

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 27/09/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

DÉBORA LEITE CAMPOS

**Análise da atividade *in vitro*, *in vivo* e do mecanismo de ação de
compostos benzofuroxanos frente à *Mycobacterium tuberculosis***

Araraquara – SP

2022

Débora Leite Campos

Análise da atividade *in vitro*, *in vivo* e do mecanismo de ação de compostos
benzofuroxanos frente a *Mycobacterium tuberculosis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas a Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Bacteriologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan.

Araraquara – SP

2022

C193a

Campos, Débora Leite.

Análise da atividade *in vitro*, *in vivo* e do mecanismo de ação de compostos benzofuroxanos frente à *Mycobacterium tuberculosis* / Débora Leite Campos. – Araraquara: [S.n.], 2022.
79 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Bacteriologia.

Orientador: Fernando Rogério Pavan.

1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Benzofuroxanos. 3. Tuberculose. I. Pavan, Fernando Rogério, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Análise da atividade in vitro, in vivo e do mecanismo de ação de compostos benzofuroxanos frente ao *Mycobacterium tuberculosis*

AUTORA: DÉBORA LEITE CAMPOS

ORIENTADOR: FERNANDO ROGERIO PAVAN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Profa. Dra. FLAVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA (Participação Virtual)
Universidade de Araraquara - UNIARA

Dr. DIEGO LUIS COSTA (Participação Virtual)
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 27 de setembro de 2022

Dedico essa Tese ao meu filho Arthur, por me provar
que sou mais forte do que poderia imaginar.
E à minha prima Caroline Leite Faria (*in memoriam*).
Que não nos esqueçamos que o amor supera o tempo,
o espaço, a dor e a própria vida.
O amor não acaba.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Jesus pela presença em minha vida. A todos os serem bondosos que me conduziram pelo caminho, me protegeram e guardaram, permitindo que mesmo durante uma pandemia ceifadora, eu pudesse gerar vida e ciência.

Agradeço aos meus pais pela oportunidade da vida. À minha mãe Márcia, meu padrasto João Gustavo e meus avós maternos, Lourdes e Mário, pela sua dedicação, amor e doação na minha criação. Aos meus tios, Marisa, Adriana e Valdecir, por tornarem meus dias mais leves e felizes e à Caroline por me permitir dividir 24 anos de história como sua prima/irmã. Ainda agradeço aos meus sogros e padrinhos, Claudinea e Cacildo e meu cunhado, Gustavo, pelo apoio, incentivo e ajuda.

Agradeço ao meu marido, Guilherme, por ser minha fortaleza, meu amparo de vida, meu parceiro, companheiro e grande amor. Por dividir tanta vida comigo e multiplicar tanto amor por meio das nossas crianças.

Agradeço ao Theo e ao Arthur por me transformar. Por me tornarem quem sou e, mesmo a força, me tornarem alguém melhor a cada dia. Vocês são o meu renovo e minha esperança de um futuro melhor, mais colorido e mais feliz.

Agradeço às minhas amigas de longa data - Amanda, Arielle, Géssica, Iasmin e Leticia - elas que trazem tanta alegria, leveza, sorrisos e festa à minha vida. Por me motivarem, apoiarem e segurarem durante todo esse tempo.

Agradeço às amigas do laboratório de pesquisa em Tuberculose: Dra. Camila M., Ma. Mariana, Dra. Fernanda, Ma. Karyn, Dra. Giulia e Ma. Rachel, Dra. Patricia Bento, Dra Isabel Silva e às Farmacêuticas-Bioquímicas: Camila G, Maria Carolina (Mel), Julia e Ana Carolina. Todas vocês, durante esses 8 anos de pesquisa, tornaram tudo mais divertido, interessante e leve. Obrigada!

