencia a grande dificuldade em se encontrar novos compostos [23–25].

Figura 7. Fórmula estrutural de diferentes compostos com ação antimicrobacteriana.



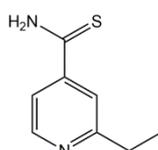
Bedaquilina (TMC207)
 (1R,2S)-1-(6-bromo-2-methoxyquinolin-3-yl)-4-(dimethylamino)-2-naphthalen-1-yl-1-phenylbutan-2-ol
 MW = 555,516 g/mol



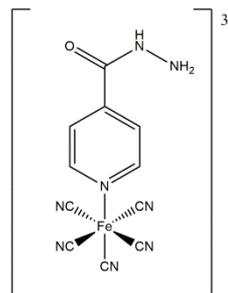
Delamanida
 (2R)-2-methyl-6-nitro-2-[[4-[4-(trifluoromethoxy)phenoxy]piperidin-1-yl]phenoxy]methyl]-3H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazole
 MW = 534,492 g/mol



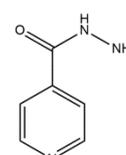
Etambutol (EMB)
 (2S)-2-[2-[[[(2S)-1-hydroxybutan-2-yl]amino]ethylamino]butan-1-ol]
 MW = 204,314 g/mol



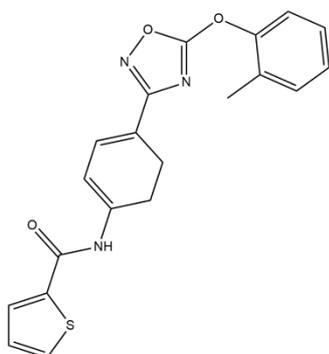
Etionamida (ETH)
 2-ethylpyridine-4-carbothioamide
 MW = 166,242 g/mol



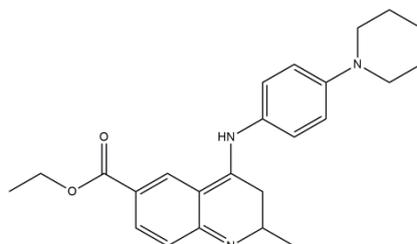
IQG-607
 pentacyano(isoniazid)ferrate(II)
 MW = 323,07 g/mol



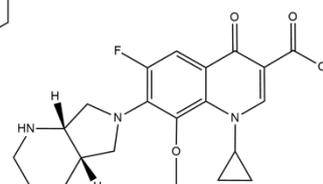
Isoniazida (INH)
 pyridine-4-carbohydrazide
 MW = 137,142 g/mol



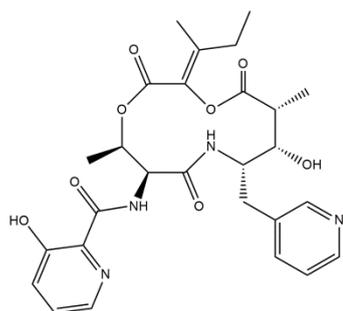
Labio-16
 N-(4-[5-[(2-methylphenoxy)methyl]-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenyl)thiophene-2-carboxamide
 MW = 391,445 g/mol



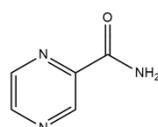
Labio-17
 ethyl 2-methyl-4-[[4-(piperidin-1-yl)phenyl]amino]quinoline-6-carboxylate
 MW = 389,499 g/mol



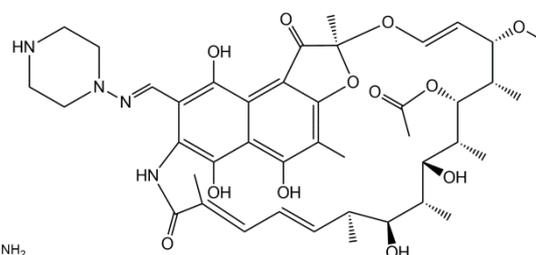
Moxifloxacino (MXF)
 7-[[4aS,7aS)-1,2,3,4,4a,5,7,7a-octahydropyrrolo[3,4-b]pyridin-6-yl]-1-cyclopropyl-6-fluoro-8-methoxy-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid
 MW = 401,438 g/mol

**Piridomicina (PYR)**

N-[(2Z,5R,6S,9S,10S,11R)-2-butan-2-ylidene-10-hydroxy-5,11-dimethyl-3,7,12-trioxo-9-(pyridin-3-ylmethyl)-1,4-dioxo-8-azacyclododec-6-yl]-3-hydroxypyridine-2-carboxamide
MW = 540,573 g/mol

**Pirazinamida (PZN)**

pyrazine-2-carboxamide
MW = 123,115 g/mol

**Rifampicina (RIF)**

3-(((4-Methyl-1-piperazinyl)imino)methyl)rifamycin SV
MW = 822,953 g/mol

Fonte: próprio autor. A figura foi elaborada no software ChemDraw PRO (12.0).

Nota: nesta figura está mostrada a fórmula estrutural, o nome químico, a nomenclatura de acordo com a IUPAC (quando disponível) e o peso molecular (do inglês, *molecular weight* - MW).

A descoberta e o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos anti-TB têm seguido dois caminhos possíveis: a **via baseada no alvo** (do inglês *target-to-drug* ou *target-based*) e a **abordagem fenotípica** (do inglês *drug-to-target* ou *phenotypic approach*) [23,26,27]. A via baseada no alvo ganhou força com o surgimento das tecnologias de sequenciamento de genomas e consiste na seleção de um alvo (tipicamente um gene/proteína) que apresente preferencialmente três propriedades: **(1)** ser essencial para o crescimento e/ou sobrevivência da bactéria nas condições de infecção, ou seja, caso este alvo venha a ter sua atividade inibida por algum composto, a bactéria não será mais viável dentro do hospedeiro; **(2)** ser seletivo, ou seja, que não seja suficientemente similar a nenhuma proteína do próprio hospedeiro, a ponto de um composto reconhecer e inibir ambas as proteínas (tanto da micobactéria, quanto do hospedeiro); e **(3)** ser vulnerável, no sentido de que a inibição parcial desse alvo por algum composto seja suficiente para causar a morte da micobactéria [23,28].

A identificação do alvo geralmente inicia pela avaliação da essencialidade e vulnerabilidade de algum gene pelas técnicas de nocaute gênico (troca alélica mediada por plasmídeos [29] ou *recombineering* [30]) ou, mais recentemente, por *knockdown* condicional [31,32]; seguidos pelas análises bioquímicas (expressão heteróloga do alvo, ensaios cinéticos

e de inibição enzimática, cristalografia de raios-X); e, finalmente, pelos testes de atividade frente à bactéria daqueles inibidores que tiveram boa ação *in vitro* frente ao alvo [23]. Entretanto, as pesquisas que vêm aplicando esta abordagem têm se deparado com diversas barreiras para alcançar o novo candidato a fármaco, como, por exemplo, a penetração do fármaco no granuloma e na micobactéria, o metabolismo dentro do hospedeiro, a estabilidade química e a biodisponibilidade, que na maior parte das vezes não são superadas [23,26]. Isto porque o caminho de um fármaco anti-TB envolve sucessivos obstáculos, como **(1)** a absorção e o transporte pela corrente sanguínea até a lesão pulmonar, **(2)** a penetração no granuloma necrótico caseoso e no envelope celular bastante impermeável da micobactéria, e **(3)** o reconhecimento e inibição do alvo em concentração e tempo adequados (**Figura 8**) [33], que são variáveis que a abordagem *target-to-drug* ainda não consegue prever e enfrentar.

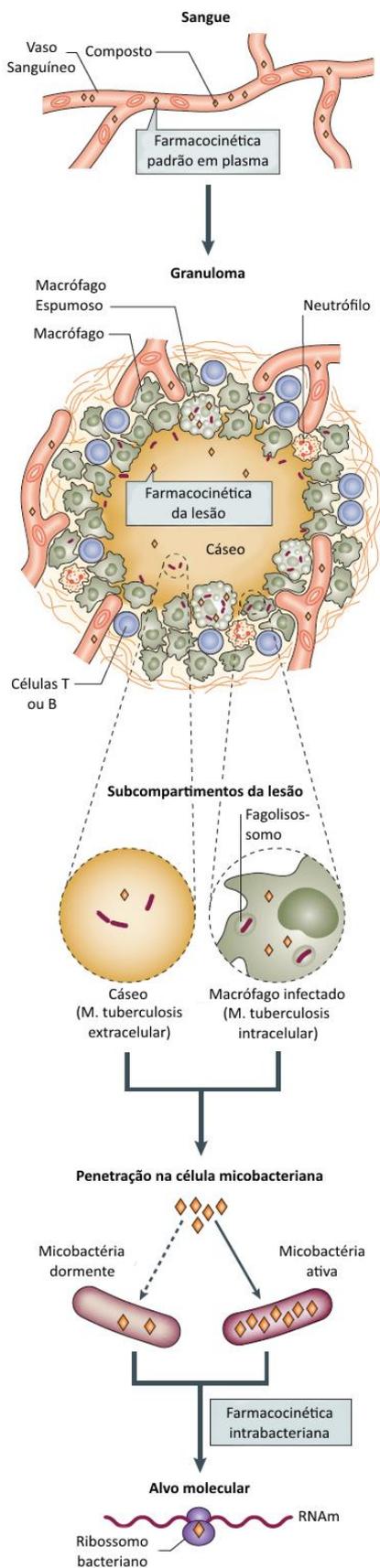
Por outro lado, a abordagem fenotípica rendeu todos os diferentes compostos anti-TB em uso clínico e vem apresentando novos candidatos para testes clínicos nos últimos anos [26]. Este caminho envolve três etapas principais: **(1)** a síntese de novos compostos ou a busca e purificação de compostos naturais; **(2)** o teste dos compostos frente às células micobacterianas, preferencialmente mimetizando o local de infecção (ex.: modelos de infecção de TB em macrófagos ou em camundongos); e **(3)** a descoberta, validação do(s) alvo(s) daqueles compostos bioativos, pela seleção de mutantes espontâneos, seguida pelo sequenciamento completo do genoma, e a elucidação do **mecanismo de ação (MOA** - do inglês *mechanism of action*) [23].

A vantagem desta abordagem é que ela permite selecionar os compostos que são capazes de ultrapassar todas as barreiras existentes até o local da infecção (nos casos dos compostos que apresentam atividade promissora em testes pré-clínicos), o que inclui as células do hospedeiro e o envelope celular micobacteriano [23,26]. Entretanto, determinar o alvo e o MOA de um composto bioativo também pode ser bastante desafiador, uma vez que muitos compostos se comportam como pró-fármacos, que precisam sofrer uma metabolização dentro da célula pela ação de enzimas (ativadores) da própria micobactéria, como é caso da INH, da PZN e da **etionamida (ETH)** [23]. A seleção de mutantes espontâneos para pró-fármacos geralmente resulta no isolamento de colônias com mutações nos genes ativadores (ex.: *katG* [34], *ethA* [35], *pncA* [36]), e não nos genes-alvo. Isso porque os genes ativadores geralmente não são essenciais para a sobrevivência da micobactéria e, portanto,

podem acomodar um espectro maior de mutações não letais quando comparados aos genes-alvo, que, via de regra, são essenciais [23]. Além disso, tem sido difícil encontrar compostos com novos alvos ou MOA por meio da abordagem fenotípica, o que indica que a variabilidade de estruturas químicas, disponíveis atualmente nas bibliotecas de compostos, é limitada [23].

Até o momento, somente a abordagem fenotípica tem se mostrado eficaz no desenvolvimento de fármacos anti-TB. No entanto, o planejamento racional de fármacos pela abordagem baseada no alvo ainda é bastante recente na história da busca por medicamentos anti-TB e pode vir a fornecer novas moléculas, à medida que o conhecimento sobre a biologia do *M. tuberculosis*, sobretudo a permeabilidade do envelope micobacteriano e os genes envolvidos na virulência, avança. Além disso, a abordagem *target-to-drug* permitiu o avanço de diversas técnicas na área de química medicinal, que visam ao aperfeiçoamento da atividade, ao aumento da seletividade, e à redução dos efeitos colaterais no hospedeiro de diferentes compostos químicos, e que estão sendo bastante empregadas para a otimização de compostos que foram previamente selecionados pela abordagem fenotípica [27].

Figura 8. Um composto anti-TB deve percorrer um difícil caminho até encontrar o seu alvo.



Fonte: Adaptado de [33].

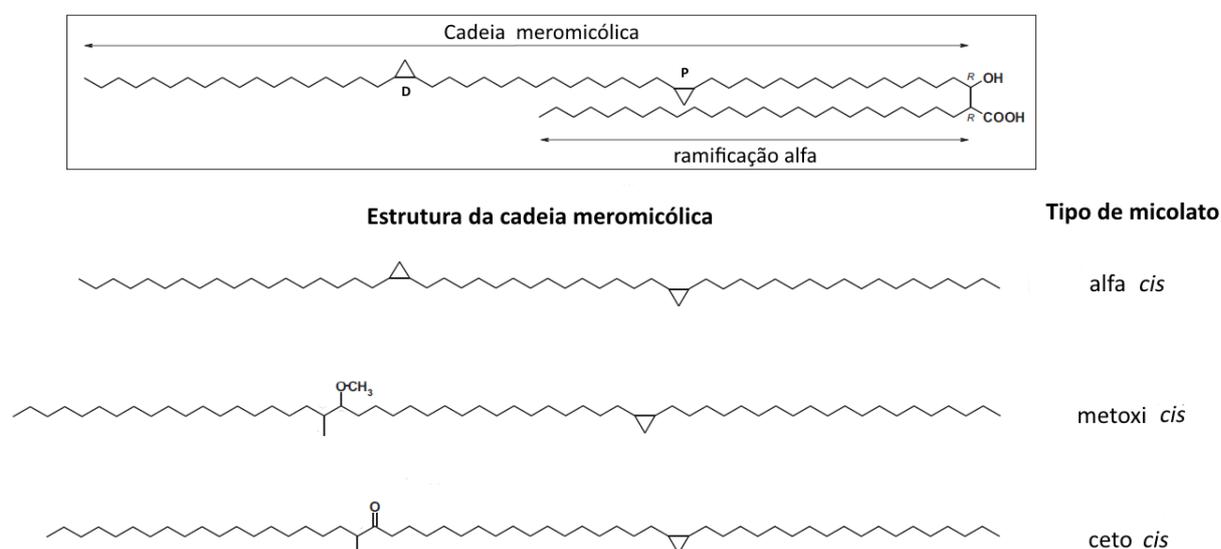
Os compostos que foram estudados neste trabalho, e que serão abordados com maiores detalhes mais adiante, foram todos selecionados a partir da via baseada no alvo. O gene-alvo em questão, denominado *inhA*, codifica para uma proteína envolvida na biossíntese do envelope celular micobacteriano e que é essencial para a sua sobrevivência.

1.4 A enzima *InhA*: um importante alvo validado para fármacos anti-TB

O gene *inhA* (*Rv1484*) de *M. tuberculosis* é constituído de 810 pb (pares de base) e codifica para uma proteína denominada **trans-2-enoil-ACP redutase dependente de NADH** (do inglês *NADH-dependent trans-2-enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase*, ou **InhA**) que é um alvo vulnerável já conhecido e extensivamente validado de alguns compostos com atividade anti-TB [15,37], como a INH [38], a ETH [39], o **triclosan (TCR)** [40] e a **piridomicina (PYR)** [41]. De acordo com a base de dados do Tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch>), a enzima tem uma massa molecular de 28.527 Da, é composta por 269 aminoácidos e tem um ponto isoelétrico de 6,1. Esta proteína atua na rota essencial de **biossíntese dos ácidos micólicos (Figura 9)** - ácidos graxos α -alquila, β -hidro ramificados de cadeia longa, que estão presentes no envelope celular de todas as espécies micobacterianas já estudadas até o momento -, onde catalisa a redução de uma ligação dupla de um intermediário *trans*-2-enoil-ACP, através da transferência de um hidreto proveniente do cofator NADH [15,42,43]. Os ácidos micólicos podem apresentar estruturas ligeiramente diferentes em cada espécie micobacteriana; o *M. tuberculosis*, por exemplo, apresenta três classes principais de ácidos micólicos - α -micólicos, ceto-micólicos e metoxi-micólicos - que se diferenciam entre si pelo tipo de micolato presente na cadeia meromicólica (**Figura 9**) [42].

A biossíntese dos ácidos micólicos ocorre a partir de duas sintases de ácidos graxos (do inglês *fatty acid synthases* - **FASs**) (**Figura 10**), que se diferenciam pela organização molecular, pelos substratos utilizados e pelas especificidades dos carreadores [15]. A proteína multifuncional micobacteriana **FAS-I** (codificada pelo gene *fasI*, *Rv2524c*) apresenta sete domínios distintos, cada um exercendo uma determinada atividade catalítica do ciclo de síntese, e é responsável por formar *de novo* os ácidos graxos com cadeias curtas de carbono de C₁₆-C₁₈ e C₂₄-C₂₈ [15,42].

Figura 9. Estrutura química dos ácidos micólicos encontrados no *M. tuberculosis*.



Fonte: Adaptado de [15].

Nota: em destaque está representada a estrutura genérica de um ácido micólico. P e D indicam as posições proximais e distais, respectivamente, onde são encontrados diferentes motivos na cadeia meromericólica.

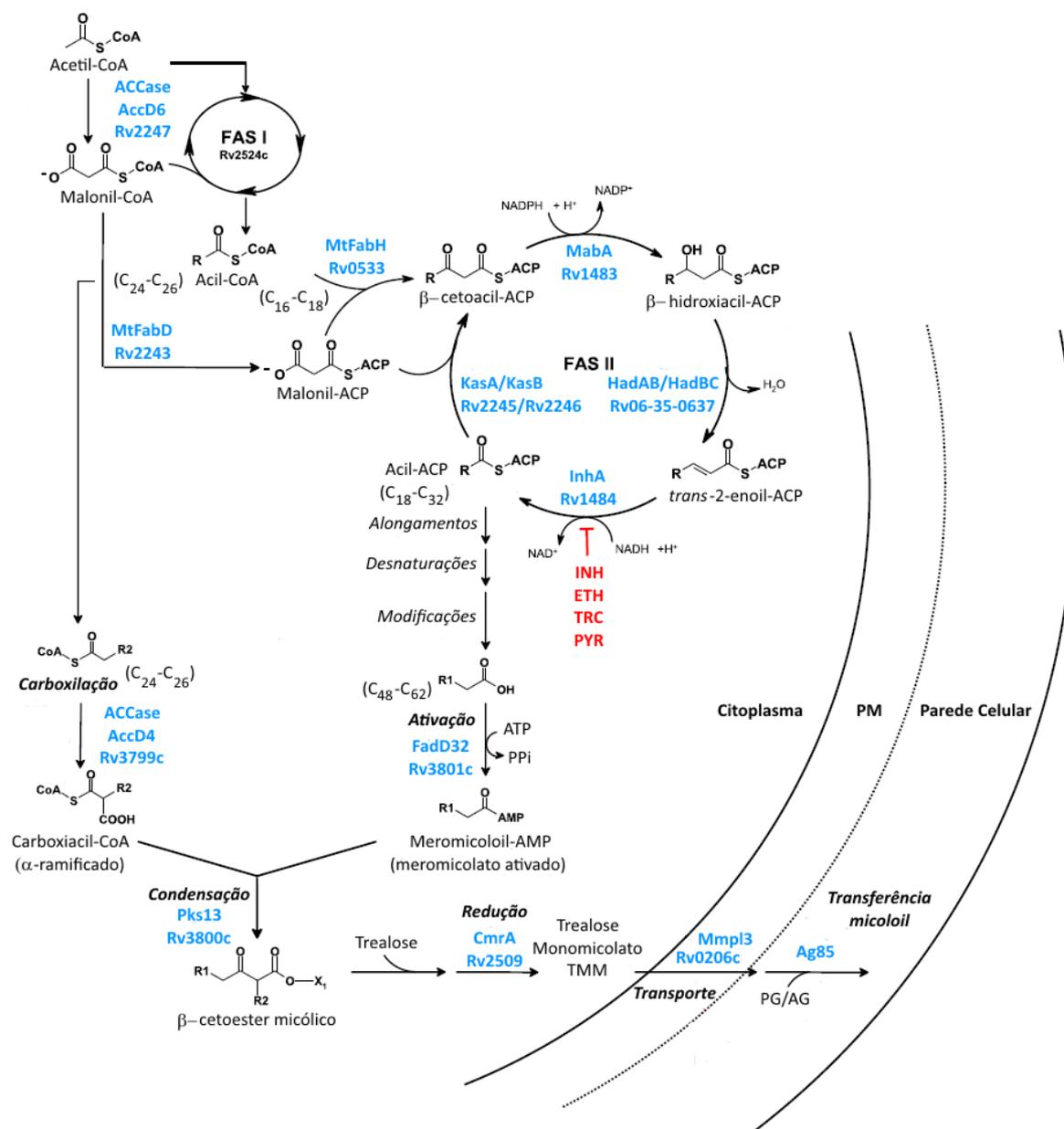
A rota inicia-se com a formação de malonil-coenzima A (CoA), a partir da carboxilação de acetil-CoA pela enzima acetil-CoA carboxilase (*Rv2247*), e pelo alongamento do acetil-CoA para formar acil-CoA (C₁₆-C₁₈) catalisada pela proteína FAS-I (**Figura 10**) [15].

