

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ALEXIA DE MATOS CZECZOT

**CARACTERIZAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA DI-HIDRONEOPTERINA ALDOLASE (EC
4.1.2.25) DE *Mycobacterium tuberculosis* POR COMPOSTOS DA CLASSE 8-
MERCAPTOGUANINA**

Porto Alegre
2020

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

ALEXIA DE MATOS CZECZOT

**CARACTERIZAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA DI-HIDRONEOPTERINA
ALDOLASE (EC 4.1.2.25) DE *Mycobacterium tuberculosis* POR COMPOSTOS
DA CLASSE 8-MERCAPTOGUANINA**

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

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Valim Bizarro

Porto Alegre

2020

Ficha Catalográfica

C998c Czczot, Alexia de Matos

Caracterização da inibição da enzima di-hidroneopterina aldolase (EC 4.1.2.25) de *Mycobacterium tuberculosis* por compostos da classe 8-mercaptopguanina / Alexia de Matos Czczot . – 2020.

65 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Valim Bizarro.

1. Tuberculose. 2. Di-hidroneopterina aldolase. 3. 8-mercaptopguanina. 4. Inibição da MtDHNA. I. Bizarro, Cristiano Valim. II. Título.

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

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

ALEXIA DE MATOS CZECZOT

**CARACTERIZAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA DI-HIDRONEOPTERINA
ALDOLASE (EC 4.1.2.25) DE *Mycobacterium tuberculosis* POR COMPOSTOS
DA CLASSE 8-MERCAPTOGUANINA**

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

Aprovada em: 30 de março de 2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. André Arigony Souto - PUCRS

Prof. Dr. Maurício Reis Bogo – PUCRS

Prof. Dr. Rafael Fernandes Zanin – UNILASALLE

Porto Alegre

2020

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Cristiano Valim Bizarro, pela confiança, ensinamentos e todo o suporte ao longo deste trabalho.

Aos Professores Luiz Augusto Basso e Pablo Machado por toda a ajuda e disponibilidade.

A todos os colegas do CPBMF pela convivência, conselhos e apoio.

À Candida Deves Roth e ao Rodrigo Gay Ducati por dividirem comigo seus conhecimentos com tanta paciência e dedicação.

À Renata, à Talita e à Luiza por tornarem os dias mais leves.

Um agradecimento especial à Marcia e à Águida por todo o suporte no laboratório.

Aos meus pais, Sandra e Mário, pelo incentivo, apoio emocional, cuidado e amor.

Ao Lucas por todo o apoio, compreensão, paciência, companheirismo e amor incondicional.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste projeto.

À PUCRS pela estrutura e à CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

A proteína di-hidroneopterina aldolase (DHNA, EC 4.1.2.25) é a terceira enzima da via de biossíntese do folato, catalisando a conversão de 7,8-di-hidroneopterina (DHNP) a 6-hidroxi metil-7,8-di-hidropterina (HP) e glicolaldeído (GA). Em *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), a DHNA é essencial para a sobrevivência do bacilo, caracterizando-se por ser um potencial alvo molecular para o desenvolvimento de fármacos com toxicidade reduzida, visto que esta via está ausente em humanos. Compostos da classe 8-mercaptoguanina foram identificados como inibidores da DHNA e de outras enzimas da via de biossíntese do folato em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. No entanto, até o momento, não foram descritos inibidores para a DHNA de Mtb (*MtDHNA*). Nesse trabalho, uma série de 19 compostos análogos estruturais do 8-mercaptoguanina (8-MG) S-8 substituídos foi sintetizada e avaliada quanto ao potencial inibitório sobre a enzima *MtDHNA*. Foram identificados 8 compostos com valores de IC₅₀ na faixa de inibição de nanomolar. O mecanismo e as constantes de inibição foram determinados para os 4 compostos com maior potencial inibitório, que apresentaram um perfil de inibição não-competitiva ou competitiva para o substrato DHNP. Além disso, estudos *in silico* de docagem molecular foram realizados, sugerindo o sítio de interação enzima-inibidor e as conformações dos ligantes. Por fim, os compostos foram avaliados quanto ao potencial de inibição do crescimento da cepa H37Rv de Mtb, e nenhum composto apresentou atividade inibitória sobre o bacilo nas maiores concentrações testadas.

Palavras-chave: Tuberculose; di-hidroneopterina aldolase; 8-mercaptoguanina; inibição da *MtDHNA*.

ABSTRACT

Dihydroneopterin aldolase (DHNA, EC 4.1.2.25) catalyzes the conversion of 7,8-dihydroneopterin (DHNP) to 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin (HP) and glycolaldehyde (GA) in the folate pathway. DHNA is essential for *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) bacilli survival and represents an important molecular target for drug development, mainly because this pathway is absent in mammals. 8-mercaptoguanine and its derivatives were identified as inhibitors of DHNA and other enzymes of the folate biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. However, no inhibitors have been identified for DHNA from Mtb (*MtDHNA*). Here, a series of 19 8-mercaptoguanine derivatives S8-functionalized were synthesized and the inhibitory potential against *MtDHNA* was evaluated. 8 compounds showed IC₅₀ values in the submicromolar range. The mode and inhibition constants were determined for 4 compounds that exhibited the highest enzymatic inhibitory potency, which demonstrated a non-competitive or competitive inhibition profile for DHNP. Further, molecular docking analyses were performed to suggest enzyme-inhibitor interactions and ligand conformations. Additionally, the compounds were evaluated for the potential to inhibit the growth of *M. tuberculosis* H37Rv, and the compounds presented no activity against Mtb cells.

Keywords: Tuberculosis; dihydroneopterin aldolase; 8-mercaptoguanine; *MtDHNA* inhibition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura e constituintes celulares do granuloma da tuberculose	13
Figura 2 - Estimativa da taxa de incidência de tuberculose em 2018.....	14
Figura 3 - Dados de incidência e morte por tuberculose no mundo entre 2000 e 2018	15
Figura 4 - Via de biossíntese do folato	19
Figura 5 - Estrutura cristalográfica da di-hidroneopterina aldolase de <i>Staphylococcus aureus</i> (SaDHNA)	22
Figura 6 - Mecanismo catalítico de DHNA/FoIB pelas atividades de aldolase e epimerase.....	23
Figura 7 - Estrutura química do composto 8-mercaptop Guanina.....	24
Figura 8 - Derivatização química de 8-mercaptop Guanina	25
Figura 9 - Espectros de absorvância de DHNP e HP a 100 μ M.....	30
Figura 10 - Espectros de emissão de DHNP e HP.....	31
Figura 11 - Espectros de emissão da reação de aldolase da MtDHNA com λ_{EX} de 365 nm	32
Figura 12 - Reação contínua de aldolase da MtDHNA com λ_{EX} de 365 nm e λ_{EM} de 525 nm.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medicamentos de primeira linha utilizados para tratamento da tuberculose	16
Tabela 2 - 8-mercaptop Guanina (8-MG) e seus análogos estruturais S-8 substituídos previamente sintetizados.....	26

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Tuberculose	12
1.2 Tratamento e resistência aos fármacos	16
1.3 Biossíntese do Folato	18
1.4 Proteína FolB (DHNA/FolB)	20
1.5 Inibidores da DHNA/FolB	23
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
CAPÍTULO 2 - PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO CONTÍNUO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR ESPECTROFLUORIMETRIA	29
CAPÍTULO 3 - ARTIGO CIENTÍFICO	34
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS	62

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

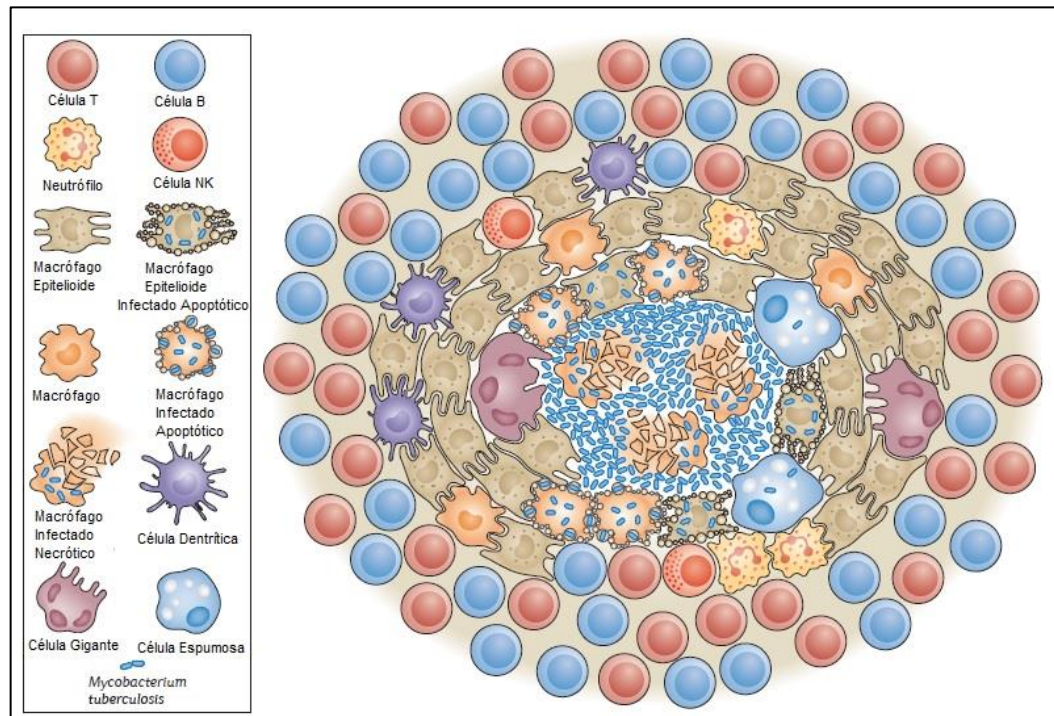
1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que apresenta alto índice de incidência e mortalidade. O bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) foi identificado em 1882 por Robert Koch como o principal agente etiológico dessa doença em humanos (CAMBAU; DRANCOURT, 2014).

A transmissão da TB pulmonar se dá pela inalação de aerossóis contendo o bacilo Mtb. A extensão da infecção depende da resposta imune do hospedeiro, podendo resultar na cura ou progressão para forma latente ou ativa da doença (CHETTY et al., 2017). Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com o bacilo Mtb na forma latente (LTBI), situação na qual os indivíduos infectados não manifestam os sinais clínicos da TB. Entretanto, a infecção na forma latente age como um reservatório para transmissão, uma vez que a LTBI pode progredir para a TB ativa. Portanto, o tratamento de portadores de LTBI é essencial para não ocorrer a progressão para TB ativa e a disseminação da bactéria (CHETTY et al., 2017).

Após a inalação, Mtb entra nos pulmões e, ao alcançar o espaço alveolar, é fagocitado pelos macrófagos alveolares. No entanto, caso não seja eliminado, as bactérias invadem o tecido intersticial pulmonar. Subsequentemente, células dendríticas ou monócitos transportam Mtb para linfonodos pulmonares. Este evento leva ao recrutamento de células imunológicas, incluindo células T e B, ao parênquima pulmonar para formar um granuloma (Figura 1) (PAI et al., 2016). O granuloma é um agregado organizado e compacto de células imunes que é formado em resposta a estímulos persistentes de infecção, sendo uma estrutura crucial de proteção ao hospedeiro (RAMAKRISHNAN, 2012).

Figura 1 - Estrutura e constituintes celulares do granuloma da tuberculose



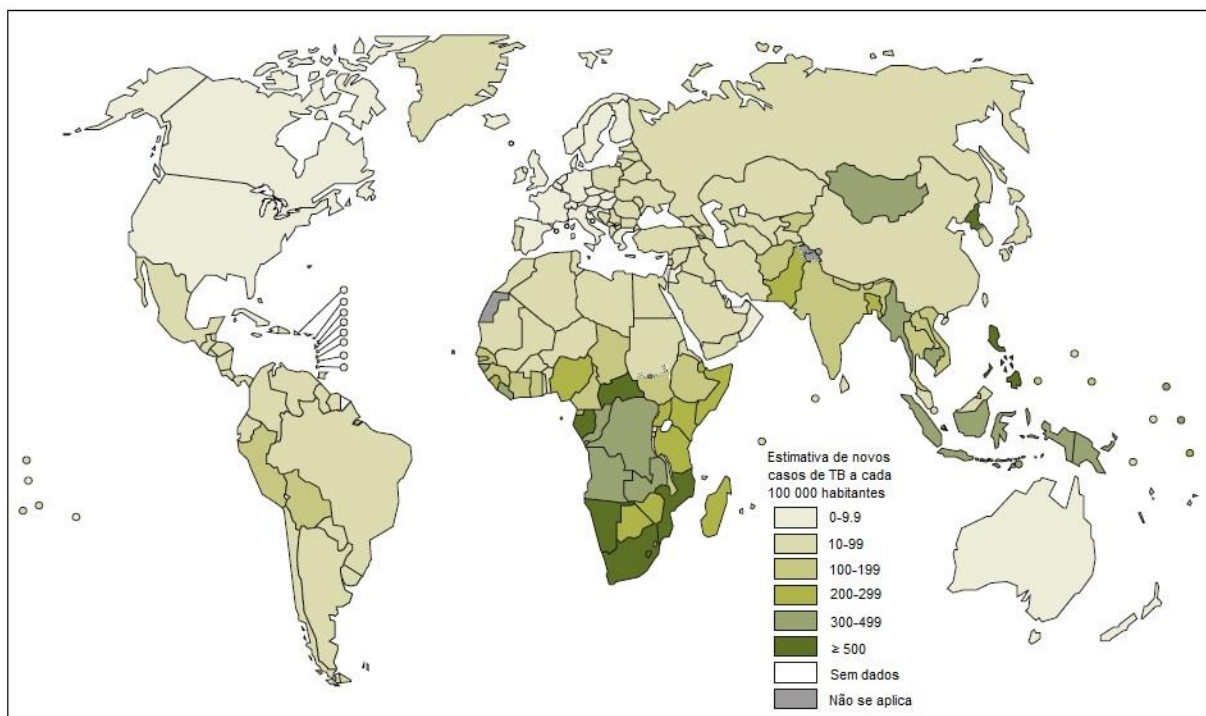
Fonte: Adaptado de Ramakrishnan (2012).

Entretanto, o alto índice de casos de tuberculose em todo o mundo indica que muitos pacientes não conseguem erradicar a infecção através da formação do granuloma (RAMAKRISHNAN, 2012). Nestes casos, a carga bacteriana excessiva, decorrente da replicação do bacilo dentro do granuloma, ocasiona a falha desta estrutura em conter a infecção e as bactérias se disseminam para outros órgãos. Dessa forma, as bactérias podem entrar na corrente sanguínea ou reentrar no trato respiratório. Nesta fase, o hospedeiro infectado passa a ser infeccioso, pois a tuberculose está na sua fase ativa (PAI et al., 2016). A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) reduz substancialmente o número de células T CD4⁺ sendo, portanto, um fator de risco para a progressão da infecção na forma ativa (PAWLOWSKI et al., 2012).