E ao Dr. Rone, que esteve junto a mim desde o início da minha vida na pesquisa desde o Laboratório de Anatomia e Genética (2011-2012), Laboratório de Mutagênese (2013-2014) e

de Pesquisa em Tuberculose (Set 2014 a Set 2022) sendo sempre meu exemplo e maior incentivador.

Às amigas de outros laboratórios, por tanta parceria, ajuda e compartilhamento: Dra Bruna Lustri, Dra Amanda Silvestre e Dra Mariana Santoni.

Agradeço aos meus orientadores, desde minha primeira iniciação científica com a Profa. Dra. Ticiane Sidorenko de Oliveira Capote e Profa. Dra. Raquel Mantuanelli Scarel Caminaga, passando pelas queridas Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda e Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira e finalizando com meu orientador de iniciação, mestrado e doutorado Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan: gratidão pela dedicação, ensinamentos, conselhos e incentivo no caminho acadêmico. Cheguei até aqui devido à contribuição de cada um à minha formação.

Agradeço às agências de fomento, Capes e FAPESP (Processo n. 2018/21778-3), pelas bolsas despendidas ao longo desse período do doutorado.

Agradeço, finalmente, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, ao campus que foi minha segunda casa desde minha graduação, aos alunos e professores, aos colegas do programa de pós-graduação e à sessão técnica de graduação e pós-graduação por tanto trabalho, ajuda e direcionamento ao longo de toda essa história.

Resumo

A importância do estudo de novos fármacos para o tratamento da tuberculose se justifica por essa ser uma das doenças infecciosas mais mortais no mundo. O aparecimento de cepas resistentes aos fármacos é uma preocupação constante que apenas pode ser diminuída por meio do estudo de novas moléculas e melhores esquemas terapêuticos. Neste projeto avaliamos 18 novos compostos benzofuroxanos com potencial inibitório contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Dos 18 inicialmente avaliados, 11 foram selecionados por apresentarem valores de concentração inibitória mínima (CIM₉₀) $\leq 5 \mu\text{M}$ e índices de seletividade ≥ 10 . Esses 11 compostos foram avaliados frente 10 isolados clínicos resistentes de *M. tuberculosis*, bactérias em estado intramacrofágico e quanto ao espectro de atividade. Todos os benzofuroxanos foram ativos contra isolados clínicos resistentes, apresentaram boa atividade frente bactérias intramacrofágicas e foram classificados como compostos de espectro de ação estreito. Os 2 melhores compostos selecionados de acordo com o potencial frente a isolados resistentes (TBs 10 e 13) foram avaliados em experimento de infecção e tratamento *in vivo* com camundongos Balb/c. Os resultados obtidos foram promissores, demonstrando efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano além da comprovação da não-toxicidade e biodisponibilidade. Também apresentaram efeito sinérgico *in vitro* quando associados com a rifampicina (fármaco da terapia de TB). Finalmente, o composto líder selecionado no experimento *in vivo* (TB 10) foi avaliado quanto ao seu potencial inibitório frente bombas de efluxo, não sendo um inibidor dessa classe de proteínas. Efeitos da exposição do *M. tuberculosis* ao TB 10 também foram morfológicamente observados por meio de microscopia eletrônica de varredura, observando-se alterações de parede características de estresse celular e um mutante resistente foi identificado para posterior análise genotípica por meio de sequenciamento. Concluímos que a síntese dessa nova série de compostos culminando na escolha do benzofuroxano TB 10 foi significativa visto que conseguimos encontrar uma nova molécula com forte atividade inibitória *in vitro* e *in vivo*, alta segurança e biodisponibilidade além de potencial sinérgico com outros fármacos da terapia já utilizados o que aponta para um potencial novo composto indicado para o tratamento da tuberculose.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, benzofuroxanos, tuberculose.