A rota **FAS-II** segue a síntese por meio do alongamento de intermediários covalentemente ligados à proteína carreadora de acil (**AcpM**, *Rv2244*) pela ação de diferentes enzimas citosólicas [15]. A síntese dos ácidos graxos inicia-se pela condensação de Claisen do malonil-ACP (formado pela transferência do grupo malonato da molécula de malonil-CoA para a proteína carreadora de acil – ACP) com o acil-CoA pela enzima **FabH** (*Rv0533c*), formando β-cetoacil-ACP (**Figura 10**). Então, quatro enzimas atuam no ciclo para o alongamento dos ácidos graxos. A primeira enzima - **MabA** (*Rv1483*) - reduz o grupo β-ceto, da molécula de β-cetoacil-ACP, para formar um intermediário β-hidroxil, o qual é desidratado pelas enzimas **HadAB** e **HadBC** (codificadas pelos genes *Rv0635-Rv0636* e *Rv0636-Rv0637*, respectivamente), culminando na formação de enoil-ACP (**Figura 10**). Os passos seguintes consistem na redução da cadeia enoil pela enzima **InhA**, produzindo acil-ACP, e no alongamento de dois carbonos da cadeia meromericólica do acil-ACP pelas enzimas

β -cetoacil-ACP sintases (**KasA** ou **KasB**, codificadas pelos genes *Rv2245* e *Rv2246*) para formar o β -cetoacil-ACP. O ciclo somente cessa quando o acil-ACP atinge uma cadeia carbônica com tamanho suficiente (C_{18} - C_{32}) para que ocorram as etapas subsequentes de modificação e condensação da cadeia meromíclica (**Figura 10**) [15]. A penúltima etapa da biossíntese dos ácidos micólicos envolve uma reação de condensação pela enzima **Pks13** (*Rv3800c*) entre dois ácidos graxos ativados (carboxiacil-CoA α -ramificado e meromicoloil-AMP), formando um motivo β -cetoester micólico, que é logo reduzido a um micolato maduro (trealose monomicolato – TMM) (**Figura 10**) [15]. Os ácidos micólicos são então transportados para o periplasma, pela ação do transportador **MmpL3** (*Rv0206c*), e covalentemente ligados aos arabinogalactanos ou a outra molécula de TMM, formando uma trealose dimicolato (TDM) livre [37]. A presença dos ácidos micólicos na parede celular micobacteriana confere características importantes para o bacilo, como uma maior resistência a ação de químicos e à desidratação; a baixa permeabilidade de antibióticos hidrofílicos; a capacidade de formar biofilmes, entre outras [42].

A biossíntese dos ácidos micólicos é considerada uma rota-chave para o desenvolvimento de novos compostos anti-TB, visto que a maioria das enzimas que atuam no sistema FAS-II (*InhA*, *MabA*, *HadB* e *KasA*) são essenciais para a sobrevivência do bacilo [15]. A enzima *InhA*, em especial, já vem sendo alvo de um dos principais fármacos anti-TB – a INH – há pelo menos 50 anos e, portanto, é considerado um alvo vulnerável da micobactéria [15,42]. Entretanto, para que a INH iniba a atividade da *InhA* e, conseqüentemente, impeça a biossíntese dos ácidos micólicos e a formação do envelope celular, a molécula precisa passar por uma etapa de ativação, que é realizada por uma proteína da própria micobactéria, como será explicado nos tópicos a seguir.

Figura 10. Rota de biossíntese dos ácidos micólicos micobacterianos.



Fonte: Adaptado de [15].

Nota: Os nomes das enzimas que atuam na rota, bem como os genes que as codificam, estão destacados em azul. PM = periplasma. PG/AG = peptidoglicanos / arabinogalactanos. INH, ETH, TRC, PYR = isoniazida, etionamida, triclosan, piridomicina, respectivamente (destacados em vermelho).

1.5 Mecanismo de ação da isoniazida

A INH (**hidrazida do ácido isonicotínico** ou **isoniazida**) (**Figura 7**) é um fármaco antituberculoso sintético, que foi reportado primeiramente em uma tese de doutorado, e que vem sendo usado no tratamento da TB desde 1952 [44]. Sua descoberta ocorreu de certa forma por acaso, quando pesquisadores europeus estavam investigando o potencial da vitamina **nicotinamida (B₃)** no tratamento da TB [45,46]. Esse medicamento é conhecido por ter um rápido efeito bactericida em cultura nas primeiras 48 horas frente às micobactérias que estão se reproduzindo ativamente, após o qual exerce uma atividade bacteriostática sobre as bactérias persistentes, as quais se reproduzem a uma taxa bem mais lenta [44,47]. Em um modelo de infecção da TB em camundongos, a INH também apresenta uma rápida atividade bactericida, sendo capaz de reduzir a carga bacilar em até 3 log₁₀ nas primeiras duas semanas de tratamento [47].

O MOA da INH é considerado complexo e ainda é objeto de debate entre diferentes pesquisadores. Como dito anteriormente, a INH é um pró-fármaco, ou seja, ela não exerce a sua atividade biológica a menos que sofra uma metabolização prévia (processo chamado de **ativação**). Hoje, sabe-se que esse composto penetra o envelope micobacteriano por difusão passiva [46] e é ativado por uma enzima da própria micobactéria, chamada de **catalase-peroxidase KatG** (EC 1.11.1.21), que é codificada pelo gene de mesmo nome *katG* (*Rv1908c*) [48]. A KatG é uma heme enzima bifuncional pertencente à classe I da superfamília das heme peroxidases de bactérias, fungos e plantas, capaz de utilizar tanto peróxido de hidrogênio, quanto hidroperóxidos alquílicos para oxidar diferentes substratos, o que inclui a própria INH [49]. A estrutura quaternária da KatG é homodimérica, sendo que cada subunidade é constituída por dois domínios distintos: um domínio N-terminal, no qual está localizado o grupo prostético heme, cercado por seis resíduos conservados e essenciais (Arg104, Trp107, His108, His270, Trp321, Asp381) do único sítio ativo da enzima; e um domínio C-terminal que, apesar de não conter o sítio ativo da enzima, é essencial para o ajuste fino do sítio ativo e para a formação da estrutura quaternária da proteína [49–51].

A etapa de ativação da INH envolve primeiramente a oxidação do composto e remoção do grupamento hidrazina na presença de radicais O₂[•], formando um intermediário isonicotinoil (IN[•]), que é posteriormente ligado ao anel da nicotinamida do cofator dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD⁺ na sua forma oxidada) (**Figura 10**). O aduto

formado - isonicotinoil-NAD (INH-NAD) - é considerado o metabólito ativo da INH, capaz de ligar-se ao seu alvo, o sítio ativo da enzima InhA, e inibir a sua atividade, levando ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa, à interrupção da biossíntese dos ácidos micólicos e à morte celular [44,48,52,53].

A capacidade do intermediário isonicotinoil em reagir com muitas moléculas *in vitro* dificultou enormemente a elucidação do MOA da INH, pois rendeu muitos sinais falso-positivos que não tinham qualquer relação com o MOA de fato. Além disso, apesar de outras enzimas já terem sido sugeridas como prováveis alvos da INH, como a própria KasA, que também atua no sistema FAS-II, até o momento, apenas a enzima InhA é considerada o alvo de fato deste fármaco [46,48].

A exigência da etapa de ativação da INH pela enzima KatG pode ser considerada um fator limitante do MOA deste fármaco, uma vez que determinadas mutações no gene *katG*, que reduzem, ou até mesmo abolem, o processo de ativação, tornam o *M. tuberculosis* resistente à INH. Outras mutações que conferem resistência à INH também já foram descritas, e as mais relevantes, do ponto de vista clínico, serão exploradas no tópico a seguir.

1.6 Mecanismos de resistência à isoniazida

Embora a INH seja considerada um potente fármaco anti-TB, o *M. tuberculosis* desenvolveu diferentes mecanismos para contornar a ação tóxica desse medicamento. Sabe-se que, em micobactérias, o fenótipo de resistência a qualquer fármaco anti-TB surge principalmente das mutações que ocorrem no genoma, ou, com menos frequência, pela ativação de bombas de efluxo [48]. Até o presente momento, não há relatos de aquisição de resistência por transferência de plasmídeos ou transposons entre micobactérias [48]. As mutações podem ocorrer nos genes ativadores, como, por exemplo, nos genes *katG* e *ethA*, responsáveis pela ativação da INH e da ETH, respectivamente, ou nas sequências que regulam a expressão das proteínas-alvo [46,48].

O **mecanismo de resistência (MOR, do inglês *mechanism of resistance*)** à INH mais prevalente em isolados clínicos MDR é a alteração de um resíduo de serina (Ser ou S) por uma treonina (Thr ou T) no códon 315 na enzima KatG (conhecida como Ser315Thr ou **S315T**) [44,48,54]. Dependendo da região geográfica, estima-se que até 94% dos isolados clínicos, que apresentam resistência à INH, carreguem essa mutação. Entretanto, mais de 300 diferentes mutações já foram descritas no gene *katG*, incluindo aquelas que causam a terminação prematura, a alteração da fase de leitura (tanto por deleções, quanto por adições de bases) e, até mesmo, a deleção parcial ou completa do gene [48,55,56]. Sabe-se que a proteína KatG(S315T) mutante apresenta uma menor capacidade de metabolizar a INH, embora ainda mantenha as atividades de catalase e peroxidase necessárias para lidar com as espécies reativas de oxigênio; desta forma, não há prejuízo na aptidão (do inglês *fitness*) da micobactéria em sobreviver dentro das células do hospedeiro [44,56,57]. Atribui-se a reduzida metabolização da INH pelo mutante S315T à diminuição na afinidade do composto pelo sítio de ligação na enzima KatG, causada pela presença do resíduo de Thr, que aumenta o volume estérico nesta posição e reduz o acesso da INH ao sítio de ligação [44,58]. Como resultado, os valores de MIC para a INH, que normalmente ficam entre 0,05 a 0,5 µg/ml [48,59], elevam-se para valores acima de 1 µg/ml [44,60].

O segundo mecanismo de resistência à INH mais comum em isolados clínicos (encontrado em até 35% dos isolados clínicos resistentes à INH) se dá pela mutação por substituição de uma citosina por uma timina na posição -15, conhecida como **C(-15)T**, da sequência promotora do gene *inhA* [46,48,54,59]. Sabe-se que essa mutação aumenta os

níveis de mRNA em até 20 vezes, o que resulta na superexpressão da enzima InhA em aproximadamente 8 vezes [61]. Essa maior abundância da InhA dentro da célula causa uma fraca resistência à INH por um efeito de titulação, no sentido de que se torna necessário mais inibidor para observar a mesma atividade bactericida do composto (MIC \approx 1 μ g/ml) [38,46]. Uma vez que a InhA também é alvo da ETH, a mutação C-(15)T confere, na realidade, uma coresistência entre esses dois compostos [48,59].

Apesar de já se ter relatos de mutações na região codificadora do gene *inhA*, estas são consideradas bastante raras na população com TB e não representam grande relevância clínica e epidemiológica [48]. Sugere-se que esta baixa frequência de mutações na região codificadora deva-se ao fato de que o gene *inhA* é essencial para a sobrevivência da micobactéria, e, portanto, não permite uma vasta liberdade de alterações na sua sequência [48]. Até o momento, já foram descritas 15 mutações nesse gene em isolados clínicos, e todas se encontram no sítio de ligação ao NADH [44,48], as quais acabam reduzindo a afinidade de ligação da enzima pelo cofator [60]. Sabendo que uma dessas mutações, a alteração de um resíduo de serina no códon 94 por uma alanina (Ser94Ala ou **S94A**), confere resistência à INH, esta foi utilizada para provar geneticamente o alvo deste composto como sendo, de fato, a enzima InhA [38].

Como visto até aqui, o principal MOR do *M. tuberculosis* frente à INH está baseado nas mutações presentes no gene *katG*, que reduzem a formação do aduto IN-NAD necessário para a inibição da enzima InhA. Desta forma, torna-se tentador projetar um fármaco que seja capaz de contornar este MOR, ao inibir diretamente a InhA sem precisar passar pela etapa de ativação catalisada pela KatG. Já foi proposto que, além de conferir resistência à INH, as mutações nesse gene poderiam permitir a sobrevivência do bacilo nos pacientes sob tratamento e a sua transmissão para outras pessoas não infectadas [63], além de facilitar a evolução para cepas MDR [54]. O produto natural piridomicina [41], produzido pela bactéria *Streptomyces pyridomyceticus*, e o triclosan [40] (**Figura 7**) são exemplos de fármacos que inibem diretamente a atividade da InhA ao competirem com o cofator NADH pelo sítio de ligação, não precisando passar por qualquer etapa prévia de metabolização dentro da célula; sendo assim, estes compostos teriam o potencial de inibir cepas MDR [41,48]. Outras novas classes de compostos promissoras, que atuam como inibidores diretos da InhA, são as 4-hidroxi-2-piridonas e os tiadiazóis (GSK613 e GSK625), os quais já se mostraram ativos contra cepas MDR/XDR [64].

Os compostos que foram objetos de investigação desta tese também foram previamente reportados na literatura como sendo inibidores diretos da enzima InhA. Um deles, o composto pentaciano(isoniazida)ferrato(II), também chamado de **IQG-607**, consiste em um análogo estrutural da própria INH, que foi selecionado por meio de ensaios de inibição enzimática *in vitro* [65], e será abordado em maiores detalhes no **Capítulo 2**. Os outros dois compostos, denominados **Labio-16** e **Labio-17**, são provenientes de um estudo que utilizou a abordagem de triagem virtual baseada no ligante (do inglês *virtual-ligand-screening*) [66], seguida pelos testes *in vitro* frente à enzima [67], e serão abordados no **Capítulo 3**. Por fim, no **Capítulo 4** serão levantadas as principais conclusões desta tese, bem como as perspectivas para estudos futuros.

Capítulo 2

1.7 O composto pentaciano(isoniazida) ferrato(II) como candidato a fármaco para o tratamento da TB

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

2.2 Objetivos Específicos

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Abadi, BL, Villela, AD, Rodrigues-Junior VS, Subtil FT, Dalberto PF, Pinheiro APS, Santos DS, Machado P, Basso LA, Bizarro CV. 2018. Revisiting activation of and mechanism of resistance to compound IQG-607 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e02222-17.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02222-17>.

1.7 O composto pentaciano(isoniazida)ferrato(II) (IQG-607) como candidato a fármaco para o tratamento da TB

Diante do surgimento das cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos principais fármacos utilizados no tratamento da doença, torna-se evidente a necessidade de manter-se uma busca contínua por novas abordagens terapêuticas para a TB. Portanto, não somente é indispensável identificar novos alvos moleculares que comprometam a sobrevivência do bacilo, mas também aperfeiçoar os compostos já utilizados no tratamento, para que seja possível contornar os diferentes MORs desenvolvidos pela micobactéria descritos anteriormente. Levando-se em consideração algumas características importantes, como a simplicidade química e uma biodisponibilidade e toxicidade favoráveis, a INH se apresenta como um composto bastante promissor para se projetar novos análogos estruturais que sejam ativos contra as cepas resistentes.

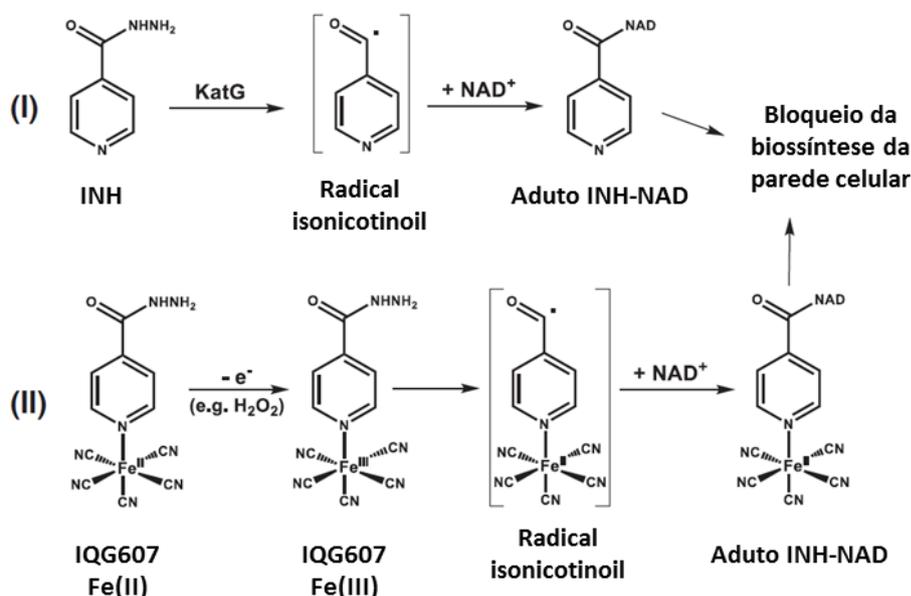
Sendo assim, em 2004, Oliveira e colaboradores [68] relataram o primeiro estudo envolvendo um análogo estrutural da INH, denominado de **IQG-607**, que contém em sua estrutura química um radical pentacianoferrato(II) ligado ao nitrogênio piridínico da INH (**Figura 7**). Nesse trabalho foi demonstrada a capacidade desse composto de inibir tanto a enzima InhA de *M. tuberculosis* na sua forma selvagem, quanto na sua mutante estrutural que contém uma alteração do resíduo isoleucina 21 para uma valina (I21V) [68]. Por meio de ensaios de inibição enzimática *in vitro*, observou-se que o IQG-607 foi capaz de inibir ambas as formas da InhA, preferencialmente na ausência do cofator NADH. Esse foi o primeiro indício de que o composto, diferentemente de como ocorre com a INH, não necessitaria da etapa de ativação pela KatG para inibir a InhA e que, provavelmente, o seu MOA envolveria a interação direta do composto com o sítio de ligação do NADH à enzima [68]. Uma vez que a maior parte da resistência à INH já observada em isolados clínicos se deve a mutações presentes no gene *katG*, que, conseqüentemente, resulta na inabilidade da enzima de formar intermediários de INH ativados, tornou-se claro que o composto IQG-607 teria o potencial de substituir o fármaco de referência nessas situações [69]. Posteriormente, foi demonstrado que as substituições dos resíduos S94A e I47T, presentes nas mutantes estruturais da InhA, também não impediram a ação do IQG-607 frente à enzima purificada, indicando novamente que o composto poderia atuar como um fármaco alternativo frente a

cepas de *M. tuberculosis* que se mostrassem resistentes à INH, devido às mutações encontradas no gene *inhA* [68,69].