A TB é uma das dez principais causas de morte no mundo, sendo a principal entre as doenças ocasionadas por um único agente infeccioso. Em 2018, foram estimados 10 milhões de novos casos de TB no mundo, sendo 89% adultos, 57% homens e 8,6% portadores de HIV. A taxa de incidência variou amplamente entre países, de menos de 10 por 100 mil habitantes na maioria dos países de alta renda para 150-400 na maioria dos países de alta carga de TB (Figura 2). A maior parte do

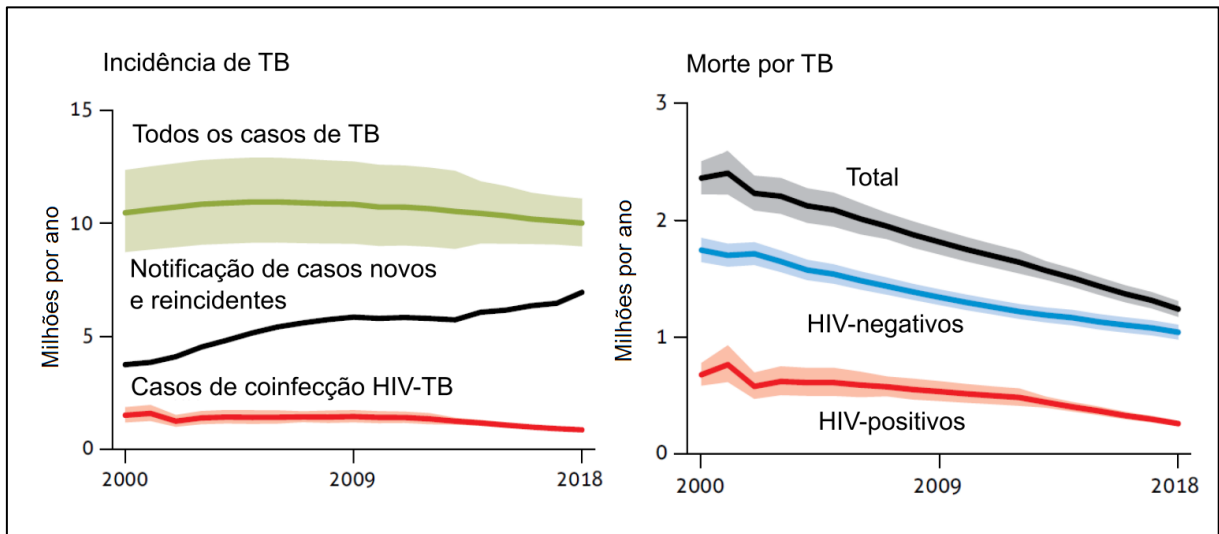
número de casos ocorreu na Região do Sudeste Asiático (44%), África (24%) e na Região do Pacífico Ocidental (18%). Uma menor proporção dos casos ocorreu na Região do Mediterrâneo Oriental (8,1%), nas Américas (2,9%) e Europa (2,6%). No mesmo ano, estimou-se mundialmente 1,2 milhões de mortes por TB em pacientes HIV negativos e 251 mil mortes em pacientes HIV positivos (Figura 3). Aproximadamente 83% das mortes em pacientes HIV negativo ocorreram na África e no Sudeste Asiático (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Figura 2 - Estimativa da taxa de incidência de tuberculose em 2018



Fonte: Extraído de World Health Organization (2019).

Figura 3 - Dados de incidência e morte por tuberculose no mundo entre 2000 e 2018



Fonte: Extraído de World Health Organization (2019).

No Brasil, foram notificados 90.527 casos de TB no ano de 2018, estimando-se o surgimento de 45 novos casos a cada 100 mil habitantes, incluindo coinfeção TB/HIV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). De acordo com a nova classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) válida de 2016 a 2020, o Brasil ocupa a 20^a posição na lista dos 30 países prioritários para TB e a 19^a posição na lista dos 30 países prioritários para coinfeção TB/HIV.

A TB caracteriza-se por ser uma das doenças mais antigas que aflige a população mundial. Dessa forma, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu a estratégia “End-TB” com o período de vigência de 2016 a 2035 para o controle da epidemia global de TB. Os pilares desta estratégia são: integração paciente-centro de saúde e prevenção, políticas arrojadas e sistemas de apoio, além de intensificar pesquisa e inovação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

As metas da estratégia “End-TB” incluem a redução, em relação ao ano de 2015, de 95% da mortalidade por TB para 2035 e de 90% na taxa de incidência. Globalmente, a taxa de incidência de TB está diminuindo cerca de 2% ao ano e a taxa de mortalidade diminuiu cerca de 3% por ano. Para alcançar os primeiros objetivos da estratégia “End-TB” estas taxas precisam aumentar para 4 ou 5% ao ano até 2020 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

1.2 Tratamento e resistência aos fármacos

Os fármacos antituberculose são classificados de acordo com a eficácia e a potência do tratamento e experiência de uso do medicamento. Os fármacos de primeira linha são mais efetivos e amplamente utilizados para o tratamento da TB causada por cepas de Mtb suscetíveis (Tabela 1). Os fármacos de segunda linha são utilizados para o tratamento de infecção por cepas resistentes aos fármacos de primeira linha. Um fármaco pode ser classificado como de segunda linha por ser menos efetivo, apresentar efeitos adversos tóxicos ou estar disponível em apenas alguns países (BAILO et al., 2015).

Tabela 1 - Medicamentos de primeira linha utilizados para tratamento da tuberculose

Fármaco	Alvo molecular	Mecanismo de ação
Isoniazida	Múltiplos. Alvo principal: 2-trans-enoil-ACP(COA) redutase (InhA)	Inibição da biossíntese de ácidos micólicos da parede celular.
Rifampicina	Subunidade β da RNA-polimerase	Inibição da síntese de RNA.
Pirazinamida	Múltiplos, como o componente S1 da subunidade 30S ribossomal	Múltiplos, incluindo a inibição da tradução de proteínas.
Etambutol	Arabinosil-transferase	Inibição da síntese de arabinogalactano da parede celular.

Fonte: Adaptado de Chetty et al. (2017).

O tratamento atual para a TB sensível consiste em duas fases: fase intensiva de tratamento e fase de continuação. A primeira fase tem duração de dois meses, consistindo na administração diária de quatro fármacos de primeira linha combinados, sendo eles isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZN). Já a segunda fase tem duração de quatro meses e consiste na administração diária de INH e RIF (PAI et al., 2016). Contudo, a duração e a complexidade do tratamento resultam em não adesão, levando a uma resposta subótima e ao surgimento de

resistência e propagação contínua da doença. Além disso, os eventos adversos em resposta aos medicamentos anti-TB são comuns e contribuem para o problema da não adesão (BOOGAARD et al., 2009).

A resistência aos fármacos no Mtb ocorre por diferentes eventos de mutação cromossômica. Isso ocorre devido ao seguimento de um tratamento inadequado ou à presença de concentrações de fármaco parcialmente supressoras que permitem a replicação de bactérias, resultando em uma pressão seletiva a favor de mutantes resistentes (BOOGAARD et al., 2009). Essas mutações podem provocar uma alteração no alvo, reduzir a capacidade de ativar o fármaco ou aumentar a capacidade de inativação de drogas (BAILO et al., 2015). As cepas resistentes aos fármacos antituberculose são definidas como multirresistentes (MDR-TB), quando o bacilo apresenta resistência a pelo menos a INH e RIF; extensivamente resistente a fármacos (XDR-TB), quando ocorre resistência tanto a fármacos de primeira linha (INH e RIF) como de segunda linha injetáveis e a fluoroquinolonas; e resistente à rifampicina (RR-TB) (PAI et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

O tratamento para TB ocasionada por cepas resistentes é mais longo. Atualmente, é recomendado um período de tratamento para MDR/RR-TB de 9 a 12 meses para todos os pacientes (excluindo grávidas) que não sejam resistentes a fármacos de segunda linha e fluoroquinolonas, considerando o tratamento anterior e os perfis individuais de resistência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Entretanto, o aumento da incidência de TB resistente a medicamentos é uma ameaça contínua. Em 2018, estima-se que houve 484.000 novos casos com resistência à rifampicina (RR-TB), dos quais 78% apresentavam TB multirresistente (MDR-TB) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

A coinfeção HIV/TB dificulta a seleção de um regime de tratamento adequado, uma vez pode ocorrer interação entre os medicamentos, levando a concentrações subterapêuticas dos antirretrovirais, além de aumentar os efeitos colaterais adversos, consequentemente diminuindo a adesão ao tratamento (KOUL et al., 2011). O risco de desenvolvimento de TB em pessoas infectadas com HIV é 21 vezes maior do que no restante da população mundial, segundo estimativas de 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Dessa forma, esta coinfeção representa um cenário patogênico em nível global que constitui um sério desafio terapêutico, uma vez que a epidemiologia e as manifestações clínicas são diferentes quando comparadas a pacientes mono infectados (PAWLOWSKI et al., 2012; BRUCHFELD et al., 2015).

As circunstâncias atuais demonstram uma necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de TB a fim de controlar esta epidemia global. Assim, busca-se novos tratamentos de custos reduzidos, menor duração, desprovido ou com menores efeitos adversos, com maior efetividade contra as cepas MDR-TB, XDR-TB e possível coadministração com medicamentos anti-HIV.

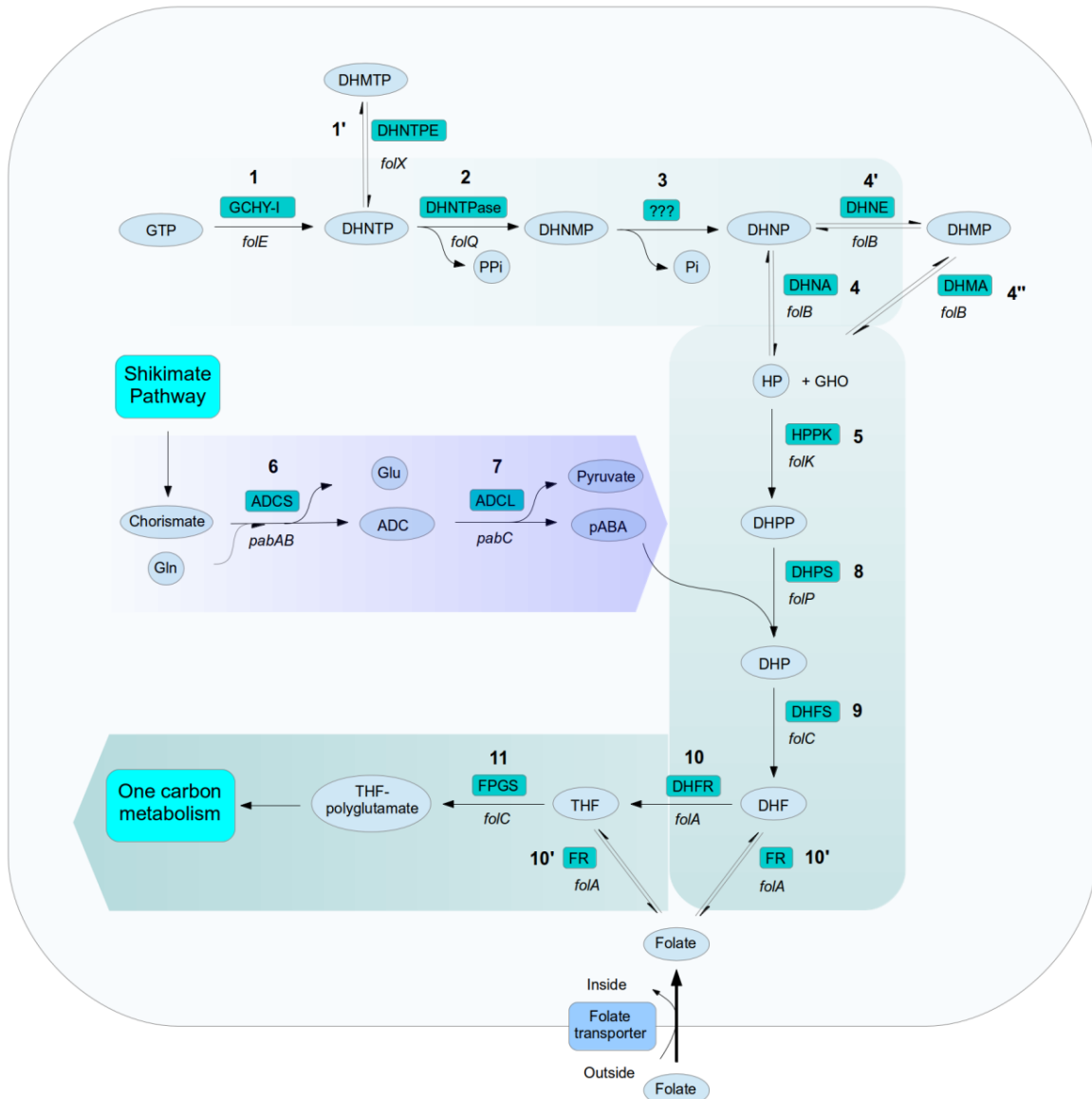
1.3 Biossíntese do Folato

O folato e seus derivados atuam como cofatores na transferência de unidades monocarbonadas em várias reações bioquímicas, como biossíntese de purinas, pirimidinas e aminoácidos, sendo essenciais nos três domínios da vida (GOULDING et al., 2005; NAZKI et al, 2014). No entanto, o mecanismo de obtenção do folato difere entre os organismos. Enquanto procariotos e plantas possuem as enzimas da via de biossíntese *de novo* de folato; eucariotos superiores, como os mamíferos, são incapazes de realizar a síntese, por não conter enzimas desta via, e absorvem folato pré-formado, utilizando um sistema de transporte ativo associado à membrana (NAZKI et al, 2014).

A estrutura do folato é composta de um anel pterínico ligado ao ácido *para*-aminobenzoico (*p*-ABA) e resíduos de glutamato. A sua biossíntese ocorre por reações enzimáticas consecutivas realizadas por enzimas distintas (Figura 4). A primeira reação é catalisada pela enzima GTP-ciclo-hidrolase I (GTPCHI), e consiste na conversão de GTP a ácido fórmico e 7,8-di-hidroneopterina (DHNP) trifosfato, sendo este último convertido em 7,8-di-hidroneopterina, substrato para a enzima di-hidroneopterina aldolase (DHNA), após duas reações de desfosforilação. A reação catalisada pela DHNA produz 6-hidroximetil-7,8-di-hidropterina (HP) e glicaldeído (GA) em uma reação reversível (REBELO et al., 2003; BERTACINE DIAS et al., 2018). A próxima etapa da via é catalisada pela enzima 6-hidroximetil-7,8-di-hidropterina-pirofosfoquinase (HPPK), que transfere um grupamento pirofosforil a HP, produzindo 6-hidroximetil-7,8-di-hidropterina pirofosfato (DHPP) e AMP. A enzima di-hidropteroato sintase (DHPS) realiza a próxima reação, catalisando a condensação de *p*-ABA e DHPP para produzir di-hidropteroato (DHP) através de uma ligação carbono-nitrogênio. O *p*-ABA é produzido a partir de corismato por duas reações enzimáticas. O primeiro resíduo de glutamato é adicionado pela enzima di-hidrofolato sintase (DHFS), produzindo di-hidrofolato (DHF). A última reação da via é catalisada pela enzima di-hidrofolato redutase (DHFR), que reduz di-hidrofolato a tetra-

hidrofolato (THF) utilizando NADPH como cofator. Outros resíduos de glutamato podem ser adicionados em reações catalisadas pela enzima folil-poli- γ -glutamato sintase (FPGS), sendo o número de resíduos variado entre os organismos (BERTACINE DIAS et al., 2018).

Figura 4 - Via de biossíntese do folato



Fonte: Falcão (2017).

As enzimas que constituem a via de biossíntese do folato são potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos para doenças infecciosas, uma vez que esta via está presente em microrganismos patogênicos e ausente em humanos, permitindo a síntese de inibidores específicos com toxicidade seletiva (BERMINGHAM; DERRICK,

2002). As enzimas DHPS e DHFR são alvos para fármacos disponíveis. A classe de antibióticos sintéticos sulfonamidas, amplamente utilizada desde a década de 1930, atua como análogos estruturais do *p*-ABA, inibindo a enzima DHPS por um mecanismo de inibição competitiva, ocasionando depleção de folato que acaba por inibir o crescimento do organismo (VINNICOMBE; DERRICK, 1999; NAMBA et al., 2008). Já inibidores que atuam sobre a enzima DHFR, como trimetoprim e pirimetamina, são utilizados para tratar doenças infecciosas causadas por bactérias e protozoários, respectivamente (HAWSER et al., 2006).

Devido à resistência desenvolvida contra os agentes antimicrobianos comumente utilizados, é necessário o desenvolvimento de novos inibidores clinicamente relevantes que possam contribuir para o tratamento de doenças infecciosas. Dessa forma, a descoberta de novos alvos é importante para a eficiência do tratamento (BERTACINE DIAS et al., 2018). A enzima di-hidroneopterina aldolase (DHNA) é a primeira enzima da via de biossíntese do folato que está ausente em humanos e não é um alvo para os antibióticos existentes, caracterizando-se por ser um potencial alvo molecular para o desenvolvimento de fármacos.

1.4 Proteína FolB (DHNA/FolB)

A proteína FolB, codificada pelo gene *folB*, é conservada entre as espécies bacterianas e até o momento nenhum homólogo foi identificado em mamíferos (GOULDING et al., 2005). Em *Mycobacterium tuberculosis*, esta proteína apresenta três atividades: aldolase, epimerase e oxigenase (CZEKSTER; BLANCHARD, 2012).