Abstract

The importance of studying new drugs for the treatment of tuberculosis is justified by the fact that this is one of the deadliest infectious diseases in the world. The emergence of drug-resistant strains is a constant concern that can only be reduced through the study of new molecules and better therapeutic regimens. In this project we evaluated 18 new benzofuroxane compounds with potential against *Mycobacterium tuberculosis*. Of the 18 initially evaluated, 11 were selected for having minimum inhibitory concentration (MIC₉₀) values < 5 µM and selectivity indices > 10. These 11 compounds were evaluated against 10 resistant clinical isolates of *M. tuberculosis*, bacteria in an intramacrophagic state and activity spectrum. All benzofuroxanes were active against resistant isolates, showed activity against intramacrophagic bacteria and were classified as compounds with a narrow spectrum of action. The 2 compounds selected according to their potential against resistant isolates (TBs 10 and 13) were evaluated in an *in vivo* model of infection with Balb/c mice. The results obtained were very promising, demonstrating a good inhibitory effect on bacterial growth, in addition to proving non-toxicity and good bioavailability. They also showed synergistic effect *in vitro* when associated with rifampicin (TB therapy drug). Finally, the compound selected in the *in vivo* experiment (TB 10) was evaluated for its inhibitory potential against efflux pumps, not being an inhibitor of this class of proteins. Effects of exposure of *M. tuberculosis* to TB 10 were also morphologically observed by means of scanning electron microscopy, observing cell wall changes characteristic of cellular stress and a resistant mutant was identified for further genotypic analysis by means of sequencing. We conclude that the synthesis of this new series of compounds culminating in benzofuroxane TB 10 was very significant since we were able to find a new molecule with strong inhibitory activity *in vitro* and *in vivo*, high safety and bioavailability in addition to synergistic potential with other drugs in the therapy already used, which points to a potential new compound indicated for the treatment of tuberculosis

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, benzofuroxan, tuberculosis.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Imagem esquemática representando a estrutura da membrana e parede celular micobacteriana.....	16
Figura 2. Estrutura química dos ácidos micólicos presentes na parede celular do <i>M. tuberculosis</i>	16
Figura 3. Representação esquemática da transmissão e patogenia da TB.....	19
Figura 4. Composto BZ8.....	22
Figura 5. Esquema cronológico do experimento <i>in vivo</i>	34
Figura 6. Fluxograma das análises realizadas com os compostos benzofuroxanos e o número total de compostos analisados em cada etapa.....	38
Figura 7. Estrutura dos novos compostos benzofuroxanos apresentados de acordo com seus valores de concentração inibitória mínima (CIM ₉₀).....	43
Figura 8. Gráfico de população para apresentação da concentração inibitória mínima (CIM ₉₀) em µM dos compostos benzofuroxanos frente 8 cepas clínicas com diferentes perfis de resistência. O ponto de corte no gráfico indica um <i>cut-off</i> de 10 µM.....	53
Figura 9. Resultado do crescimento das unidades formadoras de colônias (UFC/ml) em log ₁₀ após infecção e tratamento de macrófagos J774A.1. Controle não-tratado representa 100% de crescimento bacteriano dentro dos macrófagos, linha tracejada indica uma inibição do crescimento de 25% e linha contínua representa inibição do crescimento em 50%. Os compostos foram avaliados em seus valores de concentração inibitória mínima em 1x, 5x e 10x. Os resultados da média e desvio padrão foram obtidos após triplicata biológica.....	54

Figura 10. Variação do peso dos animais por grupo de tratamento ao longo das 4 semanas.....59

Figura 11. Gráfico em barras da contagem de unidades formadoras de colônia após 4 semanas de tratamento. Material plaqueado: macerado dos pulmões dos camundongos após infecção e tratamento. CI: controle inicial (14 dias após infecção); CPT: controle de veículo (42 dias após infecção); Tratamentos TB 10, TB 13 e RFP (rifampicina) Dados obtidos após 28 dias de tratamento e eutanásia após 42 dias da infecção.....60