Uma possível explicação sobre como o complexo pentaciano(isoniazida)ferrato(II) seria capaz de inibir a enzima InhA, contornando a etapa de ativação pela KatG, envolveria um mecanismo de autoativação do IQG-607 [65]. A hipótese inicial era de que devido à presença de espécies reativas de oxigênio e outros oxidantes celulares (ex.: H₂O₂) dentro do macrófago e da micobactéria, o complexo metálico pentacianoferrato(II) sofreria um processo oxidativo, que alteraria o estado de oxidação do átomo de ferro(II) para ferro(III) [65,70]. Desta forma, o complexo oxidado, contendo um átomo de ferro(III) termodinamicamente instável, poderia sofrer uma reação de transferência de elétrons intramolecular, formando espécies intermediárias, como o radical teórico isonicotinoil $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{isonicotinoil})]^{3-}$. Este intermediário poderia então formar um aduto, também hipotético, semelhante àquele formado quando a INH é ativada dentro da micobactéria [70]. O provável aduto teria então a capacidade de se ligar ao sítio ativo da InhA e inibir a sua atividade, logo, impedindo que ocorresse a síntese dos ácidos micólicos (**Figura 11**) [65,70].

Em 2016, entretanto, outro trabalho envolvendo o IQG-607 contestou a hipótese de que seriam os metabólitos provenientes da oxidação do complexo inorgânico, e não o próprio $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ intacto, os inibidores da enzima InhA [71]. Os pesquisadores observaram que, com a decomposição do IQG-607 ao longo do tempo, e consequente formação de ácido nicotínico como seu produto de degradação, ocorreu uma redução na atividade inibitória do composto frente à enzima. Desse modo, os autores concluíram que o complexo pentaciano(isoniazida)ferrato(II) intacto seria de fato o inibidor da InhA, e não os metabólitos provenientes da oxidação intracelular ou algum produto de degradação [71].

Figura 11. Mecanismo proposto para a autoativação do IQG-607.



Fonte: Adaptado de [70].

Nota: (I) A ativação da INH é dependente da ação da KatG, e mutações neste ativador levam à resistência ao composto. **(II)** O complexo inorgânico pentacianoferrato(II) ligado à INH teoricamente permitiria uma transferência interna de elétrons, que ativaria a própria molécula, dispensando a ação da KatG.

Estudos pré-clínicos, envolvendo um modelo murino de TB, também mostraram a atividade do IQG-607 frente à cepa laboratorial H37Rv. Além de reduzir visivelmente as lesões pulmonares causadas pela infecção do bacilo, o composto também diminuiu a contagem das CFUs tanto nos pulmões, quanto no baço dos animais tratados [72]. Em um modelo de infecção de macrófagos pela cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, os resultados também foram satisfatórios: tanto os fármacos de referência INH e RIF, quanto o IQG-607, foram capazes de diminuir significativamente a carga bacteriana dentro dos macrófagos. Este resultado levou os autores a concluírem que o composto seria, portanto, capaz de atravessar a membrana plasmática e de eliminar o bacilo dentro do fagossomo do macrófago [73]. Nesse mesmo trabalho foi mostrado também que o IQG-607, assim como a INH, tem como alvo a enzima InhA, uma vez que o tratamento de culturas de *M. tuberculosis* com 4 ou 22 μM do composto interrompeu totalmente a biossíntese dos ácidos micólicos, como verificado pela extração dos lipídios, separação por cromatografia em camada delgada e exposição em filme de raio-X [73].

Além dos resultados promissores observados nos ensaios enzimáticos e nos estudos pré-clínicos, o IQG-607 também apresentou uma menor toxicidade em camundongos em relação à INH: nas concentrações de 250 e 500 mg kg⁻¹ não houve mortalidade entre os animais tratados, além de não ter sido observada nenhuma alteração no peso tanto dos machos, quanto das fêmeas [74]. O perfil toxicológico favorável, também demonstrado em ratos [75] e mini porcos [76], aliado a outras características da molécula, como, por exemplo, o seu tamanho diminuto (446 Da) e a sua estabilidade em pH ácido, sugeriram que o composto poderia vir a ser, portanto, um futuro fármaco passível de administração por via oral [65,74]. Recentemente, Dadda e colaboradores [77] relataram um estudo pré-clínico do perfil farmacocinético do IQG-607, no qual foi mostrado que o composto tem uma meia-vida curta ($t_{1/2} = 1,1$ h) e é rapidamente absorvido pela via oral ($t_{max} = 0,25$ h), mas que apresenta uma baixa biodisponibilidade em camundongos [F (%) = 3,7 (camundongos em jejum) e 3,8 (camundongos alimentados)]. Os autores sugerem que a baixa disponibilidade não necessariamente comprometeria o uso do composto, desde que o mesmo fosse capaz de exercer a atividade biológica desejada [77].

Diante dos estudos já realizados com o IQG-607, pode-se notar que o composto apresentava, de fato, um potencial como um fármaco anti-TB, principalmente como uma alternativa terapêutica frente a cepas resistentes à INH. Entretanto, ainda existiam algumas questões que precisariam ser respondidas em relação à capacidade do composto em eliminar cepas que possuíssem, principalmente, mutações na proteína ativadora KatG. Sendo assim, este trabalho se propôs a realizar uma série de experimentos que auxiliassem na elucidação do MOR do *M. tuberculosis* frente ao IQG-607.

Nosso ponto de partida foi verificar a ação do IQG-607 em ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (**MIC**) frente a uma gama de isolados clínicos de *M. tuberculosis*, que continham diferentes mutações e graus de resistência aos principais fármacos anti-TB. Esse experimento permitiu observar como o IQG-607 se comportava frente a cepas com resistência não somente à INH, mas também à RIF, à STR e ao ETB, que são alguns dos principais fármacos já usados no tratamento da doença.

Os resultados observados frente aos isolados clínicos então nos conduziram a uma série de experimentos, que foram realizados usando-se uma abordagem genética. Sabia-se que o IQG-607 era capaz de inibir *in vitro* diretamente a atividade da enzima InhA selvagem e das suas mutantes estruturais I21V, S94A e I47T. Entretanto, ainda não havia sido

mostrada a atividade do composto frente a cepas isogênicas que possuísem somente uma única mutação nos genes envolvidos na ativação da INH (ex.: *katG*) e na síntese de ácidos micólicos (ex.: *inhA*). Estes dados de interação de um determinado composto com seu provável alvo ou ativador poderiam ser obtidos, por exemplo, por meio de substituições de aminoácidos importantes para a catálise da enzima-alvo ou que aumentem a expressão da mesma, conferindo, desta forma, resistência ao composto [48]. Sendo assim, nós geramos uma cepa de *M. tuberculosis* que mimetiza o mesmo mecanismo de resistência à INH encontrado nos isolados clínicos: a mutação no códon 315 do gene *katG*, que altera o resíduo de serina pela treonina (S315T), reduzindo desta forma a metabolização e ativação da INH [48,57]. Também por meio de ensaios de determinação da MIC, foi possível observar o efeito dessa única mutação sobre a atividade do IQG-607.

Outra forma de validar o alvo de um determinado composto e de verificar quais mutações levam a sua resistência se dá por meio da seleção de mutantes espontâneos e do sequenciamento completo do genoma [26], como foi discutido na introdução desta tese. Sendo assim, nós utilizamos o IQG-607 em concentrações acima da sua MIC para selecionar mutantes espontâneos em placas de cultivo e, posteriormente, sequenciamos o genoma completo de algumas colônias representantes para identificar qual mutação estaria sendo responsável por conferir resistência ao composto. Esse experimento permitiu avaliar se o MOR da micobactéria frente ao IQG-607 se daria pelas mesmas mutações que garantem a resistência à INH, ou se os mecanismos seriam de fato diferentes entre os compostos.

Para corroborar os dados relatados por Rodrigues-Junior e colaboradores [73], de que o IQG-607 tem como alvo a enzima InhA, nós também desenvolvemos duas outras cepas de *M. tuberculosis*. Para uma delas foi fornecida uma cópia extra do gene *inhA* selvagem (WT), mimetizando o efeito da mutação C(-15)T encontrada na região promotora do gene *inhA* [41]. Já para a outra cepa foi fornecida uma cópia extra do gene *inhA* mutante (S94A), responsável por causar resistência à INH e à ETH devido à uma provável redução na ligação aos adutos [38,48]. Desta forma, esperava-se que houvesse um aumento da MIC do IQG-607 quando a expressão da InhA fosse elevada, tanto da enzima selvagem, quanto da mutante estrutural S94A, provando geneticamente o alvo deste composto.

Por último, considerando que o desenvolvimento do IQG-607 tem como objetivos criar uma alternativa terapêutica em situações que haja resistência ao fármaco de referência INH e reduzir a toxicidade ocasionada pelo tratamento anti-TB, tornava-se necessário avaliar

a ação desse composto em conjunto com outros fármacos anti-TB em uso. Isso se deve ao fato de o tratamento para a TB não ser realizado na forma de monoterapia, e sim, pela combinação de ao menos quatro diferentes fármacos de primeira linha, já discutidos anteriormente. Sendo assim, utilizamos os ensaios de determinação da MIC para avaliar se a ação do IQG-607 seria alterada quando combinado com outros fármacos anti-TB, e se o mesmo alteraria a atividade dos demais compostos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Elucidar o mecanismo de resistência da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* frente ao composto IQG-607 por meio de estudos genéticos.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Selecionar mutantes espontâneos para o composto IQG-607 e determinar a mutação por sequenciamento genômico total e por sequenciamento direcionado de DNA.
- II. Desenvolver uma cepa de *M. tuberculosis* com a mutação S315T no gene *katG* e testar a ação do composto.
- III. Avaliar a atividade do composto IQG-607 frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis* multirresistentes.
- IV. Testar a ação do composto frente a cepas de *M. tuberculosis* que superexpressem a enzima InhA selvagem ou sua mutante estrutural S94A.
- V. Avaliar a ação do composto em um modelo de infecção de macrófagos utilizando uma cepa de *M. tuberculosis* resistente à INH.
- VI. Investigar a interação do composto IQG-607 com outros fármacos anti-TB.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Título: Revisiting activation of and mechanism of resistance to compound IQG-607 in *Mycobacterium tuberculosis*.

Autores: Bruno L. Abbadi, Anne D. Villela, Valnês S. Rodrigues-Junior, Fernanda T. Subtil, Pedro F. Dalberto, Ana P. S. Pinheiro, Diógenes S. Santos, Pablo Machado, Luiz A. Basso, Cristiano V. Bizarro.

Periódico: Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC).

Ano: 2018.

Referência: Abbadi, BL, Villela AD, Rodrigues-Junior VS, Subtil FT, Dalberto PF, Pinheiro APS, Santos DS, Machado P, Basso LA, Bizarro CV. 2018. Revisiting activation of and mechanism of resistance to compound IQG-607 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e02222-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02222-17>.

Fator de Impacto: 4.302 (2016).

Categoria (CAPES): Qualis A2.



Revisiting Activation of and Mechanism of Resistance to Compound IQG-607 in *Mycobacterium tuberculosis*

© Bruno L. Abbadi,^{a,b} Anne D. Villela,^a Valnês S. Rodrigues-Junior,^a Fernanda T. Subtil,^{a,b} Pedro F. Dalberto,^{a,b} Ana P. S. Pinheiro,^{a,b} Diógenes S. Santos,^{a,c,†} Pablo Machado,^{a,c} Luiz A. Basso,^{a,b} © Cristiano V. Bizarro^{a,b}

ABSTRACT IQG-607 is a metal complex previously reported as a promising anti-tuberculosis (TB) drug against isoniazid (INH)-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Unexpectedly, we found that INH-resistant clinical isolates were resistant to IQG-607. Spontaneous mutants resistant to IQG-607 were subjected to whole-genome sequencing, and all sequenced colonies carried alterations in the *katG* gene. The *katG*(S315T) mutation was sufficient to confer resistance to IQG-607 in both MIC assays and inside macrophages. Moreover, overexpression of the *InhA*(S94A) protein caused IQG-607's resistance.

KEYWORDS antibiotic resistance, MIC, spontaneous mutants, tuberculosis, whole-genome sequencing

The pentacyano(isoniazid)ferrate(II) complex ($\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), also known as IQG-607, is an isoniazid (INH) analog that contains a cyanoferrate moiety bound to the pyridinic nitrogen of the INH molecule (Fig. 1) (1). So far, two alternative hypotheses were proposed to explain its mechanism of action. Enzymatic inhibition studies demonstrated that IQG-607 inhibits the wild-type NADH-dependent enoyl-[acyl carrier protein] reductase (*InhA*) enzyme (Enzyme Commission no. EC 1.3.1.9) and its structural mutants (I21V, S94A, and I47T) in a time-dependent manner (2, 3). Interestingly, this inhibition was observed in the absence of NAD^+ or NADH and without requiring activation by the catalase-peroxidase *KatG* (EC 1.11.1.21), suggesting that IQG-607 could be used against INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains whose mechanism of resistance involves mutations in the *katG* (Rv1908c) gene (2, 3). Another possible explanation involves an intramolecular electron transference mediated by the metal center that would self-activate the INH moiety from IQG-607 inside the host macrophages, thus forming a hypothetical adduct with NADH (4). Despite the extensive characterization of IQG-607 interaction with the *InhA* enzyme, its activity in mice (5), and its favorable toxicological profile in rats (6) and mini pigs (7), it is still unknown if the compound is active against *M. tuberculosis* strains carrying mutations in the *katG* gene, hence our work focused on elucidating the mechanism of resistance of the *M. tuberculosis* to the compound IQG-607 by employing a genetic approach with a set of different INH-resistant strains.

We first tested the compound activity against several multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) clinical isolates by determining MICs on Middlebrook 7H9 liquid medium as described previously (8). Eight MDR-TB clinical isolates carried the most common mutation found in the *katG* gene (Ser315Thr) (9), while one INH-susceptible clinical

Received 30 October 2017 Returned for modification 6 November 2017 Accepted 10 November 2017

Accepted manuscript posted online 20 November 2017

Citation Abbadi BL, Villela AD, Rodrigues-Junior VS, Subtil FT, Dalberto PF, Pinheiro APS, Santos DS, Machado P, Basso LA, Bizarro CV. 2018. Revisiting activation of and mechanism of resistance to compound IQG-607 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e02222-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02222-17>.

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Anne D. Villela, annevillela@gmail.com, or Cristiano V. Bizarro, cristiano.bizarro@puccrs.br.

† Deceased.

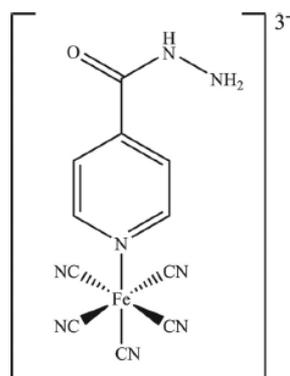


FIG 1 Chemical structure of IQG-607 ($\text{Na}_3[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). This inorganic complex contains a pentacyanoferrate(II) moiety bound to the nitrogen atom of the heterocyclic ring of isoniazid. This moiety is thought to activate the isoniazid molecule.

isolate carried the wild-type gene. As shown in Table 1, all strains were resistant to both INH (MIC > 25 mg/liter) and IQG-607 (MIC > 100 mg/liter), except for the CDCT-28 isolate. This result was unexpected, since it suggests an association between the presence of the *katG*(S315T) mutation and an increase of at least 64× in the MIC values of IQG-607.

Next, spontaneous mutants resistant to IQG-607 were isolated on 7H10 plates using compound concentrations above the MIC (≥ 2 mg/liter). We confirmed the resistance phenotype by determining MICs of six colonies (named IQG1 to 6) selected from the highest compound concentration tested (16 mg/liter). The six selected mutants displayed cross-resistance only to INH (Table 2). We retested the resistance of one representative mutant (IQG1) by monitoring its growth rate, as previously described (10), in the presence of IQG-607 or INH above their MIC values, and indeed neither of the compounds prevented the growth of this mutant (see Fig. S1 in the supplemental material).

We performed the whole-genome sequencing (by MiSeq platform) of three colonies (IQG1 to 3) to uncover the mutations associated with the resistance phenotype, and we found that all colonies carried mutations in the *katG* gene. This result was confirmed by target DNA sequencing of the six mutants (IQG1 to 6) using several primers described in Table S1 in the supplemental material. Indeed, all six mutants carried alterations in the *katG* gene (Table 2). IQG1, 2, and 5 had a single deletion of cytosine 120 (120del1),

TABLE 1 Activity of IQG-607 and several anti-TB compounds against nine clinical isolates^a

Isolate ^c	<i>katG</i> mutation	<i>InhA</i> promoter genotype	<i>rpoB</i> mutation	MIC (mg/liter) for ^b			
				INH	IQG-607	RIF	MFx
H37Rv	WT	WT	WT	0.39	1.56	<0.2	<0.2
CDCT-1	S315T	WT	H526D	>100	>100	>100	<0.2
CDCT-2	S315T	C(-15)T	H526D	100	>100	>100	<0.2
CDCT-3	S315T	WT	D516V	25	>100	6.25	<0.2
CDCT-4	S315T	WT	S531L	>100	>100	>100	<0.2
CDCT-5	S315T	WT	D516V	50	>100	>100	<0.2
CDCT-10	S315T	WT	H526D	100	>100	>100	<0.2
CDCT-16	S315T	C(-15)T	D516V	100	>100	>100	<0.2
CDCT-27	S315T	WT	WT	25	>100	<0.2	<0.2
CDCT-28	WT	WT	D516A	0.39	1.56	<0.2	<0.2

^aTB, tuberculosis; WT, wild type.

^bMIC values reported here were observed in two independent experiments or were the highest value found among three independent tests. INH, isoniazid; IQG-607, pentacyano(isoniazid)ferrate(II); RIF, rifampin; MFx, moxifloxacin.

^cClinical isolate identification.

TABLE 2 Activity of IQG-607, INH, ETH, and MFX against several laboratory strains of *M. tuberculosis*

Strain	<i>katG</i> genotype	<i>inhA</i> promoter genotype	<i>inhA</i> genotype	MIC (mg/liter) for ^a			
				INH	ETH	MFX	IQG-607
H37Rv	WT	WT	WT	0.39	3.13	0.08	1.56
IQG1 ^b	120del1	WT	WT	>100	3.13	0.16	>100
IQG2	120del1	WT	WT	>100	1.56	0.08	>100
IQG3	T(271)C	WT	WT	>100	3.13	0.16	>100
IQG4	1298del1	WT	WT	>100	1.56	0.08	>100
IQG5	120del1	WT	WT	>100	1.56	0.02	>100
IQG6	C(1249)G	WT	WT	>100	3.13	0.08	>100
pNIP:: <i>furA</i> + <i>katG</i> (WT)	WT	WT	WT	<0.2	3.13	<0.2	0.78
pNIP:: <i>furA</i> + <i>katG</i> (S315T)	G(944)C ^c	WT	WT	>100	0.78	<0.2	>100
pNIP::∅	WT	WT	WT	0.39	6.25	<0.2	1.56
pNIP:: <i>inhA</i> (WT)	WT	WT	WT	0.39	6.25	<0.2	3.13
pNIP:: <i>inhA</i> (S94A)	WT	WT	T(280)G ^d	25	>100	<0.2	>100

^aMIC values reported here were observed in two independent experiments or were the highest value found among three independent tests. ETH, ethionamide.

^bIQG1-6 refers to the IQG-607 spontaneous mutant strains.

^cThis mutation changes the serine-315 residue by a threonine (S315T).