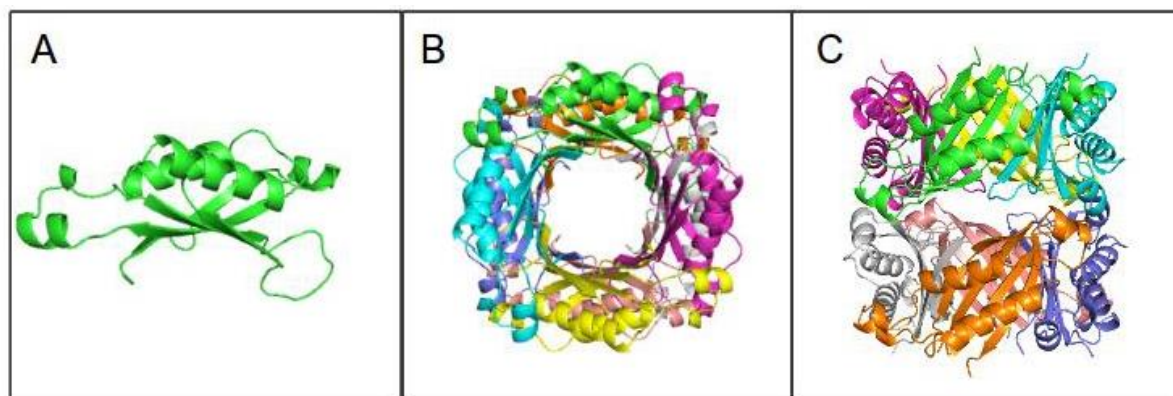
A enzima *Mt*DHNA/FolB, com a atividade de aldolase, é responsável por converter, de maneira reversível, 7,8-di-hidroneopterina (DHNP) ou 7,8-di-hidromonapterina (DHMP) a 6-hidroximetil-7,8-di-hidropterina (HP) e glicaldeído (GA) durante a biossíntese de folato. Com sua atividade de epimerase catalisa a interconversão entre DHNP e DHMP. Além disso, produz 7,8-di-hidroxantopiterina (DHXP) com a atividade de oxigenase (BLASZCZYK et al., 2007; CZEKSTER; BLANCHARD, 2012).

A estrutura cristalográfica da enzima DHNA tem sido resolvida em diferentes organismos (Figura 5), como *Staphylococcus aureus* (ID: 1DHN) (HENNING et al., 1998), *Arabidopsis thaliana* (ID: 1N05) (BAUER et al., 2004), *Mycobacterium tuberculosis* (ID: 1NBU) (GOULDING et al., 2005), *Streptococcus pneumoniae* (ID: 2CG8) (GARÇON et al., 2006) e *Escherichia coli* (ID: 2O90) (BLASZCZYK et al.,

2014). Foi observado que a estrutura de DHNA em *S. aureus* e *A. thaliana* se mantem em seu estado octamérico com e sem substrato, enquanto em *M. tuberculosis* o estado octamérico é mantido apenas quando está complexada ao produto HP e na sua forma apo assume um estado tetramérico, indicando que a ligação de DHNP pode regular alostericamente a enzima *MtDHNA* (GOULDING et al., 2005).

O sítio ativo da DHNA está localizado na interface entre duas subunidades adjacentes, de modo que uma parte do sítio ativo é formada por um monômero enquanto o outro é formado por um segundo monômero, resultando em quatro sítios ativos por tetrâmero. Nos sítios ativos, há quatro resíduos conservados que interagem com o produto HP. Estes resíduos são E22, Y54, E74 e K100 em *SaDHNA*, correspondente a E21, Y53, E73 e K98, respectivamente, em *EcDHNA*. Estudos de mutagênese sítio-dirigida nestes organismos sugeriram que os resíduos E74 de *SaDHNA* e E73 de *EcDHNA* são importantes para ligação de substrato, mas seus papéis na catálise são menores. Por outro lado, os resíduos E22 e K100 de *SaDHNA* são importantes para a catálise, mas menos importantes para a ligação do substrato e E21 e K98 de *EcDHNA* são importantes tanto para a ligação do substrato quanto para a catálise (WANG et al., 2006). Em *M. tuberculosis*, mutações pontuais K99A e Y54F foram responsáveis pela perda das atividades de aldolase e epimerase. Além disso, quando as sequências dos mutantes K99A ou Y54F foram usadas para complementação gênica em mutantes nulos para o gene *folB*, não foram obtidas colônias viáveis, indicando que as atividades de aldolase e/ou epimerase são essenciais para a sobrevivência do *M. tuberculosis* (FALCÃO et al., 2017).

Figura 5 - Estrutura cristalográfica da di-hidroneopterina aldolase de *Staphylococcus aureus* (SaDHNA)



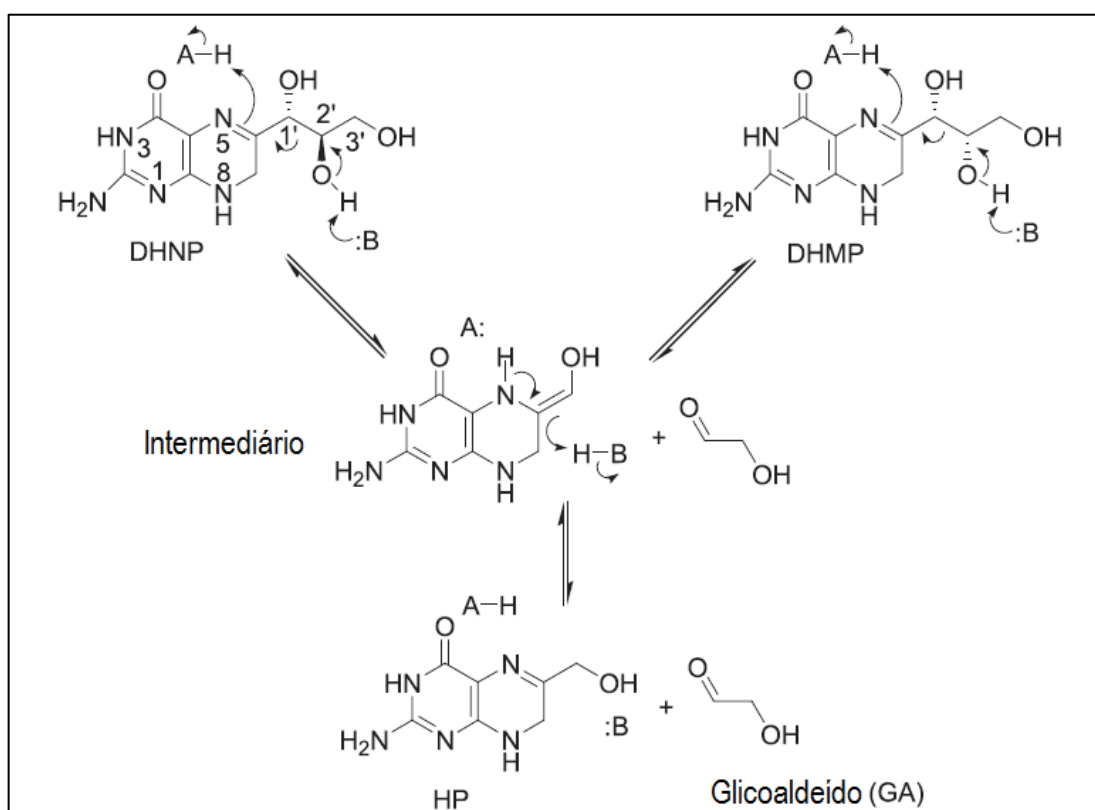
A. Monômero de SaDHNA, mostrando a estrutura de um único domínio, que apresenta uma folha β antiparalela, duas longas hélices α e dois segmentos helicais curtos. **B.** Octâmero de SaDHNA, vista superior. **C.** Octâmero de SaDHNA, vista lateral. Observe que a estrutura é composta por dois tetrâmeros em orientação “head-to-head”, que em conjunto formam um cilindro oco. Figura elaborada utilizando Polyview-3D (Porollo; Meller, 2007) a partir de estrutura obtida do PDB (ID:1DHN).
Fonte: Falcão (2017).

Aldolases são divididas em duas classes de acordo com seu mecanismo de catálise. A Classe I ativa seus substratos pela formação de uma base de Schiff entre o substrato e a enzima, através de um resíduo de lisina conservado no sítio ativo; a Classe II, por sua vez, ativa seu substrato utilizando como cofator um íon Zn^{2+} ligado por resíduos de histidina no sítio ativo (WANG et al., 2006; DEAN et al., 2007). No entanto, *MtDHNA*/FolB é uma aldolase única, em que a catálise não requer a formação de uma base de Schiff entre a enzima e o substrato e tampouco íons metálicos como cofatores. No entanto, apesar da base de Schiff se encontrar incorporada no próprio substrato, o mecanismo catalítico de *MtDHNA*/FolB se assemelha ao de aldolases de Classe I (WANG et al., 2006).

O mecanismo de reação de *MtDHNA*/FolB é classificado como catálise ácido-base geral devido à protonação do nitrogênio N5 do anel pterínico e desprotonação da hidroxila 2'-OH do grupo tri-hidroxipropil do substrato DHNP. Forma-se um fio condutor de prótons que conecta N5 e 2'-OH de DHNP através de K100, levando à formação de um intermediário enólico pela quebra da ligação C1'-C2'. Nesta reação, o ácido doador geral é uma molécula de água catalítica, que interage com o N5 de DHNP e a base doadora geral é uma lisina conservada (K100) que desprotona o grupo 2'-OH do substrato (WANG et al., 2007; BERTACINE DIAS et al., 2018). Para a produção de 6-hidroximetil-7,8-di-hidropterina ocorre a protonação adicional do grupamento enol do intermediário formado. A reformação da ligação C-C pode resultar

tanto em DHNP quanto em DHMP, pois trata-se de uma reação sem seletividade estereoquímica. Dessa forma, é notável que o intermediário formado nas reações aldólica e de epimerização é o mesmo (Figura 6) (WANG et al., 2007). O mecanismo da reação de epimerização é muito semelhante ao catalisado pela L-ribulose-5-fosfato-4-epimerase, mesmo que DHNA/FoIB seja estruturalmente diferente desta enzima e não tenham similaridade de sequências (BLASZCZYK et al., 2007).

Figura 6 - Mecanismo catalítico de DHNA/FoIB pelas atividades de aldolase e epimerase



DHNP: 7,8-di-hidroneopterina; DHMP: 7,8-di-hidromonapterina; HP: 6-hidroxi-metil-7,8-di-hidropterina
Fonte: Wang et al. (2007).

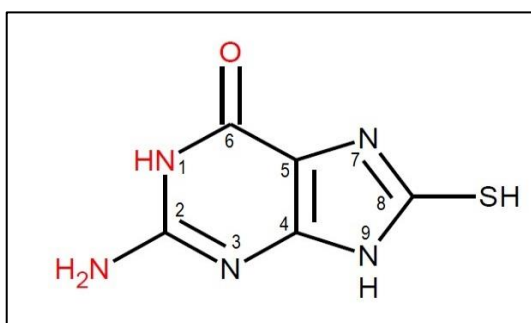
1.5 Inibidores da DHNA/FoIB

Compostos com potencial de inibir a DHNA estão sendo pesquisados. Uma análise a partir de triagem cristalográfica (CrystaLEAD) utilizando uma biblioteca com 10.000 compostos contra DHNA de *Staphylococcus aureus* (SaDHNA) permitiu a identificação de compostos-líder com atividade inibitória e valores de IC₅₀ em torno de 1 μM. Nestes compostos foi observado uma subestrutura em comum, que consiste em H₂N-C-NH-C=O, sugerindo uma estratégia para a construção de uma biblioteca dirigida de aproximadamente 1.000 compostos contendo esta subestrutura para um

melhor resultado de atividade inibitória contra SaDHNA (SANDERS et al., 2004).

O composto 8-mercaptoguanina (8-MG) (Figura 7) foi um dos compostos identificados através de CrystaLEAD e selecionados para a sub-biblioteca, caracterizando-se por ser um inibidor contra SaDHNA, com IC₅₀ de 1 µM. De acordo com os dados de cristalografia de raios X, estruturalmente, o composto 8-MG intercala semelhante ao substrato pterínico, envolvendo interações de hidrogênio entre a subestrutura H₂N-C-NH-C=O com os resíduos de aminoácidos E74 e L73 (SANDERS et al., 2004).

Figura 7 - Estrutura química do composto 8-mercaptoguanina



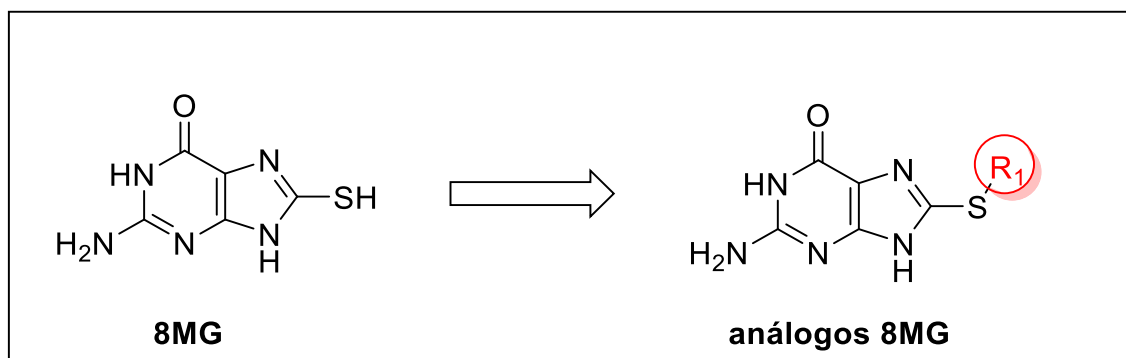
Subestrutura H₂N-C-NH-C=O representada em vermelho.

Fonte: Adaptado de Sanders et al. (2004).

Além disso, 8-MG foi identificado como potencial inibidor da enzima 6-hidroxi-metil-7,8-di-hidropterina-pirofosfoquinase de *Staphylococcus aureus* (SaHPPK), outra enzima da via de biossíntese do folato, através de uma triagem *in silico* baseada em estrutura (CHHABRA et al., 2012). Resultados *in vitro* demonstraram uma boa eficiência de ligação de 8-MG a SaHPPK e atividade inibitória, com uma constante de dissociação (K_d) de aproximadamente 13 µM e IC₅₀ de 41 µM.

Estudos de relação estrutura-atividade (SAR) foram realizados a fim de identificar análogos estruturais do composto 8-MG com maior potencial para inibir enzimas da via de biossíntese do folato. A partir disso, foi demonstrado que derivados de 8-MG de cadeia alquílica e arílica estendida no enxofre (S-8) (Figura 8) interagiram com maior afinidade com as enzimas HPPK de *S. aureus* (SaHPPK) e de *Escherichia coli* (EcHPPK) e com a enzima di-hidropteroato sintase de *E. coli* (EcDHPS) que derivados com substituições nas posições N9 e N7, apresentando K_d menor que o composto líder 8-MG (CHHABRA et al., 2013; DENNIS et al., 2014; DENNIS et al., 2016; DENNIS et al., 2018).

Figura 8 - Derivatização química de 8-mercaptoguanina



R₁ = aril ou alquil.

Fonte: Adaptado de Dennis et al. (2014).

Entretanto, até o momento não foi relatado nenhum estudo utilizando 8-MG ou seus análogos estruturais como inibidores da enzima *MtDHNA*. Dessa forma, considerando os dados apresentados acima, este estudo tem por objetivo avaliar o potencial inibitório do composto 8-MG e 19 análogos estruturais com substituições na posição S-8 (Tabela 2) previamente sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa sobre a enzima *MtDHNA*.

Tabela 2 - 8-mercaptoguanina (8-MG) e seus análogos estruturais S-8 substituídos previamente sintetizados.