Figura 12. Gráfico em barras da contagem de unidades formadoras de colônia por camundongo após 90 dias do término do tratamento. Material plaqueado: macerado dos pulmões dos camundongos após infecção e tratamento. CP3: controle após 3 meses; Tratamentos TB 10, TB 13 e RFP (rifampicina).....62

Figura 13. Gráfico da fluorescência relativa do brometo de etídio com relação ao tempo para avaliação da atividade com relação a inibição de bombas de efluxo.....63

Figura 14. Imagens de microscopia eletrônica de varredura. Imagens de número 1 apresentam bacilos de *M. tuberculosis* sem tratamento; números 2, 3 e 4 são bacilos de *M. tuberculosis* após 24h de exposição a INH, ETH e TB 10 nos valores da CIM₉₀. Barras brancas indicam 1 µm.....66

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação das cepas resistentes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
Tabela 2. Valores de concentração inibitória mínima (CIM ₉₀) frente <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , concentração inibitória frente células eucarióticas (CI ₅₀) J774A.1 e MRC-5 e índice de seletividade (IS) dos compostos benzofuroxanos e controles. Os valores são representação da média $\pm$ desvio padrão de três ensaios independentes.....	41
Tabela 3. Valores de concentração inibitória mínima (CIM ₉₀) dos compostos benzofuroxanos frente diferentes bactérias Gram-positivas e negativas.....	44
Tabela 4. Valores de concentração inibitória mínima (CIM ₉₀) dos compostos benzofuroxanos frente <i>Mycobacterium bovis</i> e <i>Mycobacterium smegmatis</i> em μ M.....	47
Tabela 5. Valores de concentração inibitória mínima (CIM ₉₀) dos compostos benzofuroxanos frente isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> em μ M.....	49
Tabela 6. Resultado do efeito da combinação dos compostos TB 10 e TB 13 com rifampicina frente <i>M. tuberculosis</i>	58

Sumário

1. Introdução.....	14
1.1. Epidemiologia da Tuberculose	14
1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
1.3. Transmissão e Patogenia	18
1.4. Tratamento	20
1.5. Justificativa e Hipótese	22
2. Objetivos	23
3. Materiais e Métodos	23
4 Resultados e Discussão.....	23
5 Conclusão	24
Referências	26

1. Introdução

A Tuberculose (TB) provocou em 2020 cerca de 1,3 milhão de mortes ao redor do mundo e 10 milhões de novos casos de infecção foram notificados. Evidenciado por esses números, a TB é considerada a principal causa de morte provocada por um único agente infeccioso e uma das principais provocadas por resistência antimicrobiana (SHARIQ *et al.*, 2022; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021, 2022).

A relevância do estudo da TB ainda se reitera pelo fato de que aproximadamente $\frac{1}{4}$ da população mundial apresenta uma infecção primária latente provocada pelo seu principal agente infeccioso, o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (BEHR *et al.*, 2021).

Toda sua epidemiologia, virulência, patogenia e tratamento serão apresentados a seguir.

1.1. Epidemiologia da Tuberculose

De acordo com os mais recentes dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em seu *Global Tuberculosis Report 2021*, o número de casos de TB ao redor do mundo chegou a aproximadamente 10 milhões em 2020.

Pela primeira vez, em 10 anos, a notificação de novos casos diminuiu em 18%, chegando a um total contabilizado apenas em 2012, de 5,8 milhões. Essa grande diminuição no número de novos casos diagnosticados justifica-se pelo efeito da pandemia de coronavírus 2019 (COVID-2019). Com o foco no controle da infecção e tratamento do COVID-19, a prestação de serviços de saúde para diagnóstico e tratamento da TB foram prejudicadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021; YADAV *et al.*, 2022)

Uma grave consequência da diminuição do diagnóstico e tratamento foi o aumento do número de mortes provocadas pela doença. Comparando-se com o ano anterior, 2020 apresentou um aumento de aproximadamente 100 mil mortes ao redor do mundo, um número

que vai na contramão da tendência anteriormente conhecida já que, desde 2005, uma diminuição ano-a-ano era observada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Esse cenário pós-pandemia anseia, portanto, de um maior número de estudos e programas para controle da infecção e disseminação da TB, incluindo a melhora nas formas de tratamento e prevenção da transmissão.