^dThis strain still expresses the underlying level of the wild-type *inhA* gene but carries the mutant *inhA* gene [T(280)G], cloned into the integrative plasmid pNIP40/b. This mutation changes the serine-94 residue by an alanine (S94A).

which changed the reading frame of *katG* and introduced a premature stop codon at position 45. The resultant defective protein lacks almost all the residues from the N-terminal domain, including the key active site residues (11) and the entire C-terminal domain. The deletion of adenine 1298 (1298del1) in the mutant IQG4 introduced a premature stop codon at position 467 and led to a truncated protein lacking only the C-terminal domain. These findings are in agreement with previous work using INH to select spontaneous mutants (12, 13). The W91R mutation found in IQG3 was already described in clinical isolates at a very low frequency (14–17), and it is expected to confer resistance to INH by a still unclear mechanism, possibly involving a disruption of an important H-bonding network in the active site of KatG (18). To the best of our knowledge, the H417D mutation found with IQG6 has never been described in either clinical isolates or in laboratory strains. Although the role of this particular histidine residue is not known, some studies have already uncovered the importance of the neighbor residue Arg-418 for catalysis and its involvement in INH resistance (18–20).

To establish a causal relationship between the clinically relevant mutation *katG*(S315T) and resistance to IQG-607, we knocked out the wild-type *katG* gene from *M. tuberculosis* H37Rv strain by using an allelic exchange approach (21) and complemented it with the wild-type, *furA*+*katG*(WT), or the mutated allele, *furA*+*katG*(S315T) (see Fig. S2 in the supplemental material). MIC for IQG-607 increased by more than 64-fold in the mutated strain (Table 2), clearly suggesting that the compound depends on KatG to be active. However, MIC assays lack the oxidizing environment of the macrophage, and therefore would not allow a route for the redox-mediated self-activation of IQG-607 previously proposed (4). To test this premise, we infected murine macrophages as described previously (22) with $\Delta furA::katG$ laboratory strains carrying the wild-type gene or the S315T mutant and treated them with IQG-607. The mutant strain preserved its resistance phenotype toward IQG-607 inside macrophages (Fig. 2), indicating that the host intracellular environment is not sufficient to trigger the self-activation mechanism proposed for IQG-607, which reinforces the necessity of the KatG enzyme for the activity of IQG-607.

Finally, we evaluated the antimicrobial activity of IQG-607 in mycobacterial cells constitutively overexpressing the S94A mutant *InhA* enzyme, a mutation that is known to cause INH resistance (23). The mutant *inhA* gene (Rv1484) was cloned into an integrative plasmid (pNIP40/b) under the control of the *hsp60* promoter. In addition to the expected resistance to INH and also to ethionamide (ETH), the expression of the *InhA*(S94A) mutant enzyme (see Fig. S3 in the supplemental material) resulted in mycobacteria also resistant to IQG-607 (Table 2). This result genetically validated the *InhA* protein as the target of IQG-607. However, it also showed that the Ser-94 residue

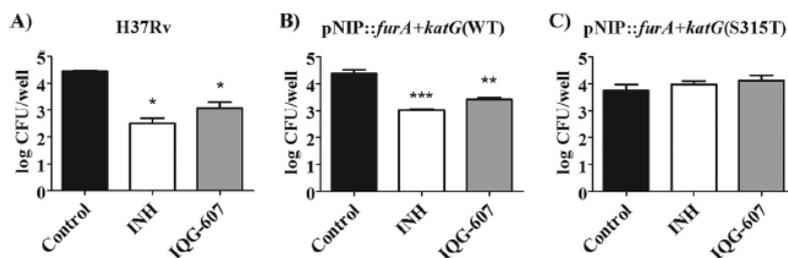


FIG 2 Treatment of macrophages infected with (A) H37Rv, (B) pNIP::furA+katG(WT), or (C) pNIP::furA+katG(S315T) laboratory strains of *M. tuberculosis* with 50 μ M (6.85 mg/liter) of INH (white bar) or 50 μ M (23.2 mg/liter) of IQG-607 (gray bar). Data are expressed as mean numbers of the logarithms of CFU per well from triplicates. Two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test was employed to compare the treatments. Asterisks (*/**/****) represent *P* values below 0.05, 0.01, and 0.001, respectively, compared with the untreated control group (black bar).

is essential for the compound's interaction with the enzyme, somehow contradicting the inhibition observed against the purified InhA(S94A) enzyme (3).

In conclusion, we demonstrated that IQG-607 does not activate itself inside macrophages or mycobacteria. As with INH, IQG-607 also requires the activity of KatG in order to be active against *M. tuberculosis* strains. These findings challenge its planned usage against INH-resistant strains. Nonetheless, the compound has already been reported to be less toxic than INH in a preclinical study using mice (5, 24). This is a remarkable feature, since INH was previously associated with hepatotoxicity in animal and humans due to its toxic metabolites, such as hydrazine (25). We performed a checkerboard assay as previously described (26) and found that IQG-607 has an indifferent effect when combined with other anti-TB drugs (see Table S2 in the supplemental material), showing it could be used in association. Further experiments will be required to understand its metabolism inside mycobacteria and to establish its utility as an INH surrogate with low toxicity.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AAC.02222-17>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.3 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Institute of Science and Technology in Tuberculosis (INCT-TB), Brazil (grant Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES), the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq) (grant 441720/2014-5 to A.D.V.), and the Brazilian Development Bank (BNDES) (grant 14.2.0914.1). B.L.A acknowledges the fellowship by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). L.A.B. (CNPq, grant 520182/99-5) and C.V.B are Research Career Awardees of CNPq.

We acknowledge Silvana Spindola de Miranda from the Federal University of Minas Gerais (Belo Horizonte, Brazil) for providing the clinical isolates used in this study, Mariane Rotta for providing purified InhA(WT) enzyme used in the Western blot assay, and Mary Jackson and Brigitte Gicquel for providing the pNIP40/b and pPR27xylE plasmids.

We declare that we have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Sousa EH, Basso LA, Santos DS, Diógenes IC, Longhinotti E, Lopes LG, Moreira IS. 2012. Isoniazid metal complex reactivity and insights for a novel anti-tuberculosis drug design. *J Biol Inorg Chem* 17:275–283. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0848-x>.
- Oliveira JS, Sousa EH, Basso LA, Palaci M, Dietze R, Santos DS, Moreira IS. 2004. An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Commun (Camb)* 7:312–313. <https://doi.org/10.1039/b313592f>.

3. Vasconcelos IB, Meyer E, Sales FAM, Moreira IS, Basso LA, Santos DS. 2008. The mode of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* wild-type and isoniazid-resistant 2-*trans*-enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes by an inorganic complex. *Antifect Agents Med Chem* 7:50–62. <https://doi.org/10.2174/187152108783329799>.
4. Sousa EH, de Mesquita Vieira FG, Butler JS, Basso LA, Santiago DS, Diógenes IC, Lopes LG, Sadler PJ. 2014. [Fe(CN)₅(isoniazid)]³⁻: an iron isoniazid complex with redox behavior implicated in tuberculosis therapy. *J Inorg Biochem* 140:236–244. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.08.002>.
5. Rodrigues-Junior VS, Dos Santos Junior A, Dos Santos AJ, Schneider CZ, Calixto JB, Sousa EH, de França Lopes LG, Souto AA, Basso LA, Santos DS, Campos MM. 2012. Activity of IQG-607, a new orally active compound, in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int J Antimicrob Agents* 40:182–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.019>.
6. Rodrigues-Junior VS, Machado P, Calixto JB, Siqueira JM, Andrade EL, Bento AF, Campos MM, Basso LA, Santos DS. 2017. Preclinical safety evaluation of IQG-607 in rats: acute and repeated dose toxicity studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 86:11–17. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.02.016>.
7. Rodrigues-Junior VS, Cintra L, Machado P, Dadda A, Basso LA, Mafra ACCN, Campos AH, Campos MM, Santos DS. 2017. Toxicological profile of IQG-607 after single and repeated oral administration in minipigs: an essential step towards phase I clinical trial. *Regul Toxicol Pharmacol* 90:78–86. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.08.015>.
8. Giacobbo BC, Pissinate K, Rodrigues-Junior V, Villela AD, Grams ES, Abbadi BL, Subtil FT, Sperotto N, Trindade RV, Back DF, Campos MM, Basso LA, Machado P, Santos DS. 2017. New insights into the SAR and drug combination synergy of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Med Chem* 126:491–501. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.11.048>.
9. Unissa AN, Subbian S, Hanna LE, Selvakumar N. 2016. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol* 45:474–492. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.004>.
10. McGrath M, Gey van Pittius NC, Sirgel FA, Van Helden PD, Warren RM. 2014. Moxifloxacin retains antimycobacterial activity in the presence of *gyrA* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2912–2915. <https://doi.org/10.1128/AAC.02583-13>.
11. Bertrand T, Eady NA, Jones JN, Jesmin Nagy JM, Jamart-Grégoire B, Raven EL, Brown KA. 2004. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase. *J Biol Chem* 279:38991–38999. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402382200>.
12. Bergval IL, Schuitema AR, Klatser PR, Anthony RM. 2009. Resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* selected *in vitro* do not reflect the *in vivo* mechanism of isoniazid resistance. *J Antimicrob Chemother* 64:515–523. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp237>.
13. Brossier F, Cambau E, Tessier E, Jarlier V, Sougakoff W. 2016. The *in vitro* mechanisms of isoniazid and ethionamide resistance poorly reflect those *in vivo* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc* 101:144–145. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.09.028>.
14. Vilchêze C, Jacobs WR. 2014. Resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: genes, mutations, and causalities. *Microbiol Spectr* 2:MGM2-0014–2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0014-2013>.
15. Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, Leite CQ, Sato DN, Shikama ML, Mamizuka EM, Hirata RD, Hirata MH. 2004. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3373–3381. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3373-3381.2004>.
16. Meumann EM, Globan M, Fyfe JA, Leslie D, Porter JL, Seemann T, Denholm J, Stinear TP. 2015. Genome sequence comparisons of serial multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates over 21 years of infection in a single patient. *Microb Genom* 1:e000037. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000037>.
17. Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, Jasperse L, Pan X, Wanger A, Quitugua T, Graviss EA. 2003. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1241–1250. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1241-1250.2003>.
18. Ghiladi RA, Medzihradzsky KF, Rusnak FM, Ortiz de Montellano PR. 2005. Correlation between isoniazid resistance and superoxide reactivity in *Mycobacterium tuberculosis* KatG. *J Am Chem Soc* 127:13428–13442. <https://doi.org/10.1021/ja054366t>.
19. Mo L, Zhang W, Wang J, Weng XH, Chen S, Shao LY, Pang MY, Chen ZW. 2004. Three-dimensional model and molecular mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and isoniazid-resistant KatG mutants. *Microb Drug Resist* 10:269–279. <https://doi.org/10.1089/mdr.2004.10.269>.
20. Cade CE, Dlouhy AC, Medzihradzsky KF, Salas-Castillo SP, Ghiladi RA. 2010. Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG: catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. *Protein Sci* 19:458–474. <https://doi.org/10.1002/pro.324>.
21. Villela AD, Rodrigues VD, Pinto AF, Wink PL, Sánchez-Quintan ZA, Petersen GO, Campos MM, Basso LA, Santos DS. 2017. Characterisation of *inhH* gene knockout strain from *Mycobacterium tuberculosis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 112:203–208. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160462>.
22. Rodrigues-Junior VS, dos Santos Junior AA, Villela AD, Belardinelli JM, Morbidoni HR, Basso LA, Campos MM, Santos DS. 2014. IQG-607 abrogates the synthesis of mycolic acids and displays intracellular activity against *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages. *Int J Antimicrob Agents* 43:82–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.08.021>.
23. Vilchêze C, Wang F, Arai M, Hazbón MH, Colangeli R, Kremer L, Weisbrod TR, Alland D, Sacchetti JC, Jacobs WR. 2006. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat Med* 12:1027–1029. <https://doi.org/10.1038/nm1466>.
24. Basso LA, Schneider CZ, Anderson JAB, dos Santos AA, Jr, AA, Campos MM, Souto AA, Santos DS. 2010. An inorganic complex that inhibits *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase as a prototype of a new class of chemotherapeutic agents to treat tuberculosis. *J Braz Chem Soc* 21:1384–1389. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000700026>.
25. Hassan HM, Guo HL, Yousef BA, Luyong Z, Zhenzhou J. 2015. Hepatotoxicity mechanisms of isoniazid: a mini-review. *J Appl Toxicol* 35:1427–1432. <https://doi.org/10.1002/jat.3175>.
26. Reddy VM, Einck L, Andries K, Nacy CA. 2010. *In vitro* interactions between new antitubercular drug candidates SQ109 and TMC207. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2840–2846. <https://doi.org/10.1128/AAC.01601-09>.

Supplementary Material

Revisiting activation of and the mechanism of resistance to the compound IQG-607 in *Mycobacterium tuberculosis*

Bruno L. Abbadi,^{a,b} Anne D. Villela,^{a#} Valnês S. Rodrigues-Junior,^a Fernanda T. Subtil,^{a,b}
Pedro F. Dalberto,^{a,b} Ana P. S. Pinheiro,^{a,b} Diógenes S. Santos,^{a,c,†} Pablo Machado,^{a,c} Luiz A.
Basso,^{a,b} Cristiano V. Bizarro^{a,b#}

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

^bFaculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 12, 90619-900, Porto Alegre, Brazil.

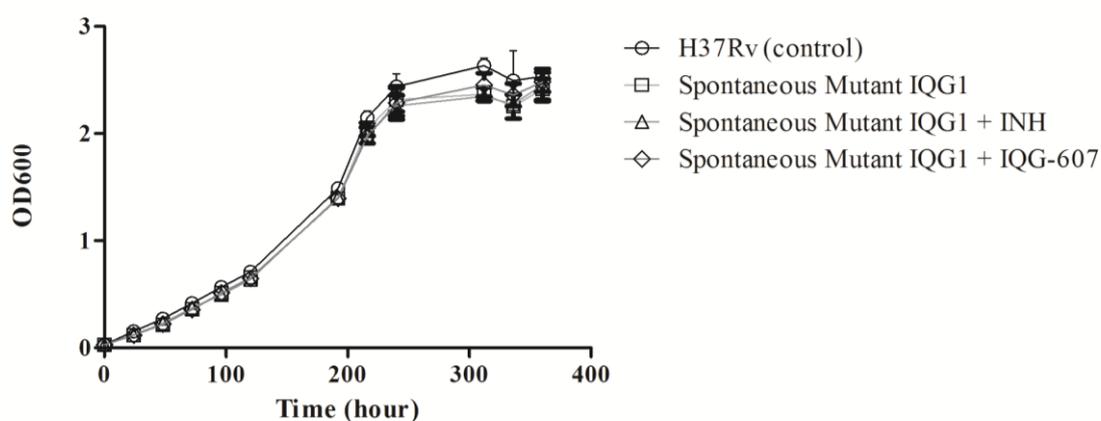
^cFaculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 12, 90619-900, Porto Alegre, Brazil.

†Deceased.

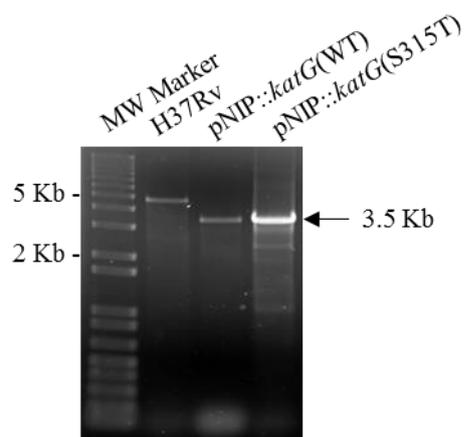
#Address Correspondence to Anne D. Villela, annevillela@gmail.com or Cristiano V. Bizarro, cristiano.bizarro@puers.br.

Contents:

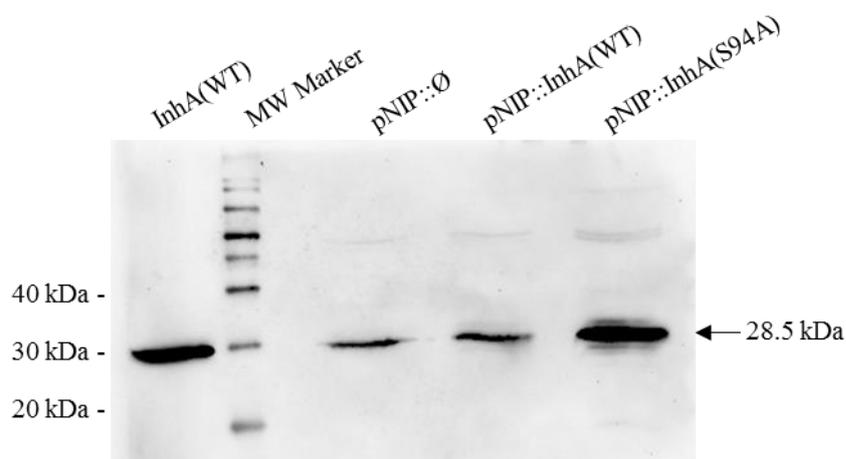
- Supplementary Fig. S1
- Supplementary Fig. S2
- Supplementary Fig. S3
- Supplementary Table S1
- Supplementary Table S2



Supplementary Fig. S1. Growth monitoring of the spontaneous mutant selected with IQG-607 (IQG1) in the absence (square) or in the presence of 16 mg/L of INH (triangle) or IQG-607 (diamond) over 15 days. H37Rv strain (circle) was used as a positive growth control of the experiment. The data were expressed as a mean value of triplicate optical density (OD₆₀₀) measurements. Two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test was employed to compare the growth of this mutant between the treatments.



Supplementary Fig. S2. Standard PCR confirming the disruption of the *katG* gene by the AES (allelic exchange substrate). The exchange of the WT *katG* by the AES, which contains the kanamycin gene resistance, reduces the original sequence size from 5.0 Kb to approximately 3.5 Kb. MW Marker = 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher).



Supplementary Fig. S3. Western Blot of cell extracts from *M. tuberculosis* strains overexpressing the InhA(WT) or InhA(S94A) enzymes. Each culture was grown until reach an OD₆₀₀ between 0.8 and 1.0. Protein extraction and Western Blot assay were performed as previously described (1). Each well was loaded with 0.5 µg of protein extracts. The purified WT InhA protein (0.5 µg) with 28.5 kDa was obtained as described elsewhere (2), and was used as a positive control of the experiment. MW Maker = MagicMark XP Standard (Thermo Fisher). There was an increase of 1.5- and 3.7-fold in the InhA(WT) and InhA(S94A) expression, respectively, when compared to the underlying levels of the wild-type enzyme (pNIP::Ø).

1. Villela AD, Rodrigues VD, Pinto AF, Wink PL, Sánchez-Quitian ZA, Petersen GO, Campos MM, Basso LA, Santos DS. 2017. Characterisation of iunH gene knockout strain from *Mycobacterium tuberculosis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 112:203–208.
2. Basso LA, Zheng R, Musser JM, Jacobs WR, Blanchard JS. 1998. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. J Infect Dis. 178:769-75.

Supplementary Table S1. Primers used in this study.