Composto ^a	Estrutura	Composto ^a	Estrutura
8-MG (1)		3b	
2a		3c	
2b		4a	
2c		4b	
2d		4c	
2e		4d	
2f		4e	
2g		4f	
2h		4g	
3a		4h	

^a Os compostos estão numerados conforme o manuscrito

2. JUSTIFICATIVA

A tuberculose é uma das doenças mais antigas que aflige a população mundial devido ao alto índice de incidência e mortalidade, proliferação de cepas resistentes aos fármacos anti-TB disponíveis e à dificuldade de tratamento para pacientes coinfectados com HIV/TB. Dessa forma, são necessários novos tratamentos antituberculose (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

As enzimas da via de biossíntese do folato são potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos para doenças infecciosas, uma vez que esta via está presente em microrganismos patogênicos e ausente em humanos (BERTACINE DIAS et al., 2018). Compostos com potencial de inibir essas enzimas estão sendo pesquisados. Entretanto, não foram relatados inibidores para a enzima DHNA de *Mycobacterium tuberculosis*, a qual caracteriza-se por ser um potencial alvo para o desenvolvimento de fármacos antituberculose por ser essencial para a sobrevivência do bacilo. Portanto, a compreensão da inibição desta enzima é uma etapa importante para o desenvolvimento de novos fármacos que possam contribuir para o tratamento da tuberculose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial inibitório de compostos da classe 8-mercaptoguanina sobre a enzima di-hidroneopterina aldolase de *Mycobacterium tuberculosis*.

3.2 Objetivos Específicos

- a. Otimizar ensaio contínuo de atividade de aldolase da enzima *MtDHNA* baseado na detecção da formação do produto HP por espectrofluorimetria;
- b. Avaliar a atividade dos compostos da classe 8-mercaptoguanina sobre a enzima *MtDHNA* por meio da determinação de IC_{50} ;
- c. Determinar o perfil de inibição dos compostos da classe 8-MG selecionados a partir do ensaio de determinação da constante inibitória (K_i);
- d. Caracterizar estruturalmente o modo de interação entre a proteína e compostos selecionados da classe 8-MG por meio de experimentos *in silico* de docagem molecular;
- e. Avaliar o potencial inibitório dos compostos da classe 8-MG frente à cepa laboratorial H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.

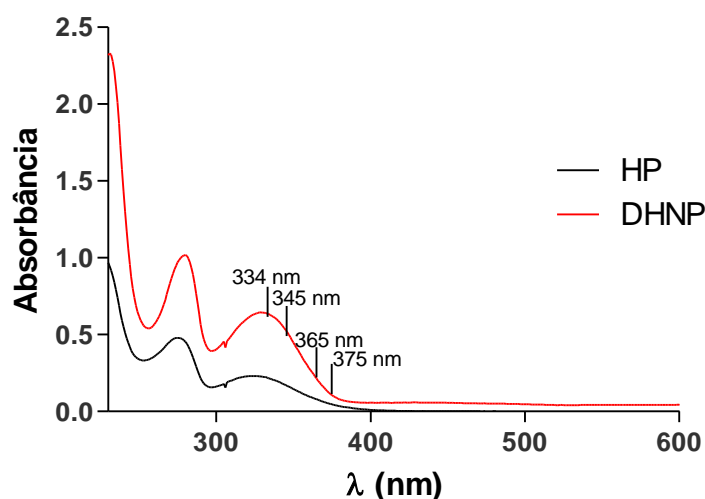
CAPÍTULO 2

PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO CONTÍNUO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR ESPECTROFLUORIMETRIA

Foi otimizado um método contínuo por espectrofluorimetria para monitorar a reação de conversão de DHNP a HP catalisada pela enzima *MtDHNA* (atividade de aldolase) (CZEKSTER; BLANCHARD, 2012). Para tanto, foram realizados ensaios para determinar os comprimentos de onda de emissão e de excitação mais adequados para monitorar a formação do produto HP.

Primeiramente, foram realizadas varreduras dos espectros de absorbância dos compostos DHNP e HP isolados (100 μM) por meio de um espectrofotômetro (UV-2550 UV/Visible spectrophotometer; Shimadzu). Os comprimentos de onda foram variados de 230 a 600 nm, e os espectros dos dois compostos foram sobrepostos, com o propósito de se identificar os comprimentos de onda correspondentes à maior diferença de absorbância entre DHNP e HP (Figura 9).

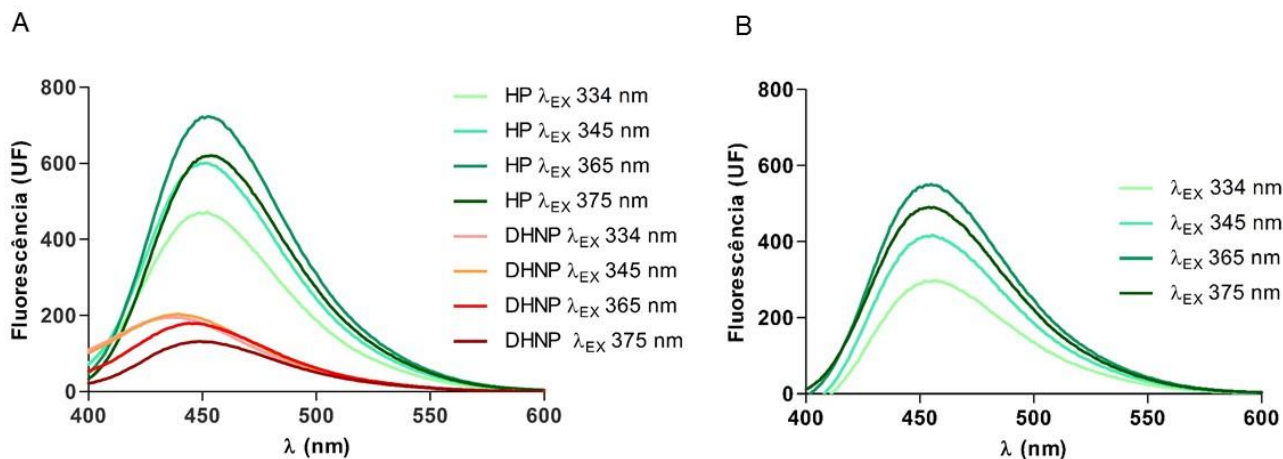
Figura 9 - Espectros de absorbância de DHNP e HP a 100 μM



Fonte: Produção do próprio autor.

Para determinar o melhor comprimento de onda de excitação, os comprimentos de onda selecionados a partir dos espectros de absorbância (334 nm, 345 nm, 365 nm e 375 nm) foram fixados como os comprimentos de onda de excitação para realizar a varredura dos espectros de emissão (400 – 600 nm) de DHNP e HP por espectrofluorimetria (RF-5301 spectrofluorophotometer; Shimadzu). O espectro de emissão de DHNP foi subtraído do espectro de HP para cada condição avaliada, tendo-se obtido a maior diferença de emissão de fluorescência no comprimento de excitação de 365 nm (Figura 10).

Figura 10 - Espectros de emissão de DHNP e HP.

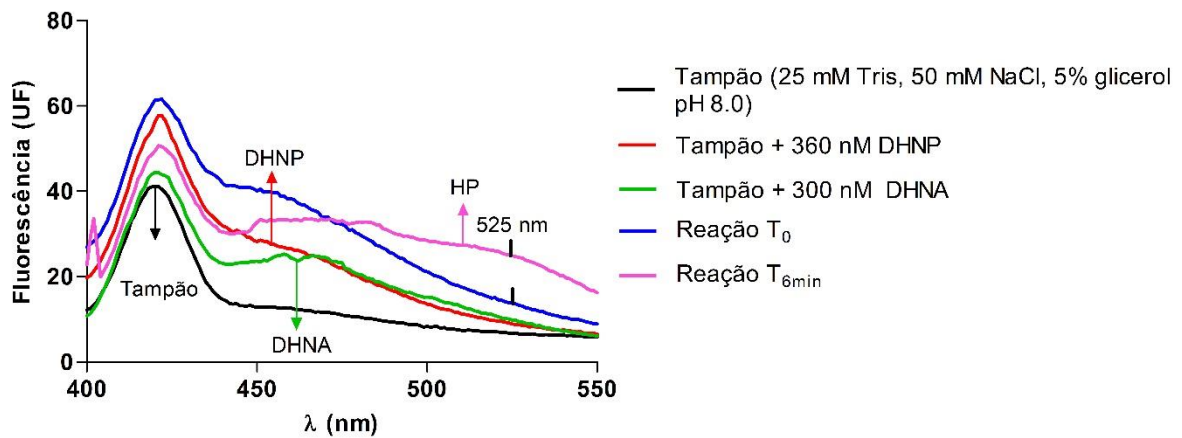


(A) Espectros de emissão de DHNP e HP com comprimentos de onda de excitação de 334 nm, 345 nm, 365 nm, 375 nm. (B) Diferença entre os espectros de emissão de DHNP e HP com comprimentos de onda de excitação de 334 nm, 345 nm, 365 nm, 375 nm.

Fonte: Produção do próprio autor.

Uma vez definido o comprimento de onda de excitação adequado ($\lambda_{EX} = 365 \text{ nm}$) para monitorar a atividade de aldolase da *MtDHNA*, foram obtidos os espectros de emissão nos tempos de 0 e 6 minutos de reação utilizando espectrofluorofotômetro (RF-5301 spectrofluorophotometer; Shimadzu), variando λ_{EM} de 400 a 550 nm. Os slits determinados foram de 10 nm e 15 nm para excitação e emissão, respectivamente. A reação padrão foi realizada a 25 °C em 25 mM Tris, 50 mM NaCl, 5% glicerol pH 8.0, contendo 360 nM do substrato DHNP e 300 nM da enzima *MtDHNA*. Para determinar o comprimento de onda de emissão que permita a detecção da formação do produto HP, sem interferência do sinal de fluorescência dos constituintes da reação, foram obtidos os espectros de emissão do tampão, da enzima e do substrato nas mesmas condições da reação (Figura 11).

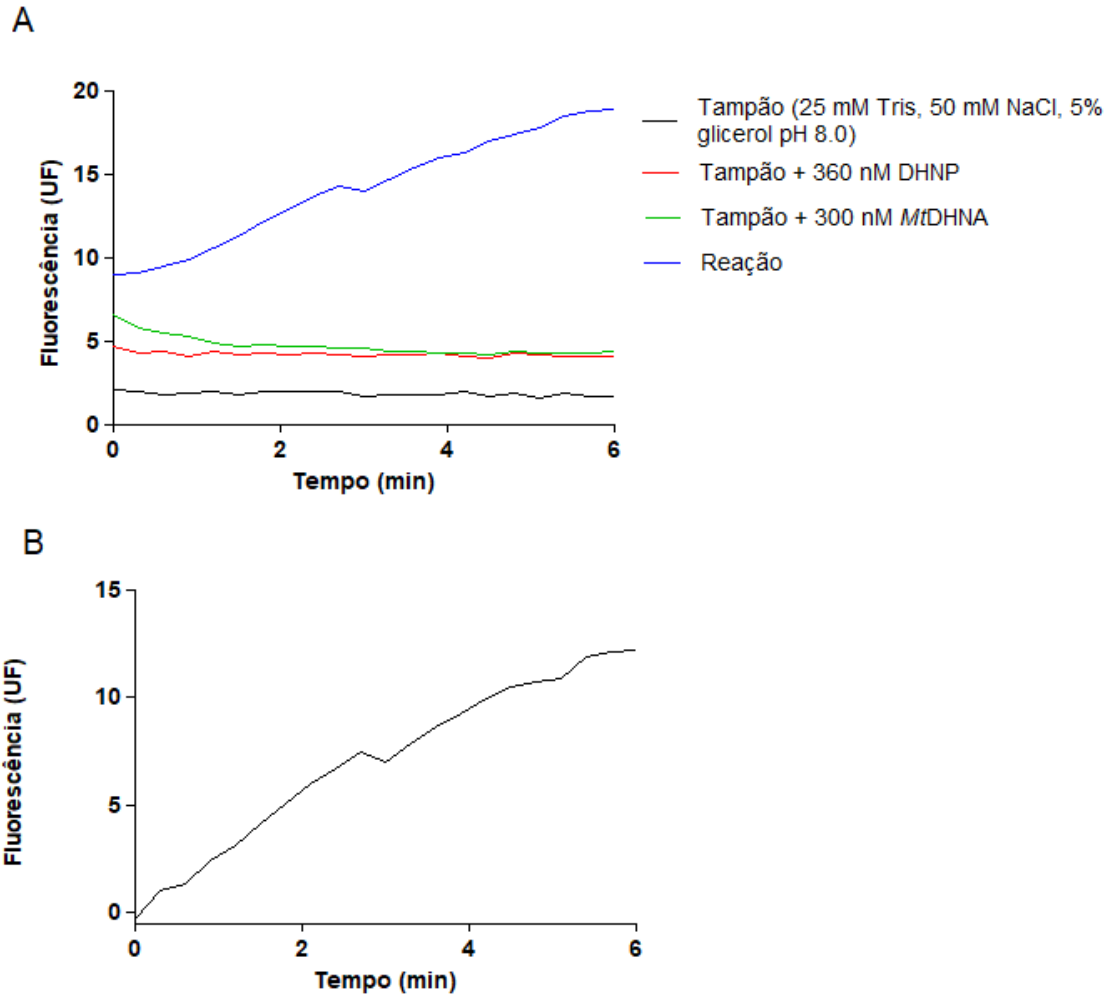
Figura 11 - Espectros de emissão da reação de aldolase da *MtDHNA* com λ_{EX} de 365 nm



Fonte: Produção do próprio autor.

A validação dos comprimentos de onda de excitação e emissão determinados foi realizada monitorando de maneira contínua a reação de aldolase da *MtDHNA* por 6 minutos. A reação foi realizada nas condições da reação padrão. Os comprimentos de onda utilizados foram 365 nm para excitação e 525 nm para emissão, e os slits de 10 nm para excitação e 15 nm para emissão. O tampão, a enzima e o substrato foram utilizados como controles na determinação da fluorescência proveniente do produto da reação (Figura 12).

Figura 12 - Reação contínua de aldolase da *MtDHNA* com λ_{EX} de 365 nm e λ_{EM} de 525 nm.



(A) Reação contínua de aldolase da *MtDHNA*, espectro do substrato DHNP, da enzima *MtDHNA* e do tampão 25 mM Tris, 50 mM NaCl, 5% glicerol pH 8.0. (B) Espectro de fluorescência do produto da reação (HP) formado.

Fonte: Produção do próprio autor.

Dessa maneira, os parâmetros do ensaio contínuo da atividade de aldolase da enzima *MtDHNA* necessários para a detecção da formação do produto HP por espectrofluorimetria foram determinados: λ_{EM} 365 nm, λ_{EX} 525 nm, slits de excitação 10 nm e emissão 15 nm. Este método de análise de atividade enzimática foi utilizado no manuscrito a seguir.

CAPÍTULO 3

ARTIGO CIENTÍFICO

(Submetido ao Periódico Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. Fator de Impacto: 4,310)

8-Mercaptoguanine-based inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Dihydroneopterin Aldolase: synthesis, *in vitro* inhibition and docking studies

Alexia de Matos Czczot^{a,b}, Candida Deves Roth^a, Rodrigo Gay Ducati^{a,d}, Kenia Pissinate^a, Raoní Scheibler Rambo^a, Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers^d, Bruno Lopes Abbadi^a, Fernanda Souza Macchi^{a,b}, Víctor Zajaczkowski Pestana^a, Luiz Augusto Basso^{a,b,c}, Pablo Machado^{a,b} and Cristiano Valim Bizarro^{a,b,*}

^aInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^dPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, Brazil.

* Corresponding author. Av. Ipiranga 6681 - Prédio 92A, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

E-mail address: cristiano.bizarro@puers.br (Cristiano Valim Bizarro).

8-Mercaptoguanine derivatives as inhibitors against *Mt*DHNA: synthesis, *in vitro* inhibition and molecular docking

The dihydroneopterin aldolase (DHNA, EC 4.1.2.25) activity of FolB protein is required for the conversion of 7,8-dihydroneopterin (DHNP) to 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin (HP) and glycolaldehyde (GA) in the folate pathway. FolB protein from *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*DHNA/*Mt*FolB) is essential for bacilli survival and represents an important molecular target for drug development. S8-functionalized 8-mercaptoguanine derivatives were synthesized and evaluated for inhibitory activity against *Mt*FolB. The compounds showed IC₅₀ values in the submicromolar range. The inhibition mode and inhibition constants were determined for compounds that exhibited the best potencies. Additionally, molecular docking analyses were performed to suggest enzyme-inhibitor interactions and ligand conformations. To the best of our knowledge, this study describes the first class of *Mt*FolB inhibitors.