1.2. *Mycobacterium tuberculosis*

Identificado por Robert Koch em 1882, o bacilo *M. tuberculosis* é o principal agente causador da TB dentre os membros do complexo *M.tb.* que podem provocar a doença em humanos, sendo eles: *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii* e *M. africanum*. É um patógeno intracelular facultativo que possui a capacidade de sobreviver e se multiplicar dentro das células macrofágicas, podendo assim evadir da ação imunológica (DAFFÉ; ETIENNE, 1999; FORRELLAD *et al.*, 2013; MIGLIORI *et al.*, 2007; NILLER *et al.*, 2017).

De crescimento lento, com tempo de geração de aproximadamente 20 horas *in vitro* e *in vivo*, não se classifica exclusivamente como uma bactéria Gram-negativa e é principalmente identificada por meio da técnica de coloração de *Ziehl-Neelsen* por ser um bacilo álcool-ácido resistente (KOCH; MIZRAHI, 2018; VASAVA *et al.*, 2009).

Essa particularidade para o método de coloração ocorre devido, principalmente, aos lipídeos de sua parede que lhes confere uma característica de baixa permeabilidade a compostos hidrofílicos além de serem essenciais para sua patogênese e virulência (FORRELLAD *et al.*, 2013; JANKUTE *et al.*, 2015; QUIGLEY *et al.*, 2017).

Como pode-se observar na Figura 1, sua membrana e parede celular se apresentam em estrutura diferente das demais bactérias, principalmente pela presença dos ácidos micólicos e glicolipídeos na região externa (QUIGLEY *et al.*, 2017).

demonstra sua grande importância. Dentre os mais utilizados com ação na parede e membrana celular estão a isoniazida (INH), o etambutol (ETH) e a etionamida (ETA) (BELISLE *et al.*, 1997; JANKUTE *et al.*, 2015).

Intrínseco ao bacilo é a resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, por apresentarem enzimas β -lactamases de amplo espectro (BlaC), responsáveis pela inativação do grupo farmacofórico desses fármacos. Não apresenta mecanismos de transferência genética horizontal e nenhum plasmídeo é conhecido (DAFFÉ; ETIENNE, 1999; ELINGS *et al.*, 2020; KOCH; MIZRAHI, 2018).

Sistemas de secreção também são observados em micobacterias, apresentando relação com sua virulência. O sistema de secreção conhecido como ESAT6 – 1 é responsável pela secreção das proteínas ESAT6 (ESXA) e CFP1 (ESXB) reconhecidas como antígenos dominantes durante a infecção. Além disso, ESAT6 possui a capacidade de desestabilizar e lisar membranas, permitindo ao *M. tuberculosis*, por exemplo, evadir o lipossoma e se replicar no citoplasma macrófago e ainda facilita sua disseminação pelo epitélio pulmonar e outros tecidos (CHAI *et al.*, 2020; FORRELLAD *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2007).

Outro mecanismo importante presente em sua parede são as bombas de efluxo. Relacionadas à resistência aos antimicrobianos em *M. tuberculosis* foram identificadas bombas pertencentes às superfamílias ABC (*ATP binding cassette superfamily*), MFS (*major facilitator superfamily*), SMR (*small multidrug resistance*) e RND (*resistance nodulation division superfamily*). Essas bombas com atividade inespecífica acabam por expulsar fármacos antimicrobianos de seu citoplasma e, dessa maneira, impedem sua ação (BALGANESH *et al.*, 2012; RODRIGUES; CRAVO; VIVEIROS, 2020; VAN BAMBEKE, 2003).