Name	Sequence	Purpose
KatG_F_SEQ	ATCGATGGGCTTCAAGACGT	Primers for <i>katG</i> sequencing
oligo_SEQ_R_001_katG	ATCAGCTTGTACCAGGCCTT	
SEQ_F_008_katG	GGAGGTCATCTACTGGGGTC	
SEQ_R_009_katG	ACGTAGATCAGCCCCATCTG	
SEQ_F_014_katG	CTGGAACACCCCGAGGAAT	
SEQ_R_015_katG	ATGTTCGAGCAGGTTACGAA	
PCR_R_013_KO_katG	AGACCAACCGTGTAGGCAA	
SEQ_F_002_Prom_fabG-inhA	CTCGATGACGCAGATCTCGT	Primers for <i>inhA</i> promoter sequencing
SEQ_R_003_Prom_fabG-inhA	GTCACATTCGACGCCAAACA	
SEQ_F_004_ORF_inhA	TGCGAGCTATATCTCCGGTG	Primers for <i>inhA</i> ORF sequencing
SEQ_R_005_ORF_inhA	CAGGACGGCATCAAATTGCA	
PCR_inhA_WT_F_006	tttcatatgATGACAGGACTGCTGGACG	Primers for WT <i>inhA</i> PCR
PCR_inhA_WT_R_007	tttaagcttctagaCTAGAGCAATTGGGTGTGCG	
t280g_sense_MUT_S94A	CGACGGGGTGGTGCATGCGATTGGGTTC	Primers for <i>inhA</i> site-directed mutagenesis
t280g_antisense_MUT_S94A	TGAACCCAATCGCATGCACCACCCGTCG	
K_katG_UF	ttttGAATTCTGGTGGTCGGCAAG	Primers for PCR of the up/downstream <i>katG</i> sequences
K_katG_UR	ttttgcatgCGGCCGTCCGGAGCTGTTC	
K_katG_DF	ttttgcatgcCCTGGGACAAGGTGATGAa	
K_katG_DR	ttttaagcttactagTGGGCTTGTTTCGATCCCCATA	
PCR_F_010_KO_katG	GGACTGTACGTGCACTGGAT	Primers for <i>katG</i> knockout confirmation
PCR_R_011_KO_katG	ATGTCAATCCCCACCGCATA	
C_katG_F	tttttctagaGGACTGGCTGGGACACAA	Primer for <i>furA+katG</i> operon PCR
C_katG_R	tttttctagaAAATCGCGCCGGGCAAAC	
MSD_katG_F	CGGTAAGGACGCGATCACCACCGGCATCGA G GTCGTATGG	Primers for <i>katG</i> site-directed mutagenesis
MSD_katG_R	CCATACGACCTCGATGCCGGTGGTATCGCG TCCTTACCG	

Supplementary Table S2. Evaluation of IQG-607 in combination with other drugs by the checkerboard assay.

Compound	Σ FIC ^a	Outcome ^b
Rifampicin	2	Indifferent
Ethambutol	1	Indifferent
Moxifloxacin	1	Indifferent
Streptomycin	1	Indifferent
Pyrazinamide	1	Indifferent
D-cycloserine	2	Indifferent

^aFractional inhibitory index (Σ FIC) were calculated based on the results from three independent experiments. ^b Σ FICs of ≤ 0.5 suggest synergy and ≥ 4.0 indicates antagonism; values between suggest that both drugs act independently (indifferent). The highest concentration for each compound was: 10 mg/L for streptomycin, ethambutol and IQG-607; 50 mg/L for D-cycloserine and pyrazinamide; 0.3 mg/L for rifampicin and moxifloxacin.

Capítulo 3

1.8 Identificação de novos inibidores da enzima InhA de *M. tuberculosis*

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

4.2 Objetivos Específicos

5 RESULTADOS PARCIAIS

1.8 Identificação de novos inibidores da enzima InhA de *M. tuberculosis*

Como discutido na seção 1.4 da introdução, a enzima InhA é um alvo bem estabelecido e bastante atrativo para se projetar novos candidatos a fármacos anti-TB. Pensando nisso, Pauli e colaboradores [66] propuseram um trabalho para identificar novos compostos que tivessem como alvo essa enzima, por meio de duas abordagens *in silico*. A primeira consistiu no desenvolvimento de um modelo farmacofórico tridimensional a partir de 36 estruturas cristalográficas da InhA disponíveis na Base de Dados de Proteínas (do inglês, *Protein Data Bank* – PDB), e posterior triagem virtual de diferentes estruturas químicas disponíveis em bibliotecas virtuais, para a identificação de moléculas capazes de se ligarem ao sítio de ligação do substrato enoil tioéster. Entende-se por farmacóforo “o conjunto de características eletrônicas e estéricas que é necessário para garantir as interações supramoleculares ótimas com uma estrutura-alvo biológica específica e para desencadear (ou bloquear) a sua resposta biológica” [78]. Esta abordagem resultou em 34 moléculas a partir de uma base de dados contendo 999.853 compostos [66].

A segunda abordagem consistiu na triagem virtual de compostos usando-se quatro programas de docagem molecular, cada uma empregando um algoritmo diferente para gerar conformações similares que potencialmente indicariam as interações mais favoráveis entre o ligante e a proteína [66]. Essa metodologia rendeu um conjunto de 21 moléculas, o que totalizou ao final 55 moléculas selecionadas por ambas abordagens. Este último conjunto foi posteriormente submetido a uma análise *in silico* de toxicidade, resultando em 19 potenciais inibidores da enzima InhA com um perfil toxicológico favorável [66]. Nesse trabalho, entretanto, apenas seis das 19 moléculas foram testadas *in vitro* frente à enzima purificada, sendo que três apresentaram uma modesta inibição (de 2,5 a 15%) [66]. Embora essas abordagens *in silico* tenham sido capazes de identificar compostos que interagissem com a enzima InhA e inibissem modestamente a sua atividade, estas três moléculas não apresentaram resultados satisfatórios o suficiente para que fossem consideradas compostos-líderes.

Martinelli e colaboradores [67] deram sequência a esses estudos ao conduzirem diferentes experimentos com 14 dos 19 potenciais inibidores da InhA. Destes, somente sete moléculas (Labio-2, Labio-3, Labio-6, Labio-11, Labio-15, Labio-16 e Labio-17) apresentaram valores satisfatórios de IC₅₀ (valor que indica a concentração de fármaco necessária para

alcançar metade do efeito máximo de um dado composto) na faixa de micromolar (de 13 a 87 μM) [67]. Ensaio de determinação da MIC frente à cepa laboratorial H37Rv, novamente com os 14 compostos, mostraram que apenas cinco (Labio-3, Labio-15, Labio-16, Labio-17 e Labio-20) foram capazes de inibir o crescimento da micobactéria. Destes, os compostos **Labio-16** (nome químico em inglês: *N*-(4-{5-[(2-methylphenoxy)methyl]-1,2,4-oxadiazol-3-yl}phenyl)thiophene-2-carboxamide) e **Labio-17** (de nome químico em inglês: *ethyl 2-methyl-4-[[4-(piperidin-1-yl)phenyl]amino]quinoline-6-carboxylate*) (**Figura 7**) obtiveram os menores valores de MIC - 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (6,38 μM) e 5 $\mu\text{g/ml}$ (12,8 μM), respectivamente – e foram posteriormente testados frente a um isolado clínico MDR de *M. tuberculosis* (PE-003). Curiosamente, como apontado pelos próprios pesquisadores, a MIC de ambos os compostos não aumentou frente ao isolado clínico como seria o esperado, visto que esta cepa possuía a mutação C(-15)T na região regulatória do gene *inhA*. Desta forma, especulou-se que a enzima InhA, talvez, não fosse de fato o alvo destes compostos, ou que eles poderiam ter múltiplos alvos dentro da célula [67]. Entretanto, mais estudos deveriam ser feitos para provar o alvo molecular destes compostos.

Uma vez que os compostos Labio-16 e Labio-17 apresentaram valores satisfatórios de IC_{50} e MIC, os mesmos foram testados frente a três linhagens celulares eucarióticas (Hacat, Vero e RAW 264.7) pelo ensaio empregando MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]). Os resultados frente a essas linhagens indicaram um perfil toxicológico favorável, pois, na concentração de 20 μM , nenhum dos dois compostos alterou de forma significativa a viabilidade das células [67]. O passo seguinte foi investigar a atividade intracelular em macrófagos murinos (RAW 264.7) infectados pela cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Os resultados desse experimento mostraram que ambos os compostos foram capazes de inibir o crescimento da micobactéria, porém o composto Labio-16 indicou ter uma atividade bacteriostática, enquanto que o composto Labio-17 apresentou uma atividade bactericida [67]. Por último, os pesquisadores realizaram experimentos de cardiotoxicidade, sobrevivência, incubação dos ovos e taxa de batimentos cardíacos em um modelo de Zebrafish, com o intuito de antecipar possíveis efeitos colaterais provenientes do uso destes compostos. O composto Labio-16 não indicou qualquer sinal cardiotóxico nos peixes, e também não prejudicou a saída dos embriões dos ovos. Entretanto, os pesquisadores observaram que o composto Labio-17 apresentou alguns sinais cardiotóxicos,

assim como uma menor taxa de sobrevivência dos animais e um atraso na saída dos embriões dos ovos nas concentrações mais elevadas [67].

Juntos esses resultados apontaram que ambos os compostos tinham o potencial de se tornarem *hit-compounds* para futuras modificações estruturais, com a finalidade de melhorar ainda mais a atividade biológica e, talvez, reduzir os efeitos colaterais observados para o composto Labio-17. Entretanto, algumas lacunas ainda haviam ficado em aberto em relação ao alvo dos dois compostos e ao MOR da micobactéria frente a ambos. Apesar de eles terem sido selecionados para interagir com o sítio ativo da enzima InhA, e de os resultados de inibição *in vitro* frente à enzima purificada terem corroborado esta hipótese, a ausência de resistência observada pelo isolado clínico, que tinha a expressão desta enzima aumentada, frente aos dois compostos, sugeriu que o alvo intracelular poderia não ser a InhA. Diante deste cenário, nós conduzimos uma série de experimentos que pudessem esclarecer o MOR do *M. tuberculosis* frente aos compostos Labio-16 e Labio-17, de maneira semelhante àqueles mostrados no capítulo 2 para o composto IQG-607, e também que pudessem provar que de fato o alvo intracelular é a enzima InhA.

Assim como para o composto IQG-607, nós primeiramente testamos os compostos Labio-16 e Labio-17 frente a oito isolados MDR, que apresentavam diferentes MORs aos principais fármacos anti-TB. Em seguida, avaliamos a atividade destes compostos frente à cepa laboratorial resistente à INH, que carregava a mutação S315T na enzima KatG, com o intuito de verificar se haveria alguma semelhança do MOA desses dois compostos com aquele descrito para a INH. Para provar o alvo molecular dos compostos Labio-16 e 17, nós primeiramente testamos a ação de ambos frente à cepa resistente à INH que expressa a enzima InhA(S94A), e posteriormente conduzimos um experimento para avaliar o efeito dessas moléculas na via de biossíntese dos ácidos micólicos.

Os resultados obtidos até o momento mostraram que os compostos foram capazes de inibir com sucesso o crescimento de todos os isolados clínicos MDR, sugerindo que eles apresentam um MOA diferente dos compostos anti-TB usados como controles do ensaio (INH, ETH, RIF e MFX) e que ambos são capazes de contornar os principais MORs da micobactéria encontrados na população. Os compostos também foram ativos frente à cepa com a mutação no gene *katG*, indicando que eles de fato apresentam um MOA diferente da INH, uma vez que não dependem desta enzima para exercerem suas atividades biológicas. Em relação à investigação do alvo molecular, ao contrário do que se pensava, foi possível

estabelecer que a enzima InhA não é o alvo intracelular destes dois compostos. A ausência de resistência observada na cepa que expressa a enzima InhA(S94A) mutante, aliada à incapacidade de inibir a biossíntese dos ácidos micólicos, são fortes indícios de que o MOA de ambos os compostos não culmina na inibição da enzima InhA.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Elucidar o mecanismo de resistência da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* frente aos compostos Labio-16 e Labio-17 e determinar o alvo molecular por meio de estudos genéticos.

4.2 Objetivos Específicos

- I. Selecionar mutantes espontâneos para os compostos Labio-16/17 e determinar a mutação por sequenciamento genômico total e por sequenciamento direcionado de DNA.
- II. Avaliar a atividade dos compostos frente a isolados clínicos multirresistentes e a cepas laboratoriais resistentes à INH.
- IV. Testar a capacidade dos compostos em inibir a biossíntese dos ácidos micólicos pela técnica de radiomarcagem com ^{14}C e separação por cromatografia em camada delgada.
- V. Investigar a interação dos compostos com outros fármacos anti-TB pelo ensaio de *checkerboard*.
- VI. Determinar a cinética de morte para ambos os compostos por meio de curvas de morte.
- VII. Testar a ação dos compostos em um modelo murino de infecção de TB.

5 METODOLOGIA

5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) frente aos isolados clínicos MDR e às cepas laboratoriais resistentes à INH

A determinação da MIC para os compostos Labio-16 e Labio-17 em diferentes cepas de *M. tuberculosis* foi realizada de acordo com um protocolo já publicado anteriormente [79]. Brevemente, ambos os compostos foram primeiramente solubilizados em DMSO puro a uma concentração de 1 mg/ml e diluídos em meio líquido Middlebrook 7H9 para as concentrações de 10 (Labio-16) e 20 µg/ml (Labio-17), mantendo a concentração de DMSO em 5%. Os compostos foram diluídos seriadamente em placas de poliestireno de 96 poços com fundo em U para atingir uma faixa de concentração entre 5-0,01 µg/ml (Labio-16) ou 10-0,02 µg/ml (Labio-17). As suspensões micobacterianas foram descongeladas e diluídas em meio 7H9 para uma densidade óptica (OD_{600nm}) teórica de 0,006 ($\approx 1,5 \times 10^6$ CFU/ml), e 100 µL dessa diluição foram adicionados em cada poço. As placas foram incubadas por sete dias a 37°C em estufa e, após esse período, foi adicionado 60 µL de uma solução de resazurina (0,01% em água ultrapura) estéril em cada poço. Os resultados do experimento foram analisados após 48 horas de incubação na estufa. Os valores de MIC foram obtidos a partir do teste de redução da **resazurina**, a qual é usada como um indicador de crescimento celular, e foram considerados como a menor concentração de composto que preveniu a alteração da coloração de azul (resazurina) para rosa (resorufina) pela leitura visual [80]. O valor reportado foi observado em dois experimentos independentes ou foi o maior valor observado entre três experimentos independentes. Os fármacos INH (ACROS Organics), RIF, EMB e MFX (Sigma-Aldrich) foram usados como controles do experimento. A ação dos dois compostos foi testada contra oito isolados clínicos MDR-TB (denominados CDCT-1, 2, 3, 4, 5, 10, 16 e 27) e um pan-suscetível (CDCT-28), e também contra duas cepas laboratoriais resistentes à INH [pNIP::KatG(S315T) e pNIP::InhA(S94A)] [Tabela 1]. Todos os experimentos que envolveram a manipulação do *M. tuberculosis* ocorreram em uma sala de biossegurança nível 3 (NB3), seguindo-se todas as práticas de segurança adequadas.

5.2 Teste de inibição da biossíntese dos ácidos micólicos

O efeito dos compostos Labio-16/17 sobre a biossíntese dos ácidos micólicos foi analisado separadamente através da radiomarcagem, extração e análise dos lipídios das células de *M. tuberculosis* tratadas com cada molécula, de acordo com um protocolo já publicado [73]. Brevemente, uma cultura de *M. tuberculosis* H37Rv no meio da fase logarítmica foi alíquotada (5 ml) e tratada por 18 h com INH (1 µg/ml ou 7 µM; controle positivo de tratamento), Labio-16 (10 e 25 µg/ml ou 25,5 e 63,9 µM, respectivamente) ou Labio-17 (10 e 25 µg/ml ou 25,7 e 64,2 µM, respectivamente). Uma alíquota da cultura não recebeu tratamento (controle positivo de crescimento). Após esse tratamento, uma solução de ácido acético 1-¹⁴C] (0,5 µCi/ml) foi adicionada, e a cultura permaneceu incubada por mais 24 h. As células com os lipídios radiomarcados foram coletadas por centrifugação e os ácidos graxos (éster metílico de ácidos graxos - FAMES) e os ácidos micólicos (éster metílico de ácidos micólicos – MAMES) foram extraídos e separados através de cromatografia em camada delgada (TLC – Sigma Aldrich). Os lipídios radiomarcados foram expostos em filmes de raio-X por 24 h. Esse experimento foi conduzido na *Catedra de Microbiología, Virología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario - Argentina*, em colaboração com o professor Héctor R. Morbidoni.

5.3 Avaliação do efeito combinado entre os compostos Labio-16/17 com outros fármacos anti-TB

O efeito combinado entre os compostos Labio-16/17 com outros fármacos anti-TB (INH, RIF, EMB e MFX) foi determinado pelo ensaio de *checkerboard* em um esquema de associação entre dois compostos, combinado com o método colorimétrico de redução da resazurina como um indicador de crescimento [79]. Brevemente, ambos os compostos foram solubilizados em DMSO nas concentrações de 1 mg/ml (INH, RIF, EMB, MFX e Labio-16) ou de 2 mg/ml (Labio-17). Em seguida, os compostos foram diluídos em meio 7H9 líquido para atingir uma faixa de concentração de 10-0,039 µg/ml para a INH, o EMB e o Labio-16; de 0,3-0,001 µg/ml para a RIF e o MFX; e de 20-0,078 µg/ml para o Labio-17. Os fármacos anti-TB de referência foram diluídos horizontalmente (colunas 2 a 10) nas placas de 96 poços, enquanto que os compostos-teste foram diluídos verticalmente (linhas B a H). O

inóculo da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, as condições de incubação das placas e a leitura dos resultados foram realizados da mesma forma como descrito para a determinação da MIC (acima). Os valores de FICI (do inglês *fractional inhibitory concentration index*) abaixo de 0,5 indicam um efeito sinérgico entre os compostos; entre 0,5 e 4,0 indicam um efeito indiferente, ou seja, os compostos não influenciam um ao outro; e acima de 4,0 sugerem um efeito antagônico. Três experimentos independentes foram realizados.

5.4 Cinética de morte do *M. tuberculosis* H37Rv frente aos compostos Labio-16/17

Para determinar a cinética de morte e a concentração bactericida mínima (do inglês *minimum bactericidal concentration* - MBC) frente aos compostos Labio-16/17, realizou-se uma curva de morte da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv na presença de cada composto baseada em um protocolo reportado por Early e Alling [81]. Diferentes soluções de Labio-16 e de Labio-17 foram preparadas em DMSO para obter-se uma concentração de 50 vezes as concentrações finais desejadas na cultura. Adicionou-se 100 µL de cada solução (ou DMSO puro para o controle negativo) em 5 ml de meio 7H9 (10% de OADC, 0,05% de Tween-80) para atingir as diferentes concentrações finais de Labio-16 (0,25; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; e 25 µg/ml) e Labio-17 (0,5; 1,25; 2,5; 5,0; 10; 20; e 50 µg/ml), e a concentração final de DMSO foi ajustada para 2,5%. Cada tratamento foi realizado em duplicata. Uma cultura de *M. tuberculosis* na fase logarítmica ($OD_{600nm} = 0,6 - 1,0$) de crescimento foi diluída em meio 7H9 para atingir uma densidade de células de 5×10^7 CFUs/ml e 50 µL dessa diluição foram adicionados em cada falcon contendo os 5 ml de meio de cultivo, juntamente com as diferentes concentrações dos compostos. As culturas foram incubadas a 37°C sob agitação (80 rpm) por 21 dias. As CFUs foram determinadas para cada tubo, nos dias 0, 3, 7, 14 e 21, pela semeadura de 50 µL de diluições seriadas da cultura em solução de NaCl 0,9% estéril em placas com ágar 7H10 (10% de OADC + 0,2% de glicerina). As placas foram incubadas a 37°C por três semanas. Um gráfico de log CFU/ml pelo tempo foi elaborado para cada cultura e a MBC foi considerada como a menor concentração de composto que resultou na morte de 3 log₁₀ do *M. tuberculosis* em até 21 dias.