Keywords: Tuberculosis; Dihydroneopterin aldolase; 8-mercaptoguanine; *Mt*DHNA/*Mt*FolB inhibition.

Introduction

Tuberculosis (TB) is one of the oldest diseases that remain a health concern worldwide due to high incidence and mortality rates. According to the World Health Organization (WHO), in 2018, 10 million new TB cases were estimated and 1.2 million deaths were reported¹. Duration and complexity of treatment, and drug side effects result in poor adherence, suboptimal response, treatment failure, emergence of drug resistance, and continuous disease spread. Within this context, it is clear that new antituberculosis therapies are necessary. Thus, the discovery of new targets is important for treatment success^{2,3}.

Folate and its derivatives act as cofactors in the biosynthesis of purines, pyrimidines and amino acids. Enzymes of the folate biosynthesis pathway are attractive antimicrobial drug targets due to the presence of this pathway in many pathogenic microorganisms and its absence in mammals⁴. Antifolates interrupt the production of folate and its derivatives by inhibiting key enzymes in the folate metabolic pathway⁵. Among the enzymes of this pathway, only dihydropteroate synthase (DHPS) and dihydrofolate reductase (DHFR) are used as targets for antimicrobial agents⁶. Despite the antimycobacterial activity of antifolates in culture and the use of *para*-aminosalicylic acid (PAS) as a second-line drug, these molecules are not used in the first-line treatment of TB^{7,8}. The FolB protein, encoded by the *folB* gene, is a dihydroneopterin aldolase enzyme (DHNA, EC 4.1.2.25), as it converts 7,8-dihyroneopterin (DHNP) to 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin (HP) and glycolaldehyde (GA) in the third step of the folate pathway. FolB from *Mycobacterium tuberculosis* (*MtFolB/MtDHNA*) is also a dihydromonapterin (DHMP) aldolase, converting DHMP to HP and GA, an epimerase, interconverting DHNP and DHMP, and an oxygenase, producing 7,8-dihydroxantopterin (DHXP) from either DHNP or DHMP⁹. This protein is the first of the three enzymes from the folate pathway that are absent in mammals and represents an attractive target for the development of antimicrobial agents⁴.

We have shown previously that the *folB* gene from *M. tuberculosis* is essential for bacilli survival under defined conditions and that its essentiality depends on the aldolase and/or epimerase activities of *MtFolB* protein¹⁰. This paved the way for the development of *MtFolB* aldolase/epimerase inhibitors as potential anti-TB agents. Compounds with inhibitory activity against the orthologous enzyme from *Staphylococcus aureus* (*SaFolB/SaDHNA*) were previously identified in a high-throughput X-ray crystallographic screening using an initial library with 10 000 compounds¹¹. In this same study, a new sublibrary of approximately 1 000 compounds was constructed, all containing the H₂N-C-NH-C=O substructure in common.

Several hit compounds with low IC₅₀ values against *SaFolB* were identified, including 8-mercaptoguanine (8-MG), with an IC₅₀ value of 1 μM. X-ray crystallography revealed that the H₂N-C-NH-C=O substructure shared by 8-MG, the substrate analogue neopterin and also the product HP presented hydrogen bonds with the same *SaFolB* residues in these three ligand-protein complexes¹¹. Furthermore, 8-MG inhibits 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase from *S. aureus* (*SaHPPK*), another enzyme of the folate pathway, with an IC₅₀ value of 41 μM¹². Structure-activity relationship (SAR) studies have been performed to identify structural analogues of 8-MG with greater potential to inhibit enzymes from the folate biosynthesis pathway. S8-functionalized derivatives of 8-MG with improved affinity for both *SaHPPK* and *Escherichia coli* HPPK (*EcHPPK*) were reported^{13,14}.

In this study, we investigate the inhibitory potential of 8-MG and S8-functionalized 8-MG derivatives against *MtFolB*. We synthesized 19 S8-functionalized compounds using 8-MG as a scaffold and evaluated their inhibitory activity *in vitro* against *MtFolB* enzyme. In this way, we identified new inhibitors for *MtFolB* and provided the mode of inhibition of the top hits. We simulated the enzyme-inhibitor interactions by molecular docking and evaluated the growth inhibitory activities for *Mtb in vitro* for 8-MG and the derivatives reported here.

Materials and methods

Chemical synthesis

Reagents, chemicals, starting materials and solvents were obtained from commercial sources and used without further purification. Melting points were determined on an Microquímica MQAPF-302 apparatus. IR spectra were recorded on Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR spectrometer with a Universal ATR sampling accessory. NMR spectra were recorded on a Avance III HD Bruker spectrometer with chemical shifts values (δ) in ppm relative to TMS using the residual DMSO-*d*₆ signal as an internal standard. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on an LTQ Orbitrap Discovery mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). This system combines an LTQ XL linear ion-trap mass spectrometer and an Orbitrap mass analyzer. The analyses were performed through the direct infusion of the sample in MeOH/CH₃CN (1:1) with 0.1% formic acid (flow rate of 10 μL/min) in positive-ion mode using electrospray ionization (ESI). For the elemental composition, the calculations used the specific tool included in the Qual Browser module of Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, release 2.0.7) software.

General procedure for synthesis of compounds **2a–h**

Compounds **2a–h** were synthesized as previously described in the literature¹³. In brief, 8-mercaptoguanine (0.2 g, 1.09 mmol) was dissolved in 0.5 M NaOH (5.5 mL) resulting in a real solution. To this solution was added the respective benzyl bromide (1.2 mmol) in ethanol (0.9 mL). The reaction was stirred for 4 hours at 25 °C and the precipitated formed was collected by vacuum filtration affording the title compound as a white-yellowish amorphous solid.

2-Amino-8-(benzylthio)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (2a). 80% yield. MP = 270-273 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.55 (bs, 1H), 10.63 (bs, 1H), 7.47–7.20 (m, 5H), 6.34 (bms, 2H), 4.40 (d, *J*=4.5 Hz, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3321, 3086, 1651. HRMS (ESI): calc. for [C₁₂H₁₁N₅OS+H]⁺: 274.0757; obt.: 274.0748.¹³

2-Amino-8-((naphthalen-2-ylmethyl)thio)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (2b). 60% yield. MP = 286-287 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.59 (bs, 1H), 10.59 (bs, 1H), 7.99–7.78 (m, 4H), 7.63–7.39 (m, 3H), 6.31 (bs, 2H), 4.58 (s, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3325, 3103, 2869, 1671, 1653. HRMS (ESI): calc. for [C₁₆H₁₃N₅OS+H]⁺: 324.0914; obt.: 324.0910.¹⁵

2-Amino-8-((2-fluorobenzyl)thio)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (2c). 65% yield. MP = 289-290 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.57 (bs, 1H), 10.57 (bs, 1H), 7.50–7.27 (m, 2H), 7.24–7.07 (m, 2H), 6.36 (s, 2H), 4.38 (s, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3324, 3102, 2879, 1673, 1651. HRMS (ESI): calc. for [C₁₂H₁₀FN₅OS+H]⁺: 292.0663; obt.: 292.0652.¹³

2-amino-8-((4-fluorobenzyl)thio)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (2d). 55% yield. MP = 299-300 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.53 (bs, 1H), 10.58 (bs, 1H), 7.41 (t, *J*=6.9 Hz, 2H), 7.21–7.05 (m, 2H), 6.34 (bs, 1H), 4.38 (s, 2H). IR-ATR (cm⁻¹) 3324, 3103, 2860, 1652. HRMS (ESI): calc. for [C₁₂H₁₀FN₅OS+H]⁺: 292.0663; obt.: 292.0670.¹⁴

2-Amino-8-((2-chlorobenzyl)thio)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (2e). 80 % yield. MP=301-302 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.53 (bs, 1H), 10.54 (bs, 1H), 7.53–7.42 (m, 2H), 7.28 (m, 2H), 6.24 (s, 2H), 4.48 (s, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3310, 3101, 2880, 1659. HRMS (ESI): calc. for [C₁₂H₁₀ClN₅OS+H]⁺: 308.0367; obt.: 308.0358.¹⁴

2-Amino-8-((4-chlorobenzyl)thio)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (2f). 82% yield. MP = 291-294 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.55 (bs, 1H), 10.63 (bs, 1H), 7.38 (d, *J*=10.2 Hz, 4H), 6.32 (bs, 2H), 4.38 (s, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3328, 3097, 2865, 1653. HRMS (ESI): calc.

for $[\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{OS}+\text{H}]^+$: 308.0367; obt.: 308.0376.¹⁴

2-Amino-8-((2,4-dichlorobenzyl)thio)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (2g). 76% yield. MP = 290-291 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.64 (bs, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.54 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 7.33 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 6.33 (bs, 2H), 4.37 (s, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3413, 3276, 3146, 1677. HRMS (ESI): calc. for $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_5\text{OS}+\text{H}]^+$: 341.9978; obt.: 341.9971.

2-Amino-8-((4-bromobenzyl)thio)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (2h). 80% yield. MP = 301-302 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.53 (bs, 1H), 10.60 (d, *J*=41.2 Hz, 1H), 7.61–7.21 (m, 4H), 6.25 (d, *J*=74.4 Hz, 2H), 4.38 (d, *J*=27.6 Hz, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3328, 3173, 3098, 2864, 1653. HRMS (ESI): calc. for $[\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{BrN}_5\text{OS}+\text{H}]^+$: 351.9862; Obt.: 351.9861.¹⁴

General procedure for synthesis of compounds **3a–c** and **4a–h**

Compounds **3a–c** and **4a–h** were synthesized according to an already reported protocol with minor modifications¹³. In brief, 8-mercaptoguanine (0.2 g, 1.09 mmol) was dissolved in 0.5 M NaOH (5.5 mL), and to the resulting solution was added the respective bromoacetamide or 2-bromoacetophenone (1.2 mmol) in ethanol (0.9 mL). The reaction was stirred for 24 h at 25 °C, then 1% acetic acid was added until pH = 5. The mixture was extracted with ethyl acetate, the organic layers were combined, dried with MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by *flash* column chromatography eluting a mixture of chloroform and methanol (9:1 → 1:1) or recrystallized in methanol to give the title compound as a white-yellowish amorphous solid.

2-Amino-8-((2-oxo-2-phenylethyl)thio)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (3a). 31% yield. MP > 310 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.51 (bs, 1H), 10.55 (bs 1H), 8.20–7.26 (m, 2H), 7.78–7.47 (m, 3H), 6.29 (bs, 2H), 4.85 (s, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3322, 3098, 2919, 1651. HRMS (ESI): calc. for $[\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}+\text{H}]^+$: 302.0706; obt.: 302.0706.¹³

2-Amino-8-((2-(4-chlorophenyl)-2-oxoethyl)thio)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (3b). 53% yield. MP = 300-316 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.53 (bs, 1H), 10.82 (bs, 1H), 8.04 (d, *J*=8.3 Hz, 2H), 7.63 (d, *J*=8.2 Hz, 2H), 6.52 (bs, 2H), 4.88 (d, *J*=37.0 Hz, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3094, 1673, 1586. HRMS (ESI): calc. for $[\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_2\text{S}+\text{H}]^+$: 336.0316; obt.: 336.0325.¹⁴

2-Amino-8-((2-(2-methoxyphenyl)-2-oxoethyl)thio)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (3c). 72%

yield. MP = 309-311 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.51 (bs, 1H), 10.54 (bs, 1H), 7.76–7.50 (m, 2H), 7.21 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 7.05 (td, *J*=7.5, 1.0 Hz, 1H), 6.35 (bs, 2H), 4.71 (s, 2H), 3.93 (s, 3H). IR-ATR (cm⁻¹): 3322, 3097, 1673, 1652. HRMS (ESI): calc. for [C₁₄H₁₃N₅O₃S+H]⁺: 332.0812; obt.: 332.0820.¹³

2-((2-Amino-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-8-yl)thio)-N-phenylacetamide (4a). 10% yield. MP = 291-293 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.53 (bs, 2H), 7.57 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.30 (t, *J*=7.9 Hz, 2H), 7.05 (t, *J*=7.4 Hz, 1H), 6.32 (bs, 2H), 4.07 (s, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3321, 3145, 3070, 1665. HRMS (ESI): calc. for [C₁₃H₁₂N₆O₂S+H]⁺: 317.0815; obt.: 317.0817.¹⁵

2-((2-Amino-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-8-yl)thio)-N-(naphthalen-2-yl)acetamide (4b). 80% yield. MP = 286-289 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.01 (bs, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.93–7.75 (m, 3H), 7.60 (dd, *J*=8.8, 2.1 Hz, 1H), 7.44 (dddd, *J*=27.2, 8.1, 6.8, 1.3 Hz, 2H), 7.36–7.13 (m, 1H), 6.34 (bs, 2H), 4.13 (s, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3320, 3147, 1666. HRMS (ESI): calc. for [C₁₇H₁₄N₆O₂S+H]⁺: 367.0972; obt.: 367.0964.

2-((2-Amino-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-8-yl)thio)-N-benzylacetamide (4c). 50% yield. MP = 270-271 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.54 (s, 1H), 10.55 (bs, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.33–7.17 (m, 5H), 6.39–6.32 (m, 2H), 4.30 (d, *J*=6.0 Hz, 3H), 3.92 (s, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3303, 3164, 2987, 2879, 1663. HRMS (ESI): calc. for [C₁₄H₁₄N₆O₂S+H]⁺: 331.0972; obt.: 331.0966.

2-((2-Amino-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-8-yl)thio)-N-(4-fluorophenyl)acetamide (4d). 59% yield. MP = 243-245 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.08 (bs, 1H), 7.76–7.54 (m, 2H), 7.27–7.08 (m, 2H), 6.39 (bs, 1H), 4.01 (d, *J*=2.9 Hz, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3073, 1615, 1507. HRMS (ESI): calc. for [C₁₃H₁₁FN₆O₂S+H]⁺: 335.0721; obt.: 335.0726.

2-((2-Amino-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-8-yl)thio)-N-(4-chlorophenyl)acetamide (4e). 38% yield. MP = 306-308 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.49 (bs, 1H), 10.69 (s, 1H), 7.72–7.53 (m, 2H), 7.46–7.30 (m, 2H), 6.71–6.55 (m, 2H), 4.10 (s, 2H). IR-ATR (cm⁻¹): 3073, 1615, 1507. HRMS (ESI): calc. for [C₁₃H₁₁ClN₆O₂S+H]⁺: 351.0425; obt.: 351.0428.

2-((2-Amino-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-8-yl)thio)-N-(4-bromophenyl)acetamide (4f). 84% yield. MP > 310 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.75 (bs, 1H), 7.62–7.54 (m, 2H),

7.53–7.46 (m, 2H), 6.37 (bs, 2H), 4.09 (s, 2H). IR-ATR (cm^{-1}): 3310, 3124, 1668. HRMS (ESI): calc. for $[\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrN}_6\text{O}_2\text{S}+\text{H}]^+$: 394.9912; obt.: 394.9920.

2-((2-Amino-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-8-yl)thio)-N-(4-propylphenyl)acetamide (4g). 80% yield. MP=299-301 °C. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.41 (bs, 1H), 7.48 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.11 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.48 (bs, 3H), 4.09 (s, 2H), 2.55–2.41 (m, 2H), 1.53 (p, $J=7.3$ Hz, 2H), 0.86 (t, $J=7.3$ Hz, 3H). IR-ATR (cm^{-1}): 2927, 1669, 1600, 1513. HRMS (ESI): Calc. for $[\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}+\text{H}]^+$: 359.1285; obt.: 359.1287.

2-((2-amino-6-oxo-6,9-dihydro-1H-purin-8-yl)thio)-N-(4-heptylphenyl)acetamide (4h). 80% yield. MP > 310 °C. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.83 (bs, 1H), 7.59–7.39 (m, 2H), 7.27–7.03 (m, 2H), 6.53 (bs, 2H), 4.32–3.99 (m, 2H), 1.52 (s, 2H), 1.24 (m, $J = 9.5$ Hz, 10H), 0.99–0.70 (m, 3H). IR-ATR (cm^{-1}): 3291, 3075, 2923, 2851, 1673, 1610. HRMS (ESI): Calc. for $[\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}+\text{H}]^+$: 415.1911; obt.: 415.1909.