Todas essas características descritas demonstram a grande capacidade evolutiva do *M. tuberculosis*, se esquivando do sistema imunológico do hospedeiro e resistindo às investidas

farmacológicas amplamente utilizadas (HENRY BOOM; SCHAIBLE; ACHKAR, 2021). Devido a isso, o estudo desse microrganismo e seus mecanismos de virulência e resistência precisam sempre ser revisados de forma a possibilitar a criação de estratégias de inibição de sua disseminação.

1.3. Transmissão e Patogenia

A infecção por *M. tuberculosis* ocorre através das vias aéreas, pela formação de aerossóis que são expelidos pelo doente ao tossir. Num segundo indivíduo, as bactérias presentes nessas gotículas alcançam os alvéolos pulmonares e ali promovem uma infecção primária (PEDDIREDDY; DODDAM; AHMED, 2017; ZUIGA *et al.*, 2012).

Na Figura 3 a seguir, podemos acompanhar de forma ilustrativa todo o ciclo de transmissão e patogenia da doença de acordo com as etapas descritas no texto.

Assim, com a infecção iniciada, as células imunológicas presentes no tecido, principalmente os macrófagos alveolares, promoverão a fagocitose do bacilo e o recrutamento de mais células inflamatórias para o pulmão. A ativação do sistema imune inato nessa etapa primária da infecção leva ao envolvimento dos linfonodos proximais e o surgimento do complexo de Ghon (MOULE; CIRILLO, 2020; NUNES-ALVES *et al.*, 2014; SINIGAGLIA *et al.*, 2020).

Em indivíduos imunocompetentes, o sistema imunológico promoverá um controle da infecção, que pode levar à calcificação do tecido ou ainda à formação de um granuloma formado por macrófagos, neutrófilos e células T e B promovendo a geração de um estado não-replicante das bactérias. O paciente permanece assintomático porém infectado, numa situação de TB latente (TBL), que ocorre em aproximadamente 90-95% dos casos e acomete $\frac{1}{4}$ da população mundial (MOULE; CIRILLO, 2020; NILLER *et al.*, 2017; SCHOREY;

SCHLESINGER, 2016; SINIGAGLIA *et al.*, 2020; TANG; JOHNSTON, 2017; TURNER *et al.*, 2017).