5.5 Modelo de infecção pelo *M. tuberculosis* em camundongos

Os experimentos de infecção foram realizados no Laboratório de Testes Pré-clínicos, localizado no próprio CPBMF. Os protocolos usados nos experimentos *in vivo* foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS (Número 7348/2016 – **ANEXO H**). Quinze camundongos CF1 machos (pesando de 24 a 28 gramas) foram anestesiados e, em seguida, infectados pela via endovenosa, de acordo com técnicas previamente validadas e descritas pelo nosso grupo de pesquisa [72,82]. Após a infecção, os camundongos foram divididos aleatoriamente em três grupos contendo cinco animais para cada grupo experimental. O tratamento foi iniciado sete dias após a infecção e os compostos foram administrados durante quatro semanas. O grupo controle positivo do tratamento recebeu INH 25 mg/kg. O grupo teste recebeu Labio-17 25 mg/kg (na suspensão contendo etanol 5% em NaCl 0,9%) pela via intraperitoneal. O terceiro grupo recebeu apenas injeção intraperitoneal, contendo o veículo (etanol 5% em NaCl a 0,9%), durante todo o período do tratamento. Os camundongos foram eutanasiados pela inalação de sevoflurano, três dias após a última administração dos tratamentos. Os baços e os pulmões esquerdos foram removidos assepticamente, e os baços tiveram seus pesos determinados. A seguir, os pulmões e os baços foram homogeneizados separadamente, em um homogeneizador contendo solução de NaCl a 0,9% estéril. O número de micro-organismos viáveis foi determinado após a semeadura dos homogeneizados em placas contendo ágar Middlebrook 7H10 com 10% de OADC. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante três semanas, antes da contagem das células de *M. tuberculosis*.

5.6 Seleção de mutantes espontâneos para os compostos Labio-16 e Labio-17

Para isolar mutantes espontâneos dos compostos Labio-16/17, o *M. tuberculosis* foi cultivado para que $\approx 10^8$ CFUs ($OD_{600nm} \approx 1,0$) fossem semeadas em placas de ágar 7H10, na presença de diferentes concentrações de cada um dos compostos acima dos seus valores de MIC (2, 4, 6, 8, 10 e 20x). As placas foram seladas com *parafilm* e incubadas a 37°C por até três meses. A determinação do inóculo bacteriano foi feita através da semeadura de diferentes diluições seriadas em 7H10 sem antibióticos.

6 RESULTADOS PARCIAIS

6.1 Os compostos Labio-16/17 são ativos frente a isolados clínicos MDR e a cepas laboratoriais resistentes à INH

Os valores de MIC para cada cepa de *M. tuberculosis* testada foram agrupados na **Tabela 1**. Como se pode notar, nenhum isolado clínico MDR apresentou elevação nos valores de MIC para os compostos Labio-16 e Labio-17, quando comparados aos valores determinados na cepa de referência (H37Rv), indicando que esses isolados não apresentam um MOR que contorne o MOA destas moléculas. Curiosamente, os isolados CDCT-2 e CDCT-16, que possuem a mutação C(-15)T no promotor do gene *inhA*, foram sensíveis a ambos os compostos, sugerindo que o alvo molecular dessas moléculas não seja a enzima InhA. Corroborando esse dado, a cepa laboratorial que expressa a enzima InhA(S94A) mutante, a qual apresenta uma elevada resistência à INH e à ETH (MIC = 25 e >100 µg/ml, respectivamente), também se mostrou sensível aos compostos Labio-16/17, novamente sugerindo que essa enzima não seja o alvo molecular. Além disso, a cepa laboratorial que possui a mutação S315T na enzima KatG, que é resistente à INH (MIC > 100 µg/ml), não alterou os valores de MIC para ambos os compostos, o que indica que o MOA destas moléculas independe da ativação por essa enzima. Juntos esses resultados indicam que os compostos Labio-16 e Labio-17 apresentam uma atividade promissora frente a isolados clínicos MDR, e que provavelmente possuam um MOA diferente dos fármacos anti-TB de referência que foram usados nos ensaios. Além disso, a ausência de resistência pelas mutações C(-15)T, na região promotora, e S94A, na região codificadora do gene *inhA*, sugerem fortemente que essa enzima não é o alvo molecular desses dois compostos, como havia sido proposto em experimentos anteriores.

Tabela 1. Atividade dos compostos Labio-16 e Labio-17 contra isolados clínicos e cepas laboratoriais de *M. tuberculosis*.

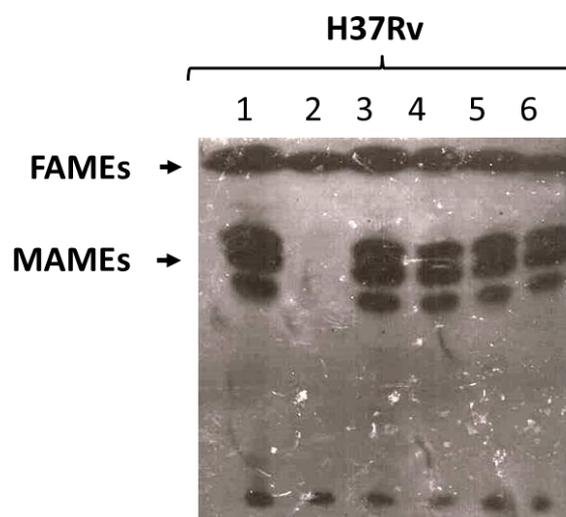
Cepas ^b	Mutação <i>katG</i>	Genótipo promotor <i>inhA</i>	Mutação <i>rpoB</i>	MIC (µg/ml) ^a					
				INH ^c	ETH	RIF	MFX	LABIO-16	LABIO-17
H37Rv	WT	WT	WT	0.39	3.13	<0.2	<0.2	2.5	5
CDCT-1	S315T	WT	H526D	12.5	3.13	>100	<0.2	2.5	5
CDCT-2	S315T	C(-15)T	H526D	100	6.25	>100	<0.2	1.25	2.5
CDCT-3	S315T	WT	D516V	25	3.13	6.25	<0.2	0.63	2.5
CDCT-4	S315T	WT	S531L	>100	>100	>100	<0.2	2.5	5
CDCT-5	S315T	WT	D516V	50	>100	>100	<0.2	1.25	1.25
CDCT-10	S315T	WT	H526D	100	1.56	>100	<0.2	1.25	2.5
CDCT-16	S315T	C(-15)T	D516V	100	>100	>100	<0.2	1.25	2.5
CDCT-27	S315T	WT	WT	12.5	3.13	<0.2	<0.2	2.5	5
CDCT-28	WT	WT	D516A	0.39	3.13	<0.2	<0.2	2.5	5
pNIP::KatG(WT)	WT	WT	WT	<0.2	3.13	-	<0.2	1.25	3.13
pNIP::KatG(S315T)	G(944)C ^d	WT	WT	>100	0.78	-	<0.2	1.25	5
pNIP::∅	WT	WT	WT	0.39	6.25	-	<0.2	2.5	6.25
pNIP::InhA(WT)	WT	WT	WT	0.39	6.25	-	<0.2	2.5	6.25
pNIP::InhA(S94A)	WT	WT	T(280)G ^e	25	>100	-	<0.2	2.5	6.25

^aOs valores de MIC reportados foram observados em dois experimentos independentes ou foram os maiores valores observados entre três experimentos independentes. ^bIdentificação do isolado clínico ou da cepa laboratorial. ^cINH, isoniazida; ETH, etionamida; RIF, rifampicina; MFX, moxifloxacino. ^dEsta mutação altera o resíduo de serina no códon 315 por uma treonina (S315T). ^eEsta cepa ainda expressa os níveis basais do gene *inhA* selvagem, mas carrega o gene *inhA* mutante [T(280)G] clonado no plasmídeo integrativo pNIP40/b. Essa mutação altera o resíduo de serina no códon 94 por uma alanina (S94A).

6.2 Os compostos Labio-16/17 não agem sobre a via de biossíntese dos ácidos micólicos

O tratamento de uma cultura de *M. tuberculosis* com os compostos Labio-16/17, e posterior análise da incorporação do ¹⁴C, presente no precursor acetato, nos ácidos micólicos, indicou claramente que nenhuma das duas moléculas agiu sobre a biossíntese destes lipídios (**Figura 12**). Isso porque a abundância dos lipídios extraídos (FAMES ou MAMES) não foi reduzida em nenhuma das duas concentrações testadas para os dois compostos, diferentemente do que foi observado para o controle positivo (INH) (**Figura 12**). Sendo assim, esse resultado sugere fortemente que o alvo molecular desses dois compostos não é a enzima InhA, e que os seus MOAs não envolvem o bloqueio da biossíntese dos ácidos micólicos.

Figura 12. Efeito do tratamento dos compostos Labio-16/17 sobre a biossíntese dos ácidos micólicos em *M. tuberculosis*.



Fonte: próprio autor.

Legendas: (1) amostra não tratada. (2) amostra tratada com INH (1 µg/ml). (3,4) amostras tratadas com Labio-16 (10 e 25 µg/ml, respectivamente). (5,6) amostras tratadas com Labio-17 (10 e 25 µg/ml, respectivamente). **FAMES:** ésteres metílicos de ácidos graxos. **MAMEs:** ésteres metílicos de ácidos micólicos.

Nota: na coluna 2 pode-se notar a ausência dos MAMEs na cultura que recebeu o tratamento com a INH, uma vez que esse fármaco inibe a biossíntese desses lipídeos. Esta é uma figura representativa de dois experimentos independentes.

6.3 Os compostos Labio-16/17 não interferem na ação de outros fármacos anti-TB

Com o intuito de fazer uma primeira investigação da ação combinada dos compostos Labio-16/17 com outros fármacos anti-TB, um ensaio de *checkerboard* foi realizado em um esquema de associação de dois fármacos. Como se pode observar na **Tabela 2**, ambos os compostos agiram de forma indiferente na presença de cada um dos quatro fármacos anti-TB testados (INH, RIF, ETH e MFX). Nenhum efeito sinérgico ou antagônico foi observado neste experimento.

Tabela 2. Avaliação dos compostos Labio-16/17 em combinação com outros fármacos anti-TB pelo ensaio de *checkerboard*.

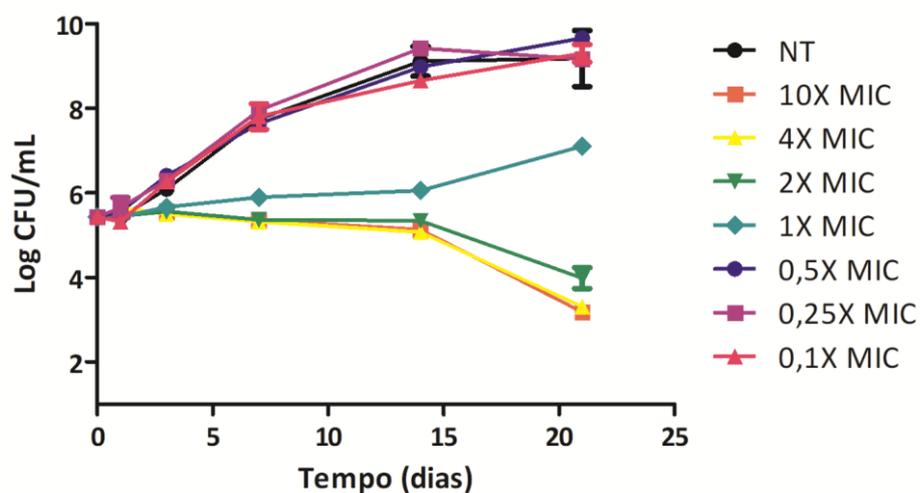
Composto	FICI ^a LABIO-16	FICI LABIO-17	Resultado ^b
Isoniazida	2	2	Indiferente
Rifampicina	2	1	Indiferente
Etambutol	1	2	Indiferente
Moxifloxacino	1	2	Indiferente

^aO índice da concentração inibitória fracional (FICI) foi calculado com base nos resultados de dois experimentos independentes. ^bOs valores de FICIs igual ou abaixo de 0,5 sugerem um efeito sinérgico; acima de 4,0 indicam um efeito antagônico; e entre estes dois valores sugerem que ambos os compostos agem independentemente (indiferente).

6.4 O composto Labio-17 exerce um efeito bacteriostático sobre o *M. tuberculosis*

Para verificar a cinética de morte de uma cultura de *M. tuberculosis* frente aos compostos Labio-16/17, uma curva de morte foi realizada separadamente para cada composto, testando-se diferentes concentrações em relação ao valor de MIC. A **Figura 13** apresenta um gráfico em escala logarítmica do número de células viáveis por mililitro (log CFUs/ml) pelo tempo (dias), que representa a cinética de morte da cultura na presença do composto Labio-17. De acordo com o gráfico, pode-se notar que, nas concentrações de 1, 2, 4 e 10x o valor do MIC (5, 10, 20 e 50 µg/ml, respectivamente), o composto Labio-17 apresentou uma atividade bacteriostática no período de 14 dias de tratamento, pois manteve estável o número de células viáveis na cultura (entre 5 e 6 log CFU/ml). Por outro lado, os tratamentos com as concentrações abaixo do MIC (0,5, 0,25 e 0,1x) e o grupo não tratado (NT) não foram capazes de impedir o crescimento micobacteriano e atingiram valores acima de 8 log CFU/ml em 14 dias. Apesar de ter sido observada uma tendência de redução das CFUs entre 14 e 21 dias para os tratamentos com 2, 4 e 10x o MIC, a diferença não foi grande o suficiente para indicar um efeito bactericida desse composto sobre a cultura micobacteriana (redução esperada acima de 3 log₁₀). Os experimentos para avaliar a cinética de morte na presença do composto Labio-16 ainda se encontram em andamento no nosso laboratório e, portanto, os resultados não estarão presentes nesta tese.

Figura 13. Cinética de morte de uma cultura de *M. tuberculosis* na presença do composto Labio-17.



Fonte: próprio autor.

Legenda: (NT) grupo não tratado. (0,1x a 10x MIC) tratamentos com diferentes concentrações do composto Labio-17 relativos ao seu valor de MIC (5 µg/ml). As barras de erro indicam o erro padrão da média de duplicatas para cada ponto.

Capítulo 4

7 DISCUSSÃO GERAL

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 DISCUSSÃO GERAL

A estratégia mais recente lançada pela OMS para combater o avanço da TB no mundo leva o nome de “*End TB Strategy*”, que tem como princípios reduzir em 90% o número de mortes pela TB e em 80% a incidência (novos casos a cada ano) da doença até 2030, comparando-se aos valores estimados no ano de 2015 [2]. O cenário atual, porém, é ainda de uma doença bastante severa e prevalente na população. O combate à doença ocorre por diferentes abordagens, que incluem o diagnóstico precoce associado ao tratamento apropriado; a notificação de novos casos e do número de óbitos, para a identificação das regiões com alta carga de TB; a distribuição do tratamento preventivo nas regiões com alta taxa de incidência da doença e com um número elevado de pessoas convivendo com o HIV; o financiamento de novas formas de tratamento, de prevenção e de diagnóstico; entre outras. Em se tratando de novas formas de tratamento e prevenção, no presente momento, existem 17 fármacos em fase de testes clínicos e 12 candidatos a vacinas em testes de Fase I, II e III [2]. O desafio de erradicar a doença é imenso, mas as perspectivas para as próximas décadas são positivas.

Um dos fatores que contribuem para a prevalência da TB no mundo é o estabelecimento de cepas na população humana que apresentam resistência aos principais medicamentos usados no tratamento da doença. Isso porque essas variantes resistentes reduzem as chances de cura pelo paciente, aumentam o seu tempo de tratamento e necessitam de fármacos complementares de segunda linha para serem eliminadas. Sendo assim, torna-se clara a necessidade de encontrar novos compostos que possuam MOA distintos daqueles já disponíveis para o tratamento, com o intuito de contornar os principais MORs desenvolvidos pela micobactéria.

Seguindo esta linha de pensamento, o nosso grupo de pesquisa vem, desde o início dos anos 2000, trabalhando com a possibilidade de desenvolver um composto que fosse capaz de contornar o MOR mais prevalente nos isolados clínicos de *M. tuberculosis*: a mutação no gene *katG*, que causa a troca de um resíduo de serina por uma treonina no códon 315, e que leva à resistência ao fármaco INH. Considerando que a INH requer uma etapa de oxidação pela enzima KatG para tornar-se ativa dentro da micobactéria, os pesquisadores sintetizaram um complexo metálico análogo à INH, que possuía na sua estrutura um radical pentacianoferrato(II), denominado IQG-607. A hipótese inicial era de

que a presença deste grupamento metálico mimetizaria o processo oxidativo conduzido pela enzima KatG, ao permitir uma transferência intramolecular de elétrons que levaria à oxidação da porção INH da molécula. Curiosamente, os estudos de inibição *in vitro*, usando a enzima InhA purificada, mostraram que o composto, na realidade, era capaz de interagir diretamente com o sítio ativo da enzima, sem precisar ser ativado pela KatG ou formar um aduto com a molécula de NADH [65]. Esse resultado, porém, não provou a hipótese de autoativação do composto, visto que a inibição ocorreu na ausência de oxidantes biológicos, como o H_2O_2 e o ânion O_2^- , que seriam essenciais para o processo de transferência intramolecular de elétrons. De qualquer maneira, o grupo havia identificado um composto capaz de inibir diretamente a atividade da enzima InhA, um feito notável que justificava a continuidade dos estudos com o IQG-607. Porém, nenhum dos estudos seguintes se propôs a avaliar a atividade do IQG-607 frente a cepas de *M. tuberculosis* que carregassem o gene *katG* mutado, de forma que fosse possível consolidar o composto como uma alternativa da INH nos casos de resistência. Sendo assim, pensamos que era essencial preencher esta lacuna propondo um estudo que testasse justamente a atividade do IQG-607 contra cepas resistentes à INH. Esse trabalho foi apresentado no **Capítulo 2** desta tese.

Em nosso primeiro objetivo, testamos o composto contra diferentes isolados clínicos que carregavam a mutação S315T no gene *katG*. Para a nossa surpresa, esses isolados mostraram-se resistentes ao nosso composto, o que indicaria uma necessidade da etapa de ativação realizada pela enzima KatG e que o composto se comportava como um pró-fármaco, assim como a INH. No entanto, para que pudéssemos provar que a KatG era indispensável para a atividade do IQG-607, nós realizamos um experimento capaz de distinguir entre compostos que precisassem ser ativados por alguma enzima intracelular (pró-fármacos) daqueles que agissem diretamente sobre seus alvos. A seleção de mutantes espontâneos, usando o IQG-607 como uma pressão seletiva, indicou claramente que o composto comportava-se como um pró-fármaco, uma vez que todas as colônias que apresentaram resistência carregavam mutações no gene da proteína ativadora KatG.

Apesar de que as evidências tivessem apontado para a necessidade da ativação pela KatG, nós ainda optamos por avaliar o efeito da mutação S315T nessa enzima sobre a atividade do IQG-607 dentro da célula. Para isso, desenvolvemos uma cepa de *M. tuberculosis*, na qual o gene *katG* selvagem foi deletado, e uma cópia do gene mutante foi fornecida à bactéria. De fato, os ensaios de determinação da MIC com essa cepa provaram

que essa mutação em específico era suficiente para causar resistência ao IQG-607, da mesma forma que é observado para o fármaco INH. Porém, de acordo com a hipótese de autoativação, para que o complexo metálico pudesse ativar a porção INH da molécula, seria necessária a presença de oxidantes biológicos que se encontram dentro da célula do hospedeiro [70]. Sendo assim, nós infectamos macrófagos murinos com a cepa mutante para o gene *katG*, e verificamos que o tratamento com o IQG-607 não foi capaz de reduzir a carga micobacteriana intracelular. Juntos, esses resultados provaram a necessidade da enzima KatG para que o composto IQG-607 exercesse a sua atividade biológica dentro da célula e, infelizmente, comprometeram o seu uso como uma alternativa ao fármaco INH nos casos de resistência.

Por fim, nós também havíamos estabelecido como objetivo provar o alvo molecular do IQG-607 como sendo a enzima InhA de *M. tuberculosis*. Para isso, nós utilizamos uma abordagem semelhante àquela que foi usada para provar o alvo do fármaco INH [38]: expressar uma variante mutada da enzima InhA(S94A), conhecida por reduzir a ligação do aduto ao sítio ativo da enzima. Assim como observado para a INH, a expressão dessa variante tornou a cepa resistente ao IQG-607. Esse resultado comprovou o alvo molecular do composto, porém, novamente contestou os ensaios de inibição *in vitro* que haviam mostrado a interação direta do IQG-607 com essa mesma enzima mutante. Os próximos passos em relação a esse trabalho consistem na identificação do aduto hipotético, que seria formado pelo IQG-607 com o NADH após a etapa de ativação pela KatG, e provar que o composto é de fato um substrato para essa enzima.