Expression, purification, and continuous fluorescence-based enzyme activity assay

The expression and purification of recombinant *MtFolB* were performed as previously described¹⁰. A continuous fluorescence-based enzyme activity assay was optimized⁹ for monitoring the aldolase reaction of *MtFolB* (conversion of DHNP to HP and GA) by an increase in fluorescence due to HP formation on a RF-5301 spectrofluorophotometer (Shimadzu) with an excitation wavelength of 365 nm and fluorescence emission at 525 nm. The slits were 10 and 15 nm for excitation and emission, respectively. To determine the apparent steady-state kinetic constants, *MtFolB* activity was monitored at varying concentrations of DHNP (0.10 – 10 μM) using 300 nM *MtFolB* in 25 mM Tris, 50 mM NaCl, 5% glycerol pH 8.0 at 25°C for 6 min in a final volume of 1.0 mL. As controls, buffer, substrate and enzyme spectra were performed under the same conditions to subtract fluorescence intensities that were not coming from the reaction product. The data were fitted to Eq. 1 for a saturation curve, in which v is initial velocity, V_{max} is the maximum velocity, E_0 is the initial total enzyme concentration, S_T is the initial total substrate concentration, and K_M is the Michaelis–Menten constant for the substrate used⁹. A calibration curve ranging from 0.020 to 15 μM of HP was performed. The slope of the fluorescence emission at 525 nm as a function of HP concentration was applied to obtain the catalytic constant (k_{cat}) values for the aldolase reactions.

$$v = V_{\text{max}} \times \frac{(E_0 + S_T + K_M) - \sqrt{(E_0 + S_T + K_M)^2 - 4 \times E_0 \times S_T}}{2 \times E_0} \quad (1)$$

Enzyme inhibition assays

Enzyme inhibition studies were performed using a RF-5301 spectrofluorophotometer (Shimadzu), monitoring an increase in fluorescence at 525 nm for HP formation during 6 minutes. The presence of time-dependent inhibitory activity was evaluated for 8-MG and the compounds synthesized. For this analysis, 300 nM (final concentration) of recombinant *MtFolB* was preincubated with a fixed inhibitor concentration defined for each compound (final concentrations of 360 nM for 8-MG (**1**); 500 nM for **3b** and **4h**; 625 nM for **4g**, **4f** and **4e**; 830 nM for **4b** and **4d**; 1.0 μ M for **3a**; 1.25 μ M for **3c**, **2g** and **2f**; 1.65 μ M for **2b** and **2h**; 2.5 μ M for **4c**; 5 μ M for **2e** and **4a**; or 7 μ M for **2d**, **2c** and **2a**), which was then added at different times (up to 40 min) to the reaction mixture (DHNP at K_M value, 25 mM Tris, 50 mM NaCl, 5% glycerol pH 8.0 and final concentration of 2% DMSO). The change in initial velocity as a function of time was monitored and the percentage of inhibition was calculated. As a control, *MtFolB* was preincubated solely with DMSO at a maximum final concentration of 2% and added to the reaction mixture. All experiments were performed at 25°C.

The IC_{50} values for the compounds were determined in the reaction conditions aforementioned. We fixed DHNP at a non-saturating concentration ($\sim K_M$ value) and dissolved the compounds in DMSO at varied concentrations (8-MG (**1**) 0.1 – 1.0 μ M; **3b** and **4h** 0.1 – 1.2 μ M; **4g** and **4e** 0.2 – 2.5 μ M; **4f** 0.2 – 2.0 μ M; **4b** 0.2 – 3.0 μ M; **3a** 0.35 – 5 μ M; **4d** 0.4 – 4.0 μ M; **4a** 0.5 – 10.0 μ M; **3c** 0.6 – 3.0 μ M; **2f** 1.0 – 7.0 μ M; **2g** 1.0 – 15 μ M; **2b** 0.6 – 5.0 μ M; **2h** 1.5 – 15 μ M; **4c** 3.0 – 40 μ M; **2d**, **2c** and **2a** 2.0 – 30 μ M; **2e** 2.0 – 15 μ M). The maximal rate of the enzymatic reaction (100% of *MtFolB* activity) was determined with 2% DMSO in the absence of inhibitor. IC_{50} values were estimated using Eq. 2, where V_i and V_0 are, respectively, the reaction velocity in the presence and in the absence of inhibitor (I).

$$\frac{V_i}{V_0} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{IC_{50}}} \quad (2)$$

The determination of the mode of inhibition (competitive, noncompetitive, or uncompetitive) and the inhibition constants (K_{is} and/or K_{ii}) were performed for each selected inhibitor with an IC_{50} value $< 0.50 \mu$ M. The inhibition studies were carried out at varying concentrations of DHNP until saturation, and fixed-varied inhibitor concentrations. For 8-MG (**1**) the fixed-varied concentrations were 0.15 μ M, 0.30 μ M (varying DHNP 0.25 – 10 μ M) and 0.45 μ M (varying DHNP 0.35 – 10 μ M). For **3b** the fixed-varied concentrations were 0.20 μ M (varying DHNP 0.35 – 10 μ M), 0.40 μ M (varying DHNP 0.35 – 15 μ M), and 0.80 μ M (varying DHNP 0.5 – 20 μ M). For **4f** the fixed-varied concentrations were 0.30 μ M (varying DHNP 0.35 – 10 μ M), 0.50

μM and $0.70 \mu\text{M}$ (varying DHNP $0.5 - 15 \mu\text{M}$). For **4h** the fixed-varied concentrations were $0.30 \mu\text{M}$, $0.50 \mu\text{M}$ (varying DHNP $0.35 - 10 \mu\text{M}$), and $0.70 \mu\text{M}$ (varying DHNP $0.5 - 15 \mu\text{M}$). The enzyme concentration was constant at 300 nM throughout the assays. The mode of inhibition of compounds was determined from the straight-line patterns, and K_{is} and/or K_{ii} values toward DHNP were estimated using Eq. 3 or Eq. 4, which describe a noncompetitive and competitive inhibition, respectively. Data were fitted to the following equations

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{ii}}\right)} \quad (3)$$

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}}\right)} \quad (4)$$

where $[I]$ is the inhibitor concentration, $[S]$ is the substrate concentration, K_M and V_{\max} are the Michaelis–Menten constant and maximum velocity, respectively, K_{ii} is the overall inhibition constant for the enzyme–substrate–inhibitor complex and K_{is} is the overall inhibition constant for the enzyme–inhibitor complex¹⁶.

Molecular docking protocol

Molecular docking simulations were carried out to evaluate the orientation and binding affinity of 8-MG (**1**) and **4f**, previously tested using enzyme kinetics experiments, into the binding pocket of *MtFolB*. Prior to this, we performed a redocking procedure, using the crystallographic structures of *MtFolB* as a octamer (PDB ID 1NBU)¹⁷ aiming to verify whether the program could reproduce the ligand location found in the experimental structure. The flexible docking simulations were performed using PyrX-0.9.4¹⁸, where the AutoDock 4.2 is implemented¹⁹. The AutoDock software uses an empirical scoring function based on the free energy of binding. Among the stochastic search algorithms offered by the AutoDock suite, we chose the Lamarckian genetic algorithm (LGA) that is a hybrid approach, which combines genetic algorithm (as global search)²⁰ and Solis and West algorithm (as local search)²¹.

A grid box was created with $50 \times 50 \times 50$ points and a resolution of 0.375 \AA to include solely the protein's active site to reduce the computational cost. The molecular docking process was carried out with 60 independent runs for each docking simulation, an initial population of 400, a maximum number of 4 000 000 energy evaluation, and a maximum number of 27 000 generations. Mutation and crossover were applied to the population at rates 0.02 and 0.80, respectively.

Mycobacterium tuberculosis Inhibition Assay

The inhibitory potential of the compounds was evaluated against *M. tuberculosis* H37Rv reference strain (ATCC 27294) by the resazurin reduction microplate assay (REMA) as previously described²². Stock solutions (0.5 mg mL⁻¹ for 8-MG (**1**) and 2 mg mL⁻¹ for all other test compounds) were made in neat DMSO (Sigma-Aldrich) and aliquots were stored at -20°C. The assays were performed in Difco™ Middlebrook 7H9 broth (Becton Dickinson – BD) supplemented with 10% (v/v) BBL™ Middlebrook ADC enrichment (albumin, dextrose and catalase – BD) and 2.5% (v/v) DMSO. The maximum concentration tested varied among compounds due to differences in solubility (2.5 - 40 µg mL⁻¹). The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by performing 10-point 2-fold serial dilutions for each compound. Three independent experiments were performed and MIC was considered as the lowest compound concentration that prevented the resazurin (Sigma-Aldrich) color conversion from blue (inhibition) to pink (growth). The MIC values stated for the compounds were the most frequent values among the three experiments, or the highest value observed.

Results and Discussion

The synthesis of compounds **2**, **3**, and **4** was accomplished through *S*-alkylation in a nucleophilic substitution reaction. Our strategy was the attachment of hydrophobic side chains to 8-mercaptoguanine (**1**) to obtain enzymatic inhibitors with physicochemical properties that could facilitate the permeability of the molecules and increase the chance of obtaining structures with potent antimycobacterial activity. The alkylating agents were chosen from different aryl(naphthyl) groups containing electron-donating and electron-withdrawing groups as substituents.

The dihydro-purinones **2a–h** were obtained from the reaction of 8-mercaptoguanine (**1**) and benzyl bromides in the presence of sodium hydroxide (NaOH) as a base and ethanol (EtOH) as the solvent. The reactants were stirred for 4 h at 25°C, leading to products **2a–h** with 55–82% yields (Scheme 1). Using the same conditions for 24 h, the compounds **3a–c** were synthesized by the reaction of 8-mercaptoguanine (**1**) and 2-bromo-1-arylethanones, with 43–72% yields (Scheme 1). Finally, using the same procedure above described, the dihydro-purinones **4a–h** were obtained from the reaction of 8-mercaptoguanine (**1**) and bromoacetamides, with 10–84% yields (Scheme 1). In general, the presence of a carbonyl group in the alkylating agent provided products in lower yields when compared to the reactions using benzyl bromides.

[Scheme 1 near here]

The synthesized compounds **2**, **3**, and **4** were evaluated for their ability to inhibit the *MtFolB* aldolase catalytic activity using a continuous fluorescence assay. The Michaelis–Menten constant (K_M) was determined at varying concentrations of DHNP until enzyme saturation (Figure S1, Supplementary Material). K_M and k_{cat} values of $1.42 \pm 0.13 \mu\text{M}$ and $0.011 \pm 0.0003 \text{ s}^{-1}$ were obtained, respectively. The values determined here differ from the values previously reported for this enzyme ($K_M = 0.165 \pm 0.026 \mu\text{M}$ and $k_{cat} = 0.0054 \pm 0.0002 \text{ s}^{-1}$)⁹. This should be attributed to differences in the method of enzyme purification and the buffer and pH of the enzyme activity assay; changes in solution conditions can affect the apparent value of K_M , influencing the ability of the enzyme to combine with substrate¹⁶.

The inhibitory potential of 8-mercaptoguanine (8-MG) and the synthesized compounds was evaluated against *MtFolB*. No time dependence was demonstrated up to 40 minutes of preincubation with *MtFolB* (data not shown). The initial screening of 20 compounds showed inhibition with IC_{50} values ranging from 0.3 to 12.3 μM (Scheme 1).

Based on IC_{50} values, benzyl-containing compounds **2a-h** showed lower activity than 8-MG (**1**) (Scheme 1). The unsubstituted compound **2a** exhibited an IC_{50} of 7.1 μM whereas 8-MG has an IC_{50} of 0.3 μM for *MtFolB*. Compared to the benzyl derivative **2a**, the molecular volume increase with the use of the naphthyl group in the dihydro-purinone **2b** improved the activity more than 5-fold, leading to an IC_{50} of 1.3 μM . By contrast, the presence of a fluorine atom at the 2- (**2c**) or 4- (**2d**) position of the benzene ring led to molecules with reduced activities ($\text{IC}_{50} = 8.0 \mu\text{M}$). Once more, increasing molecular volume with change of fluorine by chlorine atom improved the inhibitory activity toward *MtFolB*, resulting in an IC_{50} of 4.2 and 2.2 μM for compounds **2e** and **2f**, respectively. Substitution with chlorine atoms at position 3 and 4 of the benzyl ring reduced the inhibitory activity of *MtFolB*. 3,4-Dichlorophenyl-substituted **2g** showed an IC_{50} of 5.5 μM , which was 2.5-fold higher than its monosubstituted analog, **2f**. Additionally, the 4-bromophenyl-substituted **2h** exhibited an IC_{50} of 3.0 μM , denoting that the classic bioisosteric replacement between the chlorine and bromine was able to maintain similar and reduced potencies.

In the second round, carbonyl-containing compounds **3** were evaluated as inhibitors of *MtFolB* activity. The presence of this hydrogen bond acceptor group could lead to more potent structures when compared to benzyl derivatives **2**. Indeed, dihydro-purinone **3** were more potent than their counterparts **2**. The phenyl derivative **3a** exhibited an IC_{50} of 0.9 μM . When chlorine atom was positioned at 4-position of the benzene ring in the compound **3b**, the capacity to inhibit the *MtFolB* was increased. The IC_{50} presented by structure **3b** was 0.3 μM . This IC_{50} value indicated an equipotent activity compared to that presented by molecule **1** (**8-MG**). The

presence of the methoxy group attached at the 2-position of the benzene ring yielded compound **3c**, which exhibited an IC_{50} of $1.3 \mu\text{M}$. This result demonstrates that this electron-donating group reduced in more than 4-fold the inhibitory capacity of this molecule when compared to the activity presented by structure **3b**.

In view of these results, our research focus was directed to the insertion of an amide group to the molecules. If ketone carbonyl groups were responsible for the increase in activity, the presence of a more potent hydrogen bond acceptor (amide) could lead to more potent inhibitors. Such hypothesis started to be evaluated by the unsubstituted derivative **4a** which showed an IC_{50} of $2.2 \mu\text{M}$. Similar to that observed with dihydro-purinones **2**, the presence of the naphthyl group significantly increased the inhibitory activity. The compound **4b** exhibited an IC_{50} of $0.7 \mu\text{M}$. Interestingly, the use of methylene as a spacer in the **4c** reduced the activity to a great extent. Structure **4c** presented IC_{50} of $12.3 \mu\text{M}$ which was near 5.6-fold less active than phenyl derivative **4a**. This result denotes that the amide planarity can be crucial for the activity showed by the synthesized compounds. Dihydro-purinone **4d**, containing a fluorine atom at the 4-position of benzene ring, showed an IC_{50} of $2.0 \mu\text{M}$. When fluorine atom was changed by 4-chloro, the capacity to inhibit the *MtFolB* increased. The IC_{50} value of the compound **4e** was $0.8 \mu\text{M}$ which indicated a 2.5-fold increase in the inhibitory activity compared to that exhibited by 4-fluor-substituted structure **4d**. The bromine atom attached at the 4-position of **4f** yielded a molecule with IC_{50} of $0.5 \mu\text{M}$. Once more, increasing the volume of the substituent in this portion of the molecule seems to favor the improvement in the capacity of inhibit the *MtFolB* catalytic activity. Finally, positioning propyl (**4g**) and heptyl (**4h**) groups at 4-position of the benzene ring led to structures with IC_{50} of 0.9 and $0.4 \mu\text{M}$, respectively. Interestingly, bulky heptyl group provided similar activity to that presented by bromo-substituted **4f**. This finding indicates that there may be an important hydrophobic pocket surrounding this portion of the molecule after binding. However, further studies are needed to clarify this point.