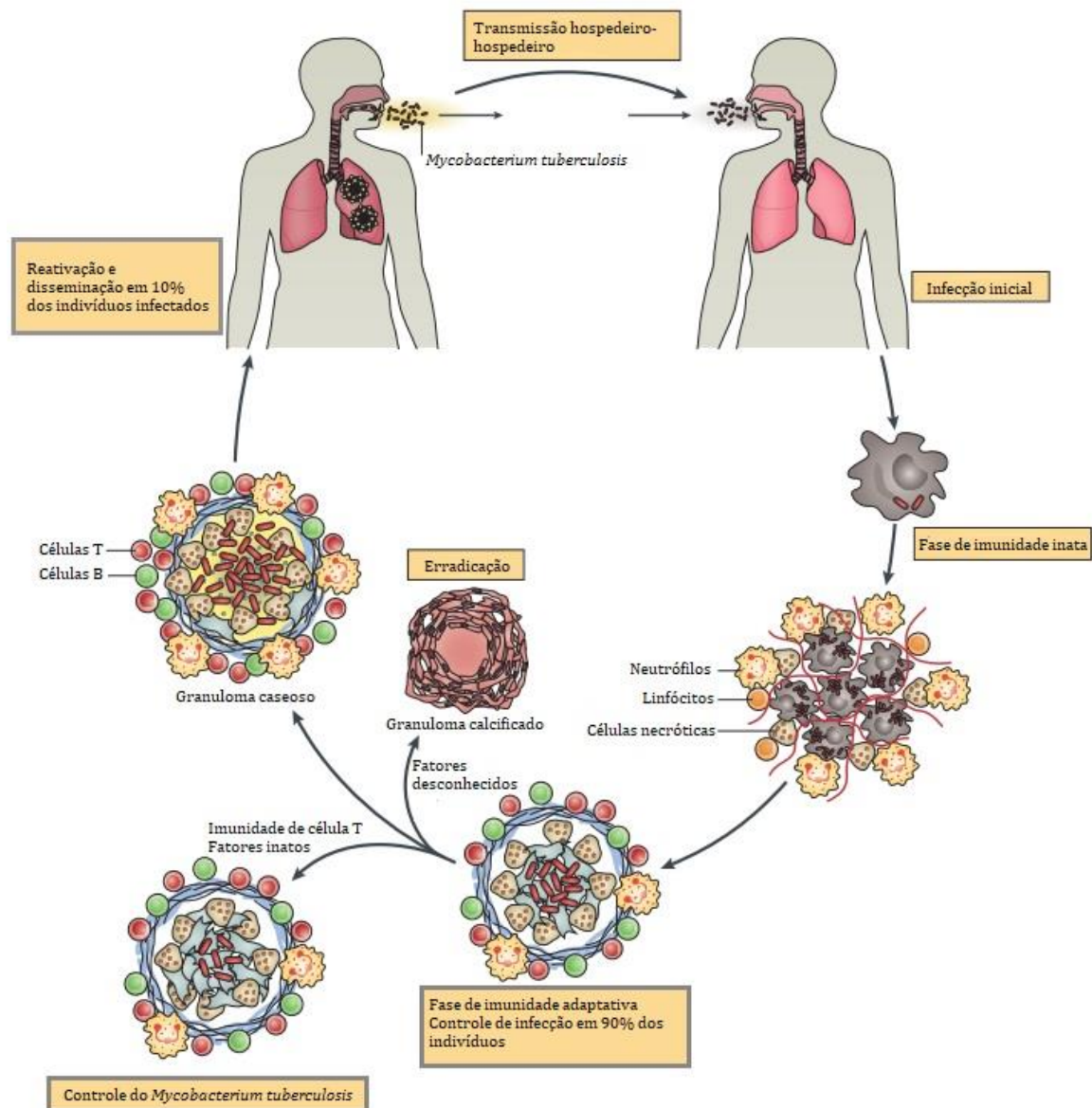


Figura 3. Representação esquemática da transmissão e patogênese da TB. Fonte: Nature Reviews (NUNES-ALVES *et al.*, 2014).

Porém, em aproximadamente 5-10% dos casos, em indivíduos imunocomprometidos ou por declínio da imunidade natural, a doença se manifesta. Os granulomas, que anteriormente continham a disseminação do bacilo, agora se tornam locais com alta concentração micobacteriana e que, na maioria das vezes, não sofre com a ação dos

medicamentos. Além disso, o *M. tuberculosis* é capaz de burlar o sistema imunológico, sobrevivendo e se multiplicando dentro das células macrofágicas, por atividade do sistema de secreção ESAT-6-1 descrito anteriormente (CHAI *et al.*, 2020; SCHOREY; SCHLESINGER, 2016; VOSKUIL *et al.*, 2003).

A replicação bacilar dentro do granuloma e dentro dos macrófagos promoverá lise celular e extravasamento do material citoplasmático, levando ao surgimento de uma lesão necrótica tecidual e um espalhamento da infecção. Nesse cenário, o *M. tuberculosis* consegue se disseminar pelo organismo via sistema linfático e circulatório, gerando novo núcleo de infecção no próprio pulmão em regiões apicais ou ainda a TB extrapulmonar (CARDONA, 2018; MOULE; CIRILLO, 2020).

Nesse momento o paciente encontra-se então com a doença ativa e transmissível, iniciando um novo ciclo patogênico. Para controle da infecção, apenas o tratamento medicamentoso e melhorias nas condições de saúde do paciente podem ajudar na reversão e/ou melhora do quadro.