Esse estudo, entretanto, não encerrou a possibilidade de que o composto venha a se tornar um fármaco anti-TB. Isso porque o IQG-607 mostrou causar uma menor toxicidade, em relação à INH, nos camundongos em dois estudos preliminares, mesmo quando administrado em doses elevadas [72,74]. Em um experimento para avaliar a toxicidade oral aguda nos murinos, por exemplo, foi verificado que, nas doses de 250 e 500 mg/kg de animal, o IQG-607 não causou mortalidade entre os animais ou qualquer sinal severo de toxicidade ao longo de 15 dias, enquanto que o fármaco-controle (INH), na dose de 250 mg/kg, levou 80% dos animais a óbito [74]. Desta forma, até o momento, o composto mostrou ter um perfil toxicológico mais favorável do que o observado para a INH. Porém, ainda será necessário realizar um estudo comparativo entre os dois compostos para confirmar esse dado.

Por outro lado, no **Capítulo 3**, nós apresentamos dois novos compostos, denominados Labio-16 e Labio-17, que se mostraram ativos contra isolados clínicos MDR e cepas laboratoriais resistentes à INH. As abordagens para compreender o MOR do *M. tuberculosis* frente a esses compostos e para elucidar o alvo molecular foram bastante semelhantes às aquelas usadas para estudar o composto IQG-607. Curiosamente, os resultados em relação ao alvo molecular indicaram que nenhum dos dois compostos parece agir sobre a enzima InhA, embora ambos tivessem sido previamente selecionados *in silico* para interagir com o sítio ativo desta enzima. A cepa que expressava a versão mutante da InhA(S94A) mostrou-se sensível aos compostos Labio-16/17, diferentemente do que ocorreu com o composto IQG-607. Este resultado indica fortemente que essa enzima, portanto, não é o alvo molecular destes compostos. Entretanto, ainda seria possível argumentar que o resíduo de serina no códon 94, de certa forma, não seria essencial para a interação e estabilização do composto com o sítio ativo da enzima; sendo assim, os compostos ainda seriam capazes de inibir a atividade da InhA mesmo com a substituição pelo resíduo de alanina. Para corroborar esse resultado, nós testamos a capacidade dessas moléculas em inibir a síntese dos ácidos micólicos em *M. tuberculosis*. De fato, nenhum dos dois compostos impediu a síntese desses lipídios, novamente indicando que o alvo molecular não é a enzima InhA, ou qualquer uma das enzimas envolvidas na biossíntese dos ácidos micólicos. Esta discrepância observada entre os resultados *in silico* e *in vitro*, entretanto, ainda precisa ser mais bem avaliada.

Com o intuito de determinar o alvo molecular desses compostos, nós realizamos um experimento de seleção de mutantes espontâneos da mesma maneira que foi conduzido para o composto IQG-607. Entretanto, até o momento não foi possível isolar colônias resistentes a nenhum dos dois compostos, mesmo inoculando-se quantidades bastante elevadas de células em cada placa ($\approx 10^8$ CFUs / placa). Esta dificuldade em isolar mutantes espontâneos, porém, já foi relatada na literatura científica para outros compostos [26]. Duas hipóteses foram levantadas para tentar compreender a ausência desses mutantes. A primeira é a de que a frequência de mutação no gene-alvo de cada um desses compostos é extremamente baixa e, portanto, seria necessário inocular uma cultura com densidades superiores às testadas para isolar os mutantes. A segunda é a de que múltiplos genes estariam envolvidos na resistência a esses compostos, e assim, a frequência de mutantes seria ainda mais baixa [83]. Para tentar contornar este problema, nos próximos

experimentos nós adicionaremos um composto mutagênico, chamado de metanosulfonato de etila (EMS) [84], que é capaz de aumentar a taxa de mutação no DNA, isso antes de submeter as micobactérias à seleção com os compostos Labio-16/17.

Em relação à cinética de morte, foi possível estabelecer que o Labio-17 apresenta um perfil bacteriostático, uma vez que manteve a densidade da cultura estável ao longo de 14 dias. Esse resultado também é bastante curioso, visto que um experimento anterior, que avaliou a atividade intracelular em macrófagos murinos infectados pelo *M. tuberculosis*, havia sugerido um perfil bactericida [67]. Esta discrepância entre esses resultados ainda não está esclarecida. Contudo, pensamos que os resultados provenientes do experimento de infecção em camundongos, que no momento encontram-se na etapa de crescimento das CFUs, resolverá esta divergência. Os experimentos para o composto Labio-16 estão em andamento. A investigação da cinética de morte encontra-se na etapa de crescimento das CFUs, desta forma os resultados ainda não estão disponíveis para divulgação. Os testes *in vivo*, porém, ainda não foram iniciados devido à carência do composto Labio-16 nas empresas fornecedoras. Nossa expectativa é de que ambos os compostos possam ser futuramente sintetizados no laboratório de síntese química do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional da PUCRS (CPBMF).

A análise da combinação dos compostos Labio-16/17 com outros fármacos anti-TB (INH, RIF, EMB e MFX) mostrou que nenhum dos dois compostos interfere na ação dos demais, o que é considerado positivo, visto que a terapia anti-TB é feita de forma combinada entre diferentes fármacos. Esse experimento, entretanto, é preliminar e requer precaução na conclusão a partir dos seus resultados [85]. Caso esses compostos apresentem um resultado satisfatório nos testes *in vivo* em camundongos, pensamos que seria interessante avaliar as suas atividades de forma combinada com outros fármacos anti-TB.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além de terem permitido compreender, ainda que parcialmente, os MOAs e MORs de três diferentes compostos com atividade anti-TB, pensamos que, em primeiro lugar, os experimentos e resultados apresentados nesta tese contribuíram para o amadurecimento do nosso grupo de pesquisa. Os resultados relacionados ao composto IQG-607 nos mostraram a importância de vencer uma etapa da pesquisa de cada vez, de forma que o resultado de um experimento levante uma nova hipótese, que por sua vez conduzirá a um novo experimento, e assim por diante. Ainda que a pesquisa sobre o IQG-607 tenha seguido, de certa forma, este modelo, algumas lacunas ainda haviam ficado em aberto, e levou-se um tempo considerável até que elas fossem preenchidas pelos dados desta tese. Além disso, este trabalho possibilitou “sentir na pele” a dificuldade de se desenvolver uma nova molécula para o uso farmacêutico. Sabe-se que diferentes barreiras devem ser vencidas ao longo do desenvolvimento de um candidato a fármaco anti-TB, e que não há qualquer garantia de que o novo candidato vença todas elas antes de chegar ao paciente. Além disso, as discrepâncias entre dados obtidos a partir de uma plataforma eletrônica, do ambiente simplificado de uma cubeta de quartzo ou do complexo sistema biológico que é uma célula viva, nos mostraram que ainda é bastante desafiador traduzir e extrapolar os resultados entre esses sistemas, em se tratando de desenvolvimento de fármacos anti-TB. Apesar de um dos caminhos da pesquisa do IQG-607, relacionado ao seu potencial uso contra cepas resistentes, ter encontrado um obstáculo de difícil transposição, outros caminhos ainda devem ser percorridos para investigar o seu potencial como uma alternativa terapêutica menos tóxica. Este trabalho também permitiu visualizar outro lado deste campo da ciência, aquele em que a descoberta de novas e promissoras moléculas incentiva e instiga o pesquisador a continuar e a persistir na pesquisa científica. Os compostos Labio-16 e Labio-17, assim como outros candidatos em análise no nosso laboratório, apontam para um futuro de bastante pesquisa e estudo nos anos seguintes, sempre se levando em consideração a intrincada missão de se encontrar novos medicamentos para tratar, e quem sabe erradicar, a TB.

REFERÊNCIAS

- [1] Paulson T. Tuberculosis Outlook - Epidemiology: A mortal foe. *Nature* 2013;502:S2–3. doi:10.1038/502S2a.
- [2] WHO. Global tuberculosis report 2017. Geneva: 2017.
- [3] Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Prim* 2016;2:16076. doi:10.1038/nrdp.2016.76.
- [4] Humphries C. Tuberculosis Outlook - A sleeping giant. *Nature* 2013;502:S14–5.
- [5] Procop GW. HIV and mycobacteria. *Semin Diagn Pathol* 2017;34:332–9. doi:10.1053/j.semmp.2017.04.006.
- [6] Diedrich CR, O’Hern J, Wilkinson RJ. HIV-1 and the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma: A systematic review and meta-analysis. *Tuberc* 2016;98:62–76. doi:10.1016/j.tube.2016.02.010.
- [7] Kendall EA, Fofana MO, Dowdy DW. Burden of transmitted multidrug resistance in epidemics of tuberculosis: a transmission modelling analysis. *Lancet Respir Med* 2015;3:963–72. doi:10.1016/S2213-2600(15)00458-0.
- [8] Ceccon RF, Maffaccioli R, Burille A, Meneghel SN, Oliveira DLLC de, Gerhardt TE, et al. Mortalidade por tuberculose nas capitais brasileiras, 2008-2010. *Epidemiol E Serviços Saúde* 2017;26:349–58. doi:10.5123/S1679-49742017000200012.
- [9] Lobo A de P, Pelissari DM, Alves KBA. Panorama da tuberculose no Brasil : A mortalidade em números. Brasília: 2016.
- [10] Peruhype RC, Acosta LMW, Ruffino-Netto A, de Oliveira MMC, Palha PF. The distribution of tuberculosis in Porto Alegre: Analysis of the magnitude and tuberculosis-HIV coinfection. *Rev Da Esc Enferm* 2014;48:1032–40. doi:10.1590/S0080-623420140000700011.
- [11] Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet (London, England)* 2011;378:57–72. doi:10.1016/S0140-6736(10)62173-3.
- [12] Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon S V. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:537–44. doi:10.1038/nrmicro2165.
- [13] Goude R, Parish T. *Mycobacteria Protocols*. vol. 1285. 3th ed. New York, NY: Springer New York; 2015. doi:10.1007/978-1-4939-2450-9.
- [14] Hett EC, Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective.

- Microbiol Mol Biol Rev 2008;72:126–56, table of contents. doi:10.1128/MMBR.00028-07.
- [15] Marrakchi H, Lanéelle M-A, Daffé M. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem Biol* 2014;21:67–85. doi:10.1016/j.chembiol.2013.11.011.
- [16] Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffé M. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol* 2008;190:5672–80. doi:10.1128/JB.01919-07.
- [17] van Leth F, van der Werf MJ, Borgdorff MW. Prevalence of tuberculous infection and incidence of tuberculosis: a re-assessment of the Styblo rule. *Bull World Health Organ* 2008;86:20–6. doi:10.2471/BLT.06.037804.
- [18] Tiemersma EW, van der Werf MJ, Borgdorff MW, Williams BG, Nagelkerke NJD. Natural History of Tuberculosis: Duration and Fatality of Untreated Pulmonary Tuberculosis in HIV Negative Patients: A Systematic Review. *PLoS One* 2011;6:e17601. doi:10.1371/journal.pone.0017601.
- [19] Zumla A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:388–404. doi:10.1038/nrd4001.
- [20] Tiberi S, Buchanan R, Caminero JA, Centis R, Arbex MA, Salazar M, et al. The challenge of the new tuberculosis drugs. *Presse Med* 2017;46:e41–51. doi:10.1016/j.lpm.2017.01.016.
- [21] Hoagland DT, Liu J, Lee RB, Lee RE. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;102:55–72. doi:10.1016/j.addr.2016.04.026.
- [22] Barry CE, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:845. doi:10.1038/nrmicro2236.
- [23] Singh V, Mizrahi V. Identification and validation of novel drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Drug Discov Today* 2017;22:503–9. doi:10.1016/j.drudis.2016.09.010.
- [24] Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Göhlmann HWH, Neefs J-MM, Winkler H, et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* (80-) 2005;307:223–7. doi:10.1126/science.1106753.

- [25] Matsumoto M, Hashizume H, Tomishige T, Kawasaki M, Tsubouchi H, Sasaki H, et al. OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis *in vitro* and in mice. *PLoS Med* 2006;3:e466. doi:10.1371/journal.pmed.0030466.
- [26] Lechartier B, Rybniker J, Zumla A, Cole ST. Tuberculosis drug discovery in the post-post-genomic era. *EMBO Mol Med* 2014;6:158–68. doi:10.1002/emmm.201201772.
- [27] Sala C, Hartkoorn RC. Tuberculosis drugs: new candidates and how to find more. *Future Microbiol* 2011;6:617–33. doi:10.2217/fmb.11.46.
- [28] Carroll P, Faray-Kele M-C, Parish T. Identifying vulnerable pathways in *Mycobacterium tuberculosis* by using a knockdown approach. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:5040–3. doi:10.1128/AEM.02880-10.
- [29] Pelicic V, Jackson M, Reytrat JM, Jacobs WR, Gicquel B, Guilhot C. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10955–60. doi:10.1073/PNAS.94.20.10955.
- [30] van Kessel JC, Marinelli LJ, Hatfull GF. Recombineering mycobacteria and their phages. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:851–7. doi:10.1038/nrmicro2014.
- [31] Evans JC, Mizrahi V. The application of tetracyclineregulated gene expression systems in the validation of novel drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol* 2015;6:812. doi:10.3389/fmicb.2015.00812.
- [32] Rock JM, Hopkins FF, Chavez A, Diallo M, Chase MR, Gerrick ER, et al. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nat Microbiol* 2017;2:16274. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.274.
- [33] Dartois V. The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells. *Nat Rev Microbiol* 2014;12:159–67. doi:10.1038/nrmicro3200.
- [34] Bergval IL, Schuitema AR, Klatser PR, Anthony RM. Resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* selected *in vitro* do not reflect the *in vivo* mechanism of isoniazid resistance. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:515–23. doi:10.1093/jac/dkp237.
- [35] Brossier F, Cambau E, Tessier E, Jarlier V, Sougakoff W. The *in vitro* mechanisms of isoniazid and ethionamide resistance poorly reflect those *in vivo* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc* 2016;101:144–5. doi:10.1016/j.tube.2016.09.028.
- [36] Stoffels K, Mathys V, Fauville-Dufaux M, Wintjens R, Bifani P. Systematic analysis of

- pyrazinamide-resistant spontaneous mutants and clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:5186–93.
doi:10.1128/AAC.05385-11.
- [37] North EJ, Jackson M, Lee RE. New approaches to target the mycolic acid biosynthesis pathway for the development of tuberculosis therapeutics. *Curr Pharm Des* 2014;20:4357–78.
- [38] Vilchèze C, Wang F, Arai M, Hazbón MH, Colangeli R, Kremer L, et al. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat Med* 2006;12:1027–9. doi:10.1038/nm1466.
- [39] Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, et al. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994;263:227–30.
- [40] Kuo MR, Morbidoni HR, Alland D, Sneddon SF, Gourlie BB, Staveski MM, et al. Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of Enoyl reductase: compound activity and structural data. *J Biol Chem* 2003;278:20851–9.
doi:10.1074/jbc.M211968200.
- [41] Hartkoorn RC, Sala C, Neres J, Pojer F, Magnet S, Mukherjee R, et al. Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin - nature's isoniazid. *EMBO Mol Med* 2012;4:1032–42.
doi:10.1002/emmm.201201689.
- [42] Kremer L, Pawełczyk J. The Molecular Genetics of Mycolic Acid Biosynthesis. *Microbiol Spectr* 2014;2:MGM2-0003-2013. doi:10.1128/microbiolspec.MGM2-0003-2013.
- [43] Quémard A, Sacchettini JC, Dessen A, Vilcheze C, Bittman R, Jacobs WR, et al. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 1995;34:8235–41.
- [44] Unissa AN, Subbian S, Hanna LE, Selvakumar N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol* 2016;45:474–92. doi:10.1016/j.meegid.2016.09.004.
- [45] CHORINE V. Action of nicotinamide on bacilli of the type *Mycobacterium*. *Compte Rendu l'Academie Des Sci* 1945;220:150–1.
- [46] Vilchèze C, Jacobs WR. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol* 2007;61:35–50.

- doi:10.1146/annurev.micro.61.111606.122346.
- [47] Isoniazid. *Tuberc* 2008;88:112–6. doi:10.1016/S1472-9792(08)70011-8.
- [48] Vilchèze C, Jacobs WR. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr* 2014;2:MGM2-0014-2013. doi:10.1128/microbiolspec.MGM2-0014-2013.
- [49] Brossier F, Boudinet M, Jarlier V, Petrella S, Sougakoff W. Comparative study of enzymatic activities of new KatG mutants from low- and high-level isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2016;100:15–24. doi:10.1016/j.tube.2016.06.002.
- [50] Baker RD, Cook CO, Goodwin DC. Properties of catalase-peroxidase lacking its C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:833–9. doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.026.
- [51] Bertrand T, Eady NA, Jones JN, Jesmin, Nagy JM, Jamart-Grégoire B, et al. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase. *J Biol Chem* 2004;279:38991–9. doi:10.1074/jbc.M402382200.
- [52] Wiseman B, Carpena X, Feliz M, Donald LJ, Pons M, Fita I, et al. Isonicotinic acid hydrazide conversion to Isonicotinyl-NAD by catalase-peroxidases. *J Biol Chem* 2010;285:26662–73. doi:10.1074/jbc.M110.139428.
- [53] Winder FG, Collins PB. Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol* 1970;63:41–8. doi:10.1099/00221287-63-1-41.
- [54] Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2640–9. doi:10.1128/AAC.00112-06.
- [55] Ramaswamy S V, Reich R, Dou SJ, Jasperse L, Pan X, Wanger A, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1241–50.
- [56] Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, et al. Identification of *katG* mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:1793–9. doi:10.1128/AAC.01691-09.

- [57] Wengenack NL, Uhl JR, St Amand AL, Tomlinson AJ, Benson LM, Naylor S, et al. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* KatG(S315T) is a competent catalase-peroxidase with reduced activity toward isoniazid. *J Infect Dis* 1997;176:722–7.
- [58] Wengenack NL, Todorovic S, Yu L, Rusnak F. Evidence for differential binding of isoniazid by *Mycobacterium tuberculosis* KatG and the isoniazid-resistant mutant KatG(S315T). *Biochemistry* 1998;37:15825–34. doi:10.1021/bi982023k.
- [59] Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, et al. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3373–81. doi:10.1128/AAC.48.9.3373-3381.2004.
- [60] van Soolingen D, de Haas PE, van Doorn HR, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff MW. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Infect Dis* 2000;182:1788–90. doi:10.1086/317598.
- [61] Larsen MH, Vilchèze C, Kremer L, Besra GS, Parsons L, Salfinger M, et al. Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2002;46:453–66.
- [62] Rozwarski DA, Grant GA, Barton DH, Jacobs WR, Sacchettini JC. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1998;279:98–102. doi:10.1126/SCIENCE.279.5347.98.
- [63] Knight GM, Colijn C, Shrestha S, Fofana M, Cobelens F, White RG, et al. The Distribution of Fitness Costs of Resistance-Confering Mutations Is a Key Determinant for the Future Burden of Drug-Resistant Tuberculosis: A Model-Based Analysis. *Clin Infect Dis* 2015;61:S147–54. doi:10.1093/cid/civ579.
- [64] Manjunatha UH, S Rao SP, Kondreddi RR, Noble CG, Camacho LR, Tan BH, et al. Direct inhibitors of InhA are active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med* 2015;7:269ra3. doi:10.1126/scitranslmed.3010597.
- [65] Oliveira JS, de Sousa EHS, de Souza ON, Moreira IS, Santos DS, Basso LA. Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex. *Curr Pharm Des* 2006;12:2409–24.