Using an IC_{50} value $< 0.50 \mu\text{M}$ as threshold, the mode of inhibition of four compounds (8-MG (**1**), **3b**, **4f** and **4h**) was determined from Lineweaver–Burk plots. The data was fitted to the appropriate equations to give values for the inhibition constants (K_{is} and/or K_{ii})¹⁶ (Table 1). For 8-MG (**1**), **3b** and **4h**, the double-reciprocal plots resulted in a set of lines that intercept on the left of the *y*-axis (Figure 1A-C), indicating a noncompetitive inhibition mode. The *in vitro* inhibition constant values K_{ii} and K_{is} for these compounds were determined fitting to Eq. 3, where K_{is} ranged from $0.3 - 0.5 \mu\text{M}$ and K_{ii} ranged from $0.6 - 1.2 \mu\text{M}$. This analysis was consistent with a typical effect of a noncompetitive inhibitor with $K_{is} < K_{ii}$. The inhibitory profile suggests that compounds display binding affinity for both the free enzyme and the

enzyme–DHNP binary complex; and the inhibitor preferentially binds to the free enzyme¹⁶. For **4f**, the double-reciprocal plots resulted in a set of lines that intercept at the *y*-axis (Figure 1D), indicating a competitive inhibition mode. This inhibitor binds to the free enzyme, disrupting substrate binding¹⁶. Importantly, compound **4f** was found to have a lower K_{is} value ($0.1 \pm 0.03 \mu\text{M}$) than **8-MG** ($0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$) (see Table 1), indicating that this derivative is a more potent inhibitor than the scaffold molecule **1** (**8MG**).

[Table 1 near here]

[Figure 1 near here]

The interaction modes of compounds **8MG** and **4f** at the active site of *MtFolB* were evaluated using molecular docking studies (Figure 2). The data obtained demonstrated that the molecular recognition process was carried out mainly by hydrogen bonds, π - π stacking, and hydrophobic interactions. In the compound **1**, the amino group attached at 2-position of dihydro-purinone ring established hydrogen bonds with Tyr52D and Glu74A at distances of 2.9 and 2.7 Å, respectively. Similar distances were observed in another two hydrogen bonds involving the 3-N and 9-NH with Tyr54D and Asp53D residues. While the NH group was positioned at distance of 2.7 Å from Asp53D, the 3-N formed a hydrogen bonding donor-acceptor pair with distance of 2.9 Å from Tyr54D. The complex formed between compound **8-MG** and *MtFolB* was also stabilized by π - π stacking interactions between phenyl group of the Tyr54D and the dihydro-purinone ring.

Following the same pattern presented by compound **8-MG**, the main contacts between dihydro-purinone **4f** and *MtFolB* were performed by heterocyclic ring. The amino group (2-NH₂) acted as a hydrogen bonding donor with distances of 2.7 and 2.8 Å related to Glu74H and Tyr52F, respectively. The Glu74H carboxylate performed another hydrogen bond with the NH of the 1-position of heterocycle at distance of 2.8 Å. Unlike observed in the binary complex of **8-MG**-*MtFolB*, the carboxylate group of Glu74H showed both oxygen atoms in a complete interaction with **4f**, fact that provide greater stability to the system. The nitrogen at 3-position of the heterocyclic ring showed distance and angle consistent with the formation of a hydrogen bond with the Tyr54F backbone. The carbonyl group present in the dihydro-purinone ring acted as a hydrogen bond acceptor at distance of 3.0 Å from the Ile73H. Finally, the heterocycle was also stabilized by contacts involving the π -electron systems of the Tyr54F and dihydro-purinone scaffold with the centroids positioned at distances of 4.1 Å. It is important to mention that the increased stability of the protein-ligand complex occurs when new intermolecular interactions are added. Moreover, exploring regions adjacent to the interaction site looking for new pockets to correct positioning chemical groups can lead to new and important interactions with the

molecular target. In this context, the acetamide portion of compound **4f** performed interactions via hydrogen bond with the Asp53F residue at distance of 2.8 Å. In addition, the 4-bromophenyl group did hydrophobic interactions with the Leu48F side chain. These additional interactions may be related to the greater inhibitory activity and the distinct inhibition mechanism of **4f** when compared to **8-MG**. However, further studies need to be carried out to clarify this point. To evaluate whether the compounds would be able to inhibit mycobacterial growth *in vitro*, we performed a REMA experiment against the virulent Mtb H37Rv strain. The compounds presented no activity against Mtb cells (MIC values above the maximum concentration tested for each compound). Further studies will be required to evaluate the reasons for this lack of antimycobacterial activity in REMA experiments. Nevertheless, this study represents the first step towards the development of new drugs targeting FoIB/DHNA enzyme from *M. tuberculosis*.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s)

Funding

This work was supported by Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) [grant number 14.2.0914.1] and the National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (CNPq-FAPERGS-CAPES) [grant numbers: 421703-2017-2 and 17-1265-8]. C. V. Bizarro, L. A. Basso, and P. Machado are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES), Finance Code 001.

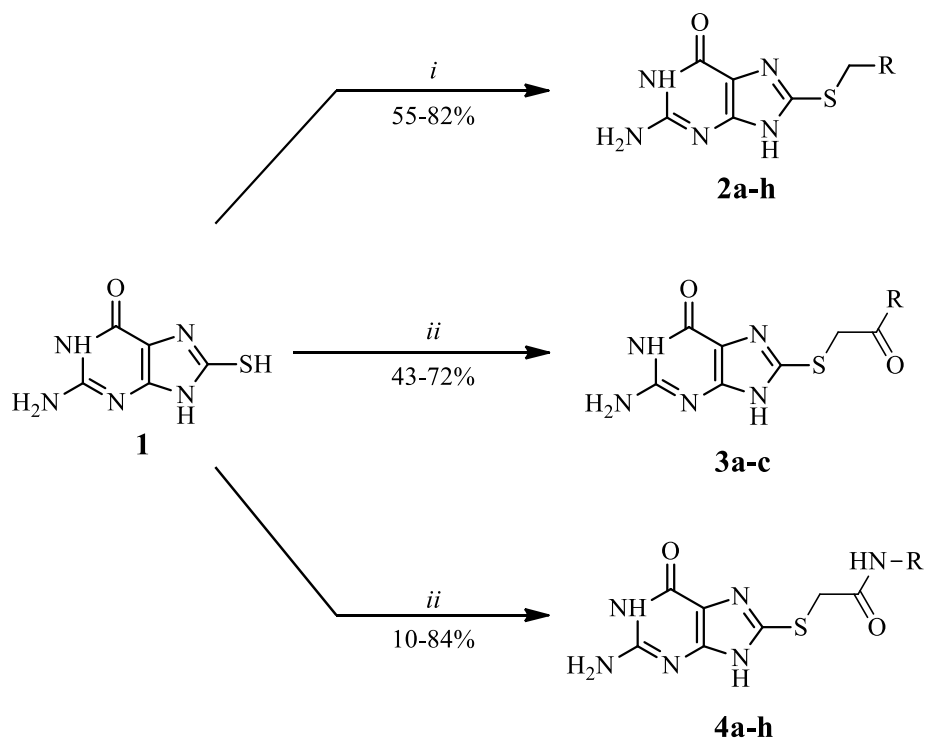
References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019.
2. Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*. 2011;469:483-490.
3. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, Ginsberg A, Swaminathan S, Spigelman M, Getahun H, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16076.
4. Bertacine Dias MV, Santos JC, Libreros-Zúñiga GA, Ribeiro JA, Chavez-Pacheco SM. Folate biosynthesis pathway: mechanisms and insights into drug design for infectious diseases. *Future Med Chem*. 2018;10:935-959.
5. Visentin M, Zhao R, Goldman ID. The antifolates. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2012;26:629-648.
6. Minato Y, Thiede JM, Kordus SL, McKlveen EJ, Turman BJ, Baughn AD. Mycobacterium tuberculosis folate metabolism and the mechanistic basis for para-aminosalicylic acid susceptibility and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:5097-5106.
7. Kumar A, Guardia A, Colmenarejo G, Pérez E, Gonzalez RR, Torres P, Calvo D, Gómez RM, Ortega F, Jiménez E, et al. A Focused Screen Identifies Antifolates with Activity on Mycobacterium tuberculosis. *ACS Infect Dis*. 2015;1:604-614.
8. Hajian B, Scocchera E, Shoen C, Krucinska J, Viswanathan K, G-Dayananandan N, Erlandsen H, Estrada A, Mikušová K, Korduláková J, et al. Drugging the Folate Pathway in Mycobacterium tuberculosis: The Role of Multi-targeting Agents. *Cell Chem Biol*. 2019;26:781-791.
9. Czekster CM, Blanchard JS. One substrate, five products: reactions catalyzed by the dihydroneopterin aldolase from Mycobacterium tuberculosis. *J Am Chem Soc*. 2012;134:19758-71.
10. Falcão VC, Villela AD, Rodrigues-Junior VS, Pissinate K, Eichler P, Pinto AF, Basso LA, Santos DS, Bizarro CV. Validation of Mycobacterium tuberculosis dihydroneopterin aldolase as a molecular target for anti-tuberculosis drug development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;485:814-819.

11. Sanders WJ, Nienaber VL, Lerner CG, McCall JO, Merrick SM, Swanson SJ, Harlan JE, Stoll VS, Stamper GF, Betz SF, et al. Discovery of potent inhibitors of dihydroneopterin aldolase using CrystaLEAD high-throughput X-ray crystallographic screening and structure-directed lead optimization. *J Med Chem.* 2004;47:1709-18.
12. Chhabra S, Dolezal O, Collins BM, Newman J, Simpson JS, Macreadie IG, Fernley R, Peat TS, Swarbrick JD. Structure of *S. aureus* HPPK and the discovery of a new substrate site inhibitor. *PLoS One.* 2012;7: e29444.
13. Dennis ML, Chhabra S, Wang ZC, Debono A, Dolezal O, Newman J, Pitcher NP, Rahmani R, Cleary B, Barlow N, et al. Structure based design and development of functionalized Mercaptoguanine derivatives as inhibitors of the folate biosynthesis pathway enzyme 6-hydroxymethyl-7,8 dihydropterin pyrophosphokinase from *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Chem.* 2014;57:9612–9626.
14. Dennis ML, Pitcher NP, Lee MD, DeBono AJ, Wang ZC, Harjani JR, Rahmani R, Cleary B, Peat TS, Baell JB, et al. Structural Basis for the Selective Binding of Inhibitors to 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin Pyrophosphokinase from *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Med Chem.* 2016;59:5248-5263.
15. Dennis ML, Lee MD, Harjani JR, Ahmed M, DeBono AJ, Pitcher NP, Wang ZC, Chhabra S, Barlow N, Rahmani R, et al. 8-Mercaptoguanine Derivatives as Inhibitors of Dihydropteroate Synthase. *Chem. Eur. J.* 2018;24:1922–1930.
16. Copeland, R. A. Reversible Modes of Inhibitor Interactions with Enzymes. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: a Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, 2013.
17. Goulding CW, Apostol MI, Sawaya MR, Phillips M, Parseghian A, Eisenberg D. Regulation by Oligomerization in a Mycobacterial Folate Biosynthetic Enzyme, *J Mol Biol.* 2005; 349(1):61-72.
18. Dallakyan S, Olson AJ. Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods Mol Biol.* 2015;1263:243–50.
19. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ, *J Comput Chem.* 2009;30:2785–91.

20. Goldberg DE. Genetic algorithms in search, optimization, and machine learning. Addison-Wesley; Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc.: Arlington Street, Massachusetts, 1989.
21. Solis FJ, Wets RJB. Minimization by Random Search Techniques. *Math Oper Res.* 1981;6:19–30.
22. Giacobbo BC, Pissinate K, Rodrigues-Junior V, Villela AD, Grams ES, Abbadi BL, Subtil FT, Sperotto N, Trindade RV, Back DF, et al. New insights into the SAR and drug combination synergy of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides against *Mycobacterium tuberculosis*, *Eur J Med Chem.* 2016;126:491-501.

Scheme 1



Compound	R	Yield (%)	IC ₅₀ (μM)
1 (8-MG)	-	-	0.3 ± 0.1
2a	Ph	80	7.1 ± 1.2
2b	2-Naphtyl	60	1.3 ± 0.4
2c	2-F-C ₆ H ₄	65	8.0 ± 1.3
2d	4-F-C ₆ H ₄	55	8.0 ± 0.9
2e	2-Cl-C ₆ H ₄	80	4.2 ± 1.0
2f	4-Cl-C ₆ H ₄	82	2.2 ± 0.4
2g	3,4-Cl ₂ -C ₆ H ₃	76	5.5 ± 0.7
2h	4-Br-C ₆ H ₄	80	3.0 ± 0.5
3a	Ph	43	0.9 ± 0.2
3b	4-Cl-C ₆ H ₄	53	0.3 ± 0.1
3c	2-MeO-C ₆ H ₄	72	1.3 ± 0.4
4a	Ph	10	2.2 ± 0.3
4b	2-Naphtyl	80	0.7 ± 0.1
4c	Bn	50	12.3 ± 1.8
4d	4-F-C ₆ H ₄	59	2.0 ± 0.3
4e	4-Cl-C ₆ H ₄	38	0.8 ± 0.1
4f	4-Br-C ₆ H ₄	84	0.5 ± 0.1
4g	4-Propyl-C ₆ H ₄	80	0.9 ± 0.1
4h	4-Heptyl-C ₆ H ₄	10	0.4 ± 0.1

Table 1. Inhibitory constants of selected compounds on *Mt*DHNA activity.

Compound	K_{is} (μM)	K_{ii} (μM)	Inhibition mode
1 (8-MG)	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	noncompetitive
3b	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.2	noncompetitive
4f	0.1 ± 0.03	-	competitive
4h	0.5 ± 0.1	1.2 ± 0.2	noncompetitive