1.4. Tratamento

O tratamento padrão estabelecido para os pacientes diagnosticados com TB ativa constitui-se da utilização concomitante de quatro antimicrobianos: rifampicina (RFP), etambutol (ETH), pirazinamida (PZA) e isoniazida (INH), administrados em única dose, uma vez ao dia por 2 meses, seguido por mais 4 meses de tratamento com RFP e INH (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Para os casos de TB latente, o principal esquema de tratamento estabelecido se faz com a utilização de INH em doses diárias por um período de 6 meses (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019)

De acordo com a OMS, de 6 milhões de pacientes em 2015, o acesso ao tratamento aumentou de forma significativa para 7,1 milhões de pessoas em 2019, um aumento que chegou a representar 71% dos pacientes diagnosticados ao redor de todo o mundo. De maneira exemplar, o Brasil superou esse número em 2019, pois pôde garantir acesso ao tratamento para 80% dos pacientes diagnosticados (WHO, 2020).

Infelizmente, esses dados supostamente não se mantiveram em 2020 e 2021 devido à situação pandêmica. Acredita-se que o acesso ao diagnóstico e tratamento da TB apresente quedas acentuadas devido à diminuição do acesso promovida pela quarentena global (WHO, 2020).

A diminuição do acesso ao tratamento associada ao abandono do mesmo por parte dos pacientes, pode acarretar o surgimento de cepas resistentes e, dessa forma, o tratamento padrão previsto que se configura de 6 meses, acaba se prolongando ainda mais, por no mínimo 2 anos.

Nesses casos de infecção por cepas resistentes, o esquema modifica-se de forma abrangente. Para que seja efetivo, é preciso que se classifique a resistência da cepa em questão e, em janeiro de 2021, a OMS atualizou a definição para cepas resistentes de acordo com as características de resistência apresentadas na tabela 1 a seguir (WHO, 2021).

A nova classificação definiu que cepas pré-XDR-TB são cepas MDR-TB com resistência a qualquer fármaco da classe das fluoroquinolonas e, cepas XDR-TB ainda apresentam resistência a pelo menos um dos fármacos do Grupo A, que são os fármacos mais potentes utilizados para o tratamento de segunda-linha, sendo eles: levofloxacina, moxifloxacina, bedaquilina e linezolida (WHO, 2021).

Essa classificação das cepas foi desenvolvida com o intuito de aprimorar os esquemas de tratamento e ofertar aos pacientes diagnosticados melhores esquemas de acordo com característica de resistência da infecção apresentada (WHO, 2021).

Tabela 1. Classificação das cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*.

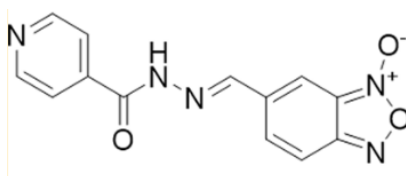
Classificação da cepa de <i>Mtb</i>	Resistente a RFP	Resistente a INH	Resistente a qualquer FLQ	Resistente aos fármacos do grupo A
RR- TB	X			
MDR – TB	X	X		
Pré- XDR -TB	X	X	X	
XDR -TB	X	X	X	X

Siglas: *Mtb*: *Mycobacterium tuberculosis*; RFP: rifampicina; INH: isoniazida; FLQ: fluoroquinolonas; AMG: aminoglicosídeos; Fármacos grupo A: linezolida, levofloxacina, bedaquilina e moxifloxacina; RR: resistente a rifampicina; MDR: multidrogas resistentes; XDR: extensivamente resistente.

1.5. Justificativa e Hipótese

Considerando a atual situação epidemiológica da TB no mundo, as características patogênicas e evolutivas do bacilo e ainda o crescente aparecimento de cepas resistentes aos fármacos já utilizados, este trabalho foi delineado e desenvolvido a