- [66] Pauli I, dos Santos RN, Rostirolla DC, Martinelli LK, Ducati RG, Timmers LFSM, et al. Discovery of New Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* InhA Enzyme Using Virtual Screening and a 3D-Pharmacophore-Based Approach. *J Chem Inf Model* 2013;53:2390–401. doi:10.1021/ci400202t.
- [67] Martinelli LKB, Rotta M, Villela AD, Rodrigues-Junior VS, Abbadi BL, Trindade R V., et al. Functional, thermodynamics, structural and biological studies of *in silico*-identified inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP(CoA) reductase enzyme. *Sci Rep* 2017;7:46696. doi:10.1038/srep46696.
- [68] Oliveira JS, Sousa EH, Basso LA, Palaci M, Dietze R, Santos DS, et al. An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Commun* 2004:312–3. doi:10.1039/b313592f.
- [69] Vasconcelos IB, Meyer E, Sales FAM, Basso LA, Moreira IS, Santos DS. The Mode of Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Wild-Type and Isoniazid-Resistant 2-Trans-Enoyl-ACP(CoA) Reductase Enzymes by An Inorganic Complex. *Antiinfect Agents Med Chem* 2008;7:50–62. doi:http://dx.doi.org/10.2174/187152108783329799.
- [70] Sousa EH, de Mesquita Vieira FG, Butler JS, Basso LA, Santiago DS, Diógenes IC, et al. [Fe(CN)5(isoniazid)](3-): an iron isoniazid complex with redox behavior implicated in tuberculosis therapy. *J Inorg Biochem* 2014;140:236–44. doi:10.1016/j.jinorgbio.2014.08.002.
- [71] Dadda ADS, Rodrigues VS, Rotta M, Martinelli LKB, Campos MM, Sousa EHS, et al. Voltammetric detection and quantification of pentacyano(isoniazid)ferrate(II), a metal-based drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Curr Top Pharmacol* 2015;19:75–86.
- [72] Rodrigues-Junior VS, Dos Santos Junior A, Dos Santos AJ, Schneider CZ, Calixto JB, Sousa EH, et al. Activity of IQG-607, a new orally active compound, in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40:182–5. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.04.019.
- [73] Rodrigues-Junior VS, dos Santos Junior AA, Villela AD, Belardinelli JM, Morbidoni HR, Basso LA, et al. IQG-607 abrogates the synthesis of mycolic acids and displays intracellular activity against *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages. *Int J Antimicrob Agents* 2014;43:82–5. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.08.021.

- [74] Basso LA, Schneider CZ, Santos AJAB dos, Santos Jr AA dos, Campos MM, Souto AA, et al. An inorganic complex that inhibits *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase as a prototype of a new class of chemotherapeutic agents to treat tuberculosis. *J Braz Chem Soc* 2010;21:1384–9.
- [75] Rodrigues-Junior VS, Machado P, Calixto JB, Siqueira JM, Andrade EL, Bento AF, et al. Preclinical safety evaluation of IQG-607 in rats: Acute and repeated dose toxicity studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 2017;86:11–7. doi:10.1016/j.yrtph.2017.02.016.
- [76] Rodrigues-Junior VS, Cintra L, Machado P, Dadda A, Basso LA, Mafra ACCN, et al. Toxicological profile of IQG-607 after single and repeated oral administration in minipigs: An essential step towards phase I clinical trial. *Regul Toxicol Pharmacol* 2017;90:78–86. doi:10.1016/j.yrtph.2017.08.015.
- [77] Dadda A da S, Rodrigues-Junior VS, Carreño F, Petersen GO, Pinto AFM, Dalberto PF, et al. Preclinical pharmacokinetic profiling of IQG-607, a potential oral metallodrug to treat tuberculosis. *Eur J Pharm Sci* 2018;111:393–8. doi:10.1016/J.EJPS.2017.10.020.
- [78] Wermuth CG, Ganellin CR, Lindberg P, Mitscher LA. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure Appl Chem* 1998;70:1129–43. doi:10.1351/pac199870051129.
- [79] Giacobbo BC, Pissinate K, Rodrigues-Junior V, Villela AD, Grams ES, Abbadi BL, et al. New insights into the SAR and drug combination synergy of 2-(quinolin-4-ylloxy)acetamides against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Med Chem* 2017;126:491–501. doi:10.1016/j.ejmech.2016.11.048.
- [80] Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2720–2.
- [81] Early J, Alling T. Determination of Compound Kill Kinetics Against *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Mol. Biol.*, vol. 1285, 2015, p. 269–79. doi:10.1007/978-1-4939-2450-9_16.
- [82] Rodrigues-Junior VS, Villela AD, Gonçalves RSB, Abbadi BL, Trindade RV, López-Gavín A, et al. Mefloquine and its oxazolidine derivative compound are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and in a murine model of tuberculosis infection. *Int J Antimicrob Agents* 2016;48. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.04.029.

- [83] Martínez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1771–7.
- [84] Torrey HL, Keren I, Via LE, Lee JS, Lewis K. High Persister Mutants in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 2016;11:e0155127. doi:10.1371/journal.pone.0155127.
- [85] Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:1–1. doi:10.1093/jac/dkg301.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo “Mode of action of recombinant hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*” publicado no periódico *RSC Advances*

ANEXO B – Artigo “2-(Quinolin-4-yloxy)acetamides are active against drug-susceptible and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains” publicado no periódico *ACS Medicinal Chemistry Letters*

ANEXO C – Artigo “Mefloquine and its oxazolidine derivative compound are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and in a murine model of tuberculosis infection” publicado no periódico *International Journal of Antimicrobial Agents*

ANEXO D - Artigo “New insights into the SAR and drug combination synergy of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides against *Mycobacterium tuberculosis*” publicado no periódico *European Journal of Medicinal Chemistry*

ANEXO E – Artigo “Functional, thermodynamics, structural and biological studies of in silico-identified inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP(CoA) reductase enzyme” publicado no periódico *Scientific Reports*

ANEXO F – Artigo “Synthesis and mechanistic investigation of iron(II) complexes of isoniazid and derivatives as a redox-mediated activation strategy for anti-tuberculosis therapy” publicado no periódico *Journal of Inorganic Biochemistry*.

ANEXO G – Artigo “Activity of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates and identification of their molecular target by whole genome sequencing” publicado no periódico *International Journal of Antimicrobial Agents*.

ANEXO H – Parecer de aprovação da Comissão de Experimentação e Uso de Animais – CEUA.

ANEXO A

RSC Advances



PAPER

Cite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 74671

Mode of action of recombinant hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*

Paulo C. Patta,^{†ab} Leonardo K. B. Martinelli,^{†a} Mariane Rotta,^{†ac} Bruno L. Abbadi,^{†ab} Diogenes S. Santos^{†*ab} and Luiz A. Basso^{†*ab}

Tuberculosis (TB) is the second most important cause of mortality worldwide due to a single infectious agent, *Mycobacterium tuberculosis*. A better understanding of the purine salvage pathway can unveil details of the biology of *M. tuberculosis* that might be used to develop new strategies to combat this pathogen. Hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) is an enzyme from the purine phosphoribosyltransferase (PRTase) family and catalyzes the conversion of hypoxanthine or guanine and 5-phospho- α -D-ribose 1-diphosphate (PRPP) to, respectively, inosine 5'-monophosphate (IMP) or guanosine 5'-monophosphate (GMP), and pyrophosphate (PPi). Gel filtration chromatography has shown that recombinant *M. tuberculosis* HGPRT (MtHGPRT) is homodimeric. A sequential compulsory ordered enzyme mechanism with PRPP as the substrate that binds to free MtHGPRT enzyme and PPi as the first product to dissociate is proposed based on kinetic data and thermodynamics of ligand binding from isothermal titration calorimetry (ITC) results. ITC data have also provided thermodynamic signatures of non-covalent interactions for PRPP, IMP and GMP binding to free MtHGPRT. Thermodynamic activation parameters (E_a , ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger) for the MtHGPRT-catalyzed chemical reaction, pre-steady-state kinetics, solvent kinetic isotope effects, equilibrium constants and pH-rate profiles are also presented. Pre-steady-state analysis reveals that there is an initial rapid phase (burst) followed by a slower phase, suggesting that product release is rate limiting. The data here described provide a better understanding of the mode of action of MtHGPRT.

Received 27th July 2015
Accepted 28th August 2015

DOI: 10.1039/c5ra14918e

www.rsc.org/advances

ANEXO B

2-(Quinolin-4-yloxy)acetamides Are Active against Drug-Susceptible and Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains

Kenia Pissinate,[†] Anne Drumond Villela,^{†,‡} Valnês Rodrigues-Junior,^{†,§} Bruno Couto Giacobbo,^{†,§} Estêvão Silveira Grams,[†] Bruno Lopes Abbadi,^{†,§} Rogério Valim Trindade,^{†,§} Laura Roesler Nery,^{||} Carla Denise Bonan,^{§,||} Davi Fernando Back,[⊥] Maria Martha Campos,^{†,‡,§} Luiz Augusto Basso,^{†,‡,§} Diógenes Santiago Santos,^{*,†,§} and Pablo Machado^{*,†,§}

[†]Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

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

[§]Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^{||}Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

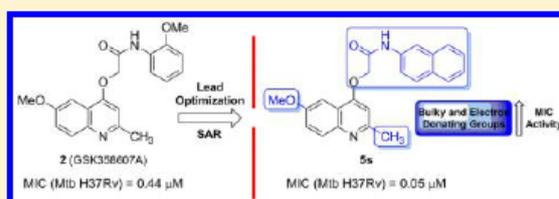
[⊥]Departamento de Química, Laboratório de Materiais Inorgânicos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

S Supporting Information

ABSTRACT: 2-(Quinolin-4-yloxy)acetamides have been described as potent *in vitro* inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* growth. Herein, additional chemical modifications of lead compounds were carried out, yielding highly potent antitubercular agents with minimum inhibitory concentration (MIC) values as low as 0.05 μM . Further, the synthesized compounds were active against drug-resistant strains and were devoid of apparent toxicity to Vero and HaCat cells ($\text{IC}_{50}\text{s} \geq 20 \mu\text{M}$). In addition, the 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides

showed intracellular activity against the bacilli in infected macrophages with action similar to rifampin, low risk of drug–drug interactions, and no sign of cardiac toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) at 1 and 5 μM . Therefore, these data indicate that this class of compounds may furnish candidates for future development to, hopefully, provide drug alternatives for tuberculosis treatment.

KEYWORDS: Tuberculosis, quinoline-based compounds, drug-resistant research, SAR



ANEXO C

International Journal of Antimicrobial Agents 48 (2016) 203–207



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Short Communication

Mefloquine and its oxazolidine derivative compound are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and in a murine model of tuberculosis infection



Valnês S. Rodrigues-Junior^{a,b,c}, Anne D. Villela^{a,b}, Raoni S.B. Gonçalves^d, Bruno Lopes Abbadi^{a,e}, Rogério Valim Trindade^{a,e}, Alexandre López-Gavín^f, Griselda Tudó^f, Julian González-Martín^f, Luiz Augusto Basso^{a,b,e}, Marcus V.N. de Souza^{g,h}, Maria Martha Campos^{a,b,c,i}, Diógenes Santiago Santos^{a,e,*}

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

^b Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

^c Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

^d Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

^f Servei de Microbiologia, CDB, Hospital Clínic de Barcelona-ISGlobal, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^g Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia de Fármacos (Farmanguinhos), Rio de Janeiro, Brazil

^h Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ⁱ Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 March 2016
Accepted 16 April 2016

Keywords:
Tuberculosis
Mefloquine
Murine model
Combination
Quinolone-resistant strains

ABSTRACT

Repurposing of drugs to treat tuberculosis (TB) has been considered an alternative to overcome the global TB epidemic, especially to combat drug-resistant forms of the disease. Mefloquine has been reported as a potent drug to kill drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. In addition, mefloquine-derived molecules have been synthesised and their effectiveness against mycobacteria has been assessed. In this work, we demonstrate for the first time the activities of mefloquine and its oxazolidine derivative compound 1E in a murine model of TB infection following administration of both drugs by the oral route. The effects of associations between mefloquine or 1E with the clinically used antituberculosis drugs isoniazid, rifampicin, ethambutol, moxifloxacin and streptomycin were also investigated. Importantly, combination of mefloquine with isoniazid and of 1E with streptomycin showed a two-fold decrease in their minimum inhibitory concentrations (MICs). Moreover, no tested combinations demonstrated antagonist interactions. Here we describe novel evidence on the activity of mefloquine and 1E against a series of quinolone-resistant *M. tuberculosis* strains. These data show MICs against quinolone-resistant strains (0.5–8 µg/mL) similar to or lower than those previously reported for multidrug-resistant strains. Taking these results together, we can suggest the use of mefloquine or 1E in combination with clinically available drugs, especially in the case of resistant forms of TB.

© 2016 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

ANEXO D

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.

ANEXO E

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS 

OPEN Functional, thermodynamics, structural and biological studies of *in silico*-identified inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP(CoA) reductase enzyme

Received: 01 November 2016

Accepted: 28 March 2017

Published: 24 April 2017

Leonardo K. B. Martinelli¹, Mariane Rotta¹, Anne D. Villela¹, Valnês S. Rodrigues-Junior¹, Bruno L. Abbadi¹, Rogério V. Trindade¹, Guilherme O. Petersen¹, Giuliano M. Danesi^{2,3}, Laura R. Nery⁴, Ivani Pauli⁵, Maria M. Campos^{2,6}, Carla D. Bonan⁴, Osmar Norberto de Souza^{5,7}, Luiz A. Basso¹ & Diogenes S. Santos¹

Novel chemotherapeutics agents are needed to kill *Mycobacterium tuberculosis*, the main causative agent of tuberculosis (TB). The *M. tuberculosis* 2-*trans*-enoyl-ACP(CoA) reductase enzyme (*MtInhA*) is the druggable *bona fide* target of isoniazid. New chemotypes were previously identified by two *in silico* approaches as potential ligands to *MtInhA*. The inhibition mode was determined by steady-state kinetics for seven compounds that inhibited *MtInhA* activity. Dissociation constant values at different temperatures were determined by protein fluorescence spectroscopy. van't Hoff analyses of ligand binding to *MtInhA*:NADH provided the thermodynamic signatures of non-covalent interactions (ΔH° , ΔS° , ΔG°). Phenotypic screening showed that five compounds inhibited *in vitro* growth of *M. tuberculosis* H37Rv strain. Labio_16 and Labio_17 compounds also inhibited the *in vitro* growth of PE-003 multidrug-resistant strain. Cytotoxic effects on Hacat, Vero and RAW 264.7 cell lines were assessed for the latter two compounds. The Labio_16 was bacteriostatic and Labio_17 bactericidal in an *M. tuberculosis*-infected macrophage model. In Zebrafish model, Labio_16 showed no cardiotoxicity whereas Labio_17 showed dose-dependent cardiotoxicity. Accordingly, a model was built for the *MtInhA*:NADH:Labio_16 ternary complex. The results show that the Labio_16 compound is a direct inhibitor of *MtInhA*, and it may represent a hit for the development of chemotherapeutic agents to treat TB.

ANEXO F

Journal of Inorganic Biochemistry 179 (2018) 71–81



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinorgbio

Synthesis and mechanistic investigation of iron(II) complexes of isoniazid and derivatives as a redox-mediated activation strategy for anti-tuberculosis therapy



Julie Laborde^{a,b}, Céline Deraeve^{a,b}, Francisca Gilmar de Mesquita Vieira^c,
 Alix Sournia-Saquet^{a,b}, Lionel Rechinat^{a,b}, Anne Drumond Villela^d, Bruno Lopes Abadi^d,
 Fernanda Souza Macchi^d, Kenia Pissinatti^d, Cristiano V. Bizarro^d, Pablo Machado^d,
 Luiz Augusto Basso^d, Geneviève Prativiel^{a,b}, Luiz Gonzaga de França Lopes^c,
 Eduardo Henrique Silva Sousa^{c,*}, Vania Bernardes-Génisson^{a,b,**}

^a CNRS, LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination), 205, route de Narbonne, BP 44099, F-31077 Toulouse, Cedex 4, France

^b Université de Toulouse, UPS, INPT, F-31077 Toulouse, Cedex 4, France

^c Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Campus Pici, Fortaleza, CE 60455-760, Brazil

^d Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Av Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Tuberculosis
 Aroyl radical
 Isoniazid
 Radical mechanism
 Metaldrug
 Iron complexes

ABSTRACT

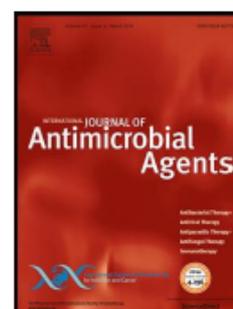
The emergence of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) represents a major threat to global health. Isoniazid (INH) is a prodrug used in the first-line treatment of tuberculosis. It undergoes oxidation by a catalase-peroxidase KatG, leading to generation of an isonicotinoyl radical that reacts with NAD(H) forming the INH-NADH adduct as the active metabolite. A redox-mediated activation of isoniazid using an iron metal complex was previously proposed as a strategy to overcome isoniazid resistance due to KatG mutations. Here, we have prepared a series of iron metal complexes with isoniazid and analogues, containing alkyl substituents at the hydrazide moiety, and also with pyrazinamide derivatives. These complexes were activated by H₂O₂ and studied by ESR and LC-MS. For the first time, the formation of the oxidized INH-NAD adduct from the pentacyano (isoniazid)ferrate(II) complex was detected by LC-MS, supporting a redox-mediated activation, for which a mechanistic proposition is reported. ESR data showed all alkylated hydrazides, in contrast to non-substituted hydrazides, only generated alkyl-based radicals. The structural modifications did not improve minimal inhibitory concentration (MIC) against MTB in comparison to isoniazid iron complex, providing support to isonicotinoyl radical formation as a requirement for activity. Nonetheless, the pyrazinoic acid hydrazide iron complex showed redox-mediated activation using H₂O₂ with generation of a pyrazinoyl radical intermediate and production of pyrazinoic acid, which is in fact the active metabolite of pyrazinamide prodrug. Thereby, this strategy can also unveil new opportunities for activation of this type of drug.

ANEXO G

Accepted Manuscript

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

Author: Fernanda Teixeira Subtil, Anne Drumond Villela, Bruno Lopes Abadi, Valnês S. 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, Diógenes Santiago Santos



PII: S0924-8579(17)30315-1
DOI: <http://dx.doi.org/doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.08.023>
Reference: ANTAGE 5247

To appear in: *International Journal of Antimicrobial Agents*

Received date: 13-3-2017
Accepted date: 15-8-2017

ABSTRACT

The 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides (QOAs) have been reported as promising molecules for tuberculosis treatment. Recent studies demonstrated its potent antimycobacterial activity, as well as its biological stability and synergism with rifampicin. The identification of the molecular target is an essential step towards the development of a novel drug candidate. Here we report the target identification of the QOAs. We found that these compounds are active against isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin and ethionamide resistant clinical isolates from *M. tuberculosis*. The initial evidence that DNA gyrase might be the target of QOAs, based on high MIC values against ofloxacin-resistant clinical isolates and structural similarities with fluoroquinolones, was discarded by experiments performed with *M. tuberculosis* GyrA point mutant and DNA gyrase supercoiling inhibition assay. We selected spontaneous mutants for compound 21 and observed that these strains were also resistant to all QOAs derivatives. The spontaneous mutants had their genomes sequenced and the results revealed a single mutation in *qcrB* gene (T313A) suggesting that the QOAs target the cytochrome *bc₁* complex. The protein-compound interaction was further investigated by molecular docking. These findings reinforce the relevance of these compounds as promising candidates for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis.

ANEXO H



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7348

Porto Alegre, 10 de agosto de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTI-TUBERCULOSE: AVALIAÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Mycobacterium tuberculosis*" coordenado por MARIA MARTHA CAMPOS.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
208	Mus musculus	10/08/2016 - 10/02/2018

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)