Figure 1

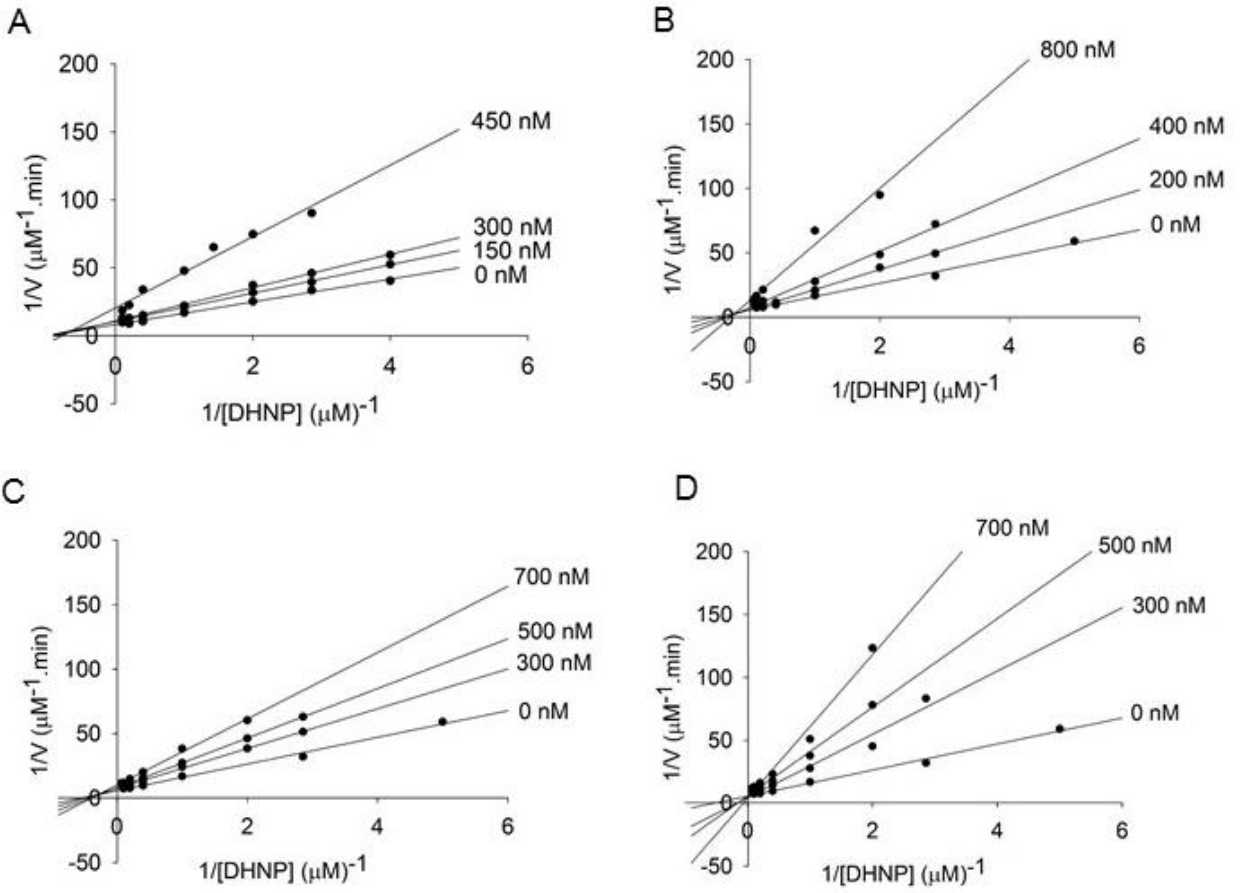


Figure 2

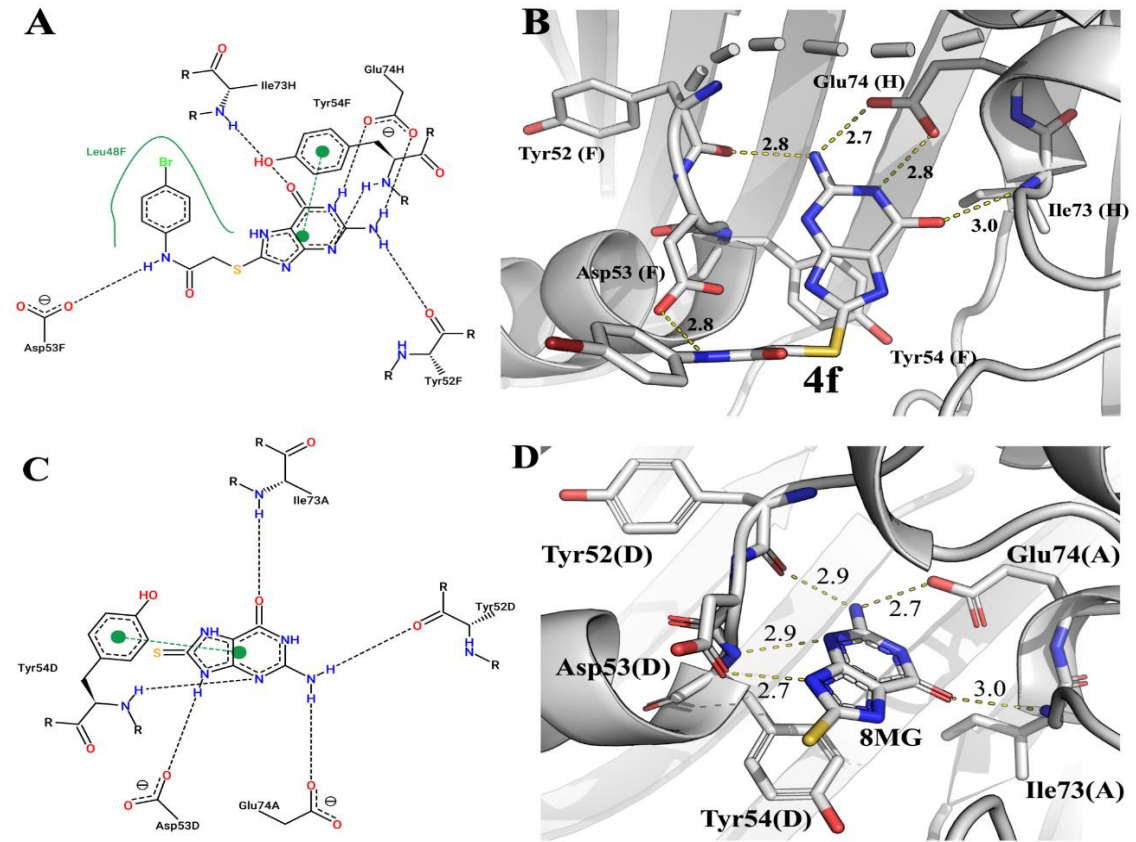


Figure Captions

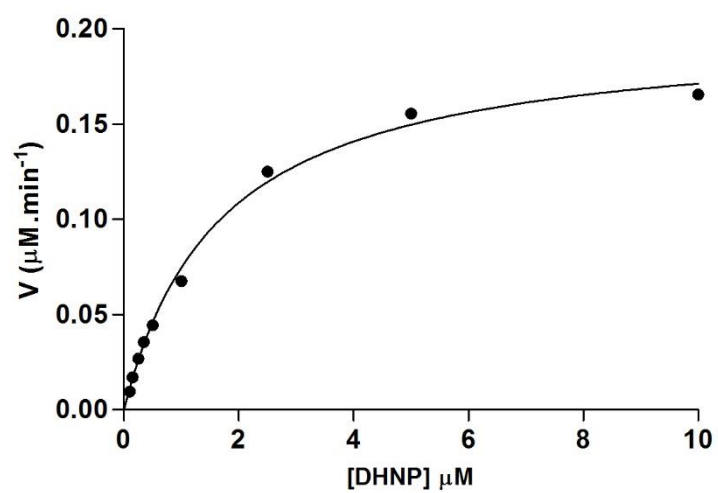
Scheme 1. Reagents and conditions. (i) = Benzyl bromide, NaOH, EtOH, 25°C, 4 h. (ii) 2-bromo-1-arylethanone or bromoacetamide, NaOH, EtOH, 25°C, 24 h.

Figure 1. Determination of the inhibition mechanism for compounds 8-MG (**1**), **3b**, **4f** and **4h** on aldolase activity of *MtDHNA*. (A) Compound 8-MG (**1**) (0 – 0.45 μ M). The Lineweaver–Burk plot displays a pattern of intersection to the left of the y-axis toward DHNP, which is diagnostic of noncompetitive inhibition. (B) Compound **3b** (0 – 0.80 μ M). The Lineweaver–Burk plot displays a pattern of intersection to the left of the y-axis toward DHNP, which is diagnostic of noncompetitive inhibition. (C) Compound **4h** (0 – 0.70 μ M). The Lineweaver–Burk plot displays a pattern of intersection to the left of the y-axis toward DHNP, which is diagnostic of noncompetitive inhibition. (D) Compound **4f** (0 – 0.70 μ M). The Lineweaver–Burk plot displays a pattern of intersection at the y-axis, which indicates competitive inhibition.

Figure 2. Predicted binding mode of compounds **4f** (A and B) and **8-MG** (C and D) into the binding pocket of *MtFolB*. (A and C) 2D-interaction diagrams of the binding models of **4f** (A) and **8-MG** (C) with *MtFolB* residues, with hydrogen bonds and π - π stacking interactions shown in dashed lines. (B and D) Predicted docking orientations of **4f** (B) and **8-MG** (D) into the binding pocket of *MtFolB* (PDB ID: 1NBU)

Supplementary Figures

Figure S1

**Figure S1.** Determination of Michaelis–Menten constant (K_M) to DHNP substrate.

CAPÍTULO 4
CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho um método contínuo para análise da atividade de aldolase da enzima *MtDHNA* por espectrofluorimetria foi otimizado, determinando os parâmetros necessários para a detecção da formação do produto HP. Dessa forma, foi possível avaliar o potencial inibitório de compostos da classe 8-mercaptoguanina sobre a enzima *MtDHNA*, incluindo o composto líder 8-MG e 19 análogos estruturais S-8 substituídos previamente sintetizados pelo grupo de pesquisa.

Todos os compostos testados foram capazes de inibir a enzima *MtDHNA*, com valores de IC_{50} variando de 0,3 a 12,3 μM , sendo possível realizar um estudo de SAR sobre as modificações estruturais realizadas. Quatro compostos apresentaram valores de IC_{50} satisfatórios ($< 0,50 \mu\text{M}$) e foram selecionados para uma melhor caracterização da inibição sobre a *MtDHNA*.

Os quatro compostos com maior atividade inibitória (**1 (8-MG)**, **3b**, **4f** e **4h**) foram avaliados quanto ao seu perfil de inibição e tiveram sua constante de inibição determinada (K_i). Os compostos apresentaram um perfil de inibição não-competitivo ou competitivo pelo substrato DHNP. O composto **4f**, que apresentou a menor constante de inibição, e o composto líder **1 (8-MG)** foram submetidos a uma análise estrutural *in silico* para uma maior compreensão da inibição, utilizando docagem molecular para sugerir o sítio de interação enzima-inibidor e as conformações dos ligantes.

Além disso, os compostos foram avaliados quanto ao seu potencial de inibir o crescimento da cepa laboratorial H37Rv de *M. tuberculosis*. No entanto, nenhum composto apresentou atividade inibitória nas maiores concentrações testadas. Dessa forma, são necessários estudos mais aprofundados para compreendermos melhor este resultado, permitindo novas estratégias que possibilitem o aumento da atividade antimicobacteriana dos compostos.

Os resultados obtidos permitiram a identificação *in vitro* de inibidores da enzima *MtDHNA* servindo de base para estudos futuros de inibição com essa enzima. A classe de compostos estudada mostrou-se promissora visto seu potencial de inibir a enzima. No entanto, outras derivatizações na molécula do composto 8-MG podem ser realizadas a fim de aumentar o potencial antimicobacteriano dos compostos. Além disso, novas estratégias químicas com outras classes de compostos podem ser

avaliadas como potenciais inibidores da enzima *Mt*DHNA com o método estabelecido neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BAILO R., BHATT A., AINSA J.A. Lipid transport in *Mycobacterium tuberculosis* and its implications in virulence and drug development. **Biochemical Pharmacology**. v.96, p.159-167, 2015.
- BAUER S, SCHOTT AK, ILLARIONOVA V, BACHER A, HUBER R, FISCHER M. Biosynthesis of tetrahydrofolate in plants: crystal structure of 7,8-dihydroneopterin aldolase from *Arabidopsis thaliana* reveals a novel adolase class. **J Mol Biol**. v.11, p.967-79, 2004.
- BERMINGHAM, A.; DERRICK, J. P. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. **Bioessays**, 24, n. 7, p. 637-648, Jul 2002.
- BERTACINE DIAS, M. V. et al. Folate biosynthesis pathway: mechanisms and insights into drug design for infectious diseases. **Future Med Chem**, v. 10, n. 8, p. 935-959, 2018.
- BLASZCZYK, J. et al. Structural basis for the aldolase and epimerase activities of *Staphylococcus aureus* dihydroneopterin aldolase. **J Mol Biol**, v. 368, n. 1, p. 161-9, 2007.
- BLASZCZYK, J., Z. LU, Y. LI, H. YAN and X. JI. Crystallographic and molecular dynamics simulation analysis of *Escherichia coli* dihydroneopterin aldolase. **Cell Biosci**, v. 4, n. 1, p. 52, 2014.
- BOOGAARD, J. et al. New drugs against tuberculosis: problems, progress, and evaluation of agents in clinical development. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 3, p. 849-62, 2009.
- BRUCHFELD, J.; CORREIA-NEVES, M.; KÄLLENIUS, G. Tuberculosis and HIV Coinfection. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 5, n. 7, p. a017871, 2015.
- CAMBAU, E.; DRANCOURT, M. Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 3, p. 196-201, 2014.
- CHETTY, S. et al. Recent advancements in the development of anti-tuberculosis drugs. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 27, n. 3, p. 370-386, 2017.
- CHHABRA, S. et al. Exploring the Chemical Space around 8-Mercaptoguanine as a Route to New Inhibitors of the Folate Biosynthesis Enzyme HPPK. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. 59535, 2013.
- CHHABRA, S. et al. Structure of *S. aureus* HPPK and the discovery of a new substrate site inhibitor. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. 29444, 2012.
- CZEKSTER, C. M.; BLANCHARD, J. S. One substrate, five products: reactions catalyzed by the dihydroneopterin aldolase from *Mycobacterium tuberculosis*. **J Am**

Chem Soc, v. 134, n. 48, p. 19758-71, 2012.

DEAN, S. M.; GREENBERG, W. A.; WONGA, C.-H. Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis. **Adv. Synth. Catal**, p.1308 – 1320, 2007.

DENNIS, M. L. et al. Structure-based design and development of functionalized Mercaptoguanine derivatives as inhibitors of the folate biosynthesis pathway enzyme 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase from *Staphylococcus aureus*. **J Med Chem**, v. 57, n22, p.9612-26, 2014.

DENNIS, M. L. et al. Structural Basis for the Selective Binding of Inhibitors to 6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin Pyrophosphokinase from *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **J Med Chem**, v. 59, n. 11, p. 5248-63, 2016.

DENNIS, M. L. et al. 8-Mercaptoguanine Derivatives as Inhibitors of Dihydropteroate Synthase. **Chem. Eur. J.**, v. 24, n. 8, p. 1922-1930, 2018.

DEVES, C. **Caracterização bioquímica da enzima timidina fosforilase humana como alvo para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para a quimioterapia do câncer**. Tese de Doutorado – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 2013.

FALCÃO, V. C. et al. Validation of *Mycobacterium tuberculosis* dihydroneopterin aldolase as a molecular target for anti-tuberculosis drug development. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 485, n. 4, p. 814-819, 2017.

FALCÃO, V. C. **Validação da enzima Di-hidroneopterina aldolase (EC 4.1.2.25) de *Mycobacterium tuberculosis* como um alvo molecular para o desenvolvimento de fármacos antituberculose**. Tese de Doutorado – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 2017.

GARÇON, A.; LEVY, C.; DERRICK, J. P. Crystal structure of the bifunctional dihydroneopterin aldolase/6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase from *Streptococcus pneumoniae*. **J Mol Biol**, v. 360, n. 3, p. 644-53, 2006.

GOULDING, C. W. et al. Regulation by oligomerization in a mycobacterial folate biosynthetic enzyme. **J Mol Biol**, v. 349, n. 1, p. 61-72, 2005.

HAWSER, S.; LOCIURO, S.; ISLAM, K. Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 7, p. 941-8, 2006.

HENNING M, D'ARCY A, HAMPELE IC, PAGE MG, OEFNER C, DALE GE. Crystal structure and reaction mechanism of 7,8-dihydroneopterin aldolase from *Staphylococcus aureus*. **Nat Struct Biol**, v. 5, n.5, p.357-62, 1998.

KOUL A, ARNOULT E, LOUNIS N, GUILLEMNT J, ANDRIES K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v.469, p. 483-490, 2011.

NAMBA, K. et al. Design and synthesis of benzenesulfonanilides active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant

Enterococcus. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 11, p. 6131-44, 2008.

NAZKI, F. H.; SAMEER, A. S.; GANAIE, B. A. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. **Gene**, 533, n. 1, p. 11-20, 2014.

PAI M, BEHR MA, DOWDY D, DHEDA K, DIVANGAHI M, BOEHME CC, et al. Tuberculosis. **Nat Rev Dis Prim**, v.2 p.16076, 2016.

PAWLOWSKI, A. et al. Tuberculosis and HIV co-infection. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 2, p. e1002464, 2012.

POROLLO, A.; MELLER, J. Versatile annotation and publication quality visualization of protein complexes using POLYVIEW-3D. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 316, 2007.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 5, p. 352-66, 2012.

REBELO, J. et al. Biosynthesis of pteridines. Reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I. **J Mol Biol**, v. 326, n. 2, p. 503-16, 2003.

RODRIGUEZ-CAMPOS, S. et al. Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. **Res Vet Sci**, v. 97 Suppl, p. S5-S19, 2014.

SANDERS, W. J. et al. Discovery of potent inhibitors of dihydroneopterin aldolase using CrystaLEAD high-throughput X-ray crystallographic screening and structure-directed lead optimization. **J Med Chem**, v. 47, n. 7, p. 1709-18, 2004.

STOVER, P. J.; FIELD, M. S. Trafficking of intracellular folates. **Adv Nutr**, v. 2, n. 4, p. 325-31, 2011.

VINNICOMBE, H. G.; DERRICK, J. P. Dihydropteroate synthase: an old drug target revisited. **Biochem Soc Trans**, v. 27, n. 2, p. 53-8, 1999.

WANG, Y. et al. Mechanism of dihydroneopterin aldolase. NMR, equilibrium and transient kinetic studies of the Staphylococcus aureus and Escherichia coli enzymes. **FEBS J**, v. 274, n. 9, p. 2240-52, 2007.

WANG, Y.; LI, Y.; YAN, H. Mechanism of dihydroneopterin aldolase: functional roles of the conserved active site glutamate and lysine residues. **Biochemistry**, v. 45, n. 51, p. 15232-9, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Tuberculosis Report**, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Tuberculosis Report**, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Tuberculosis Report**, 2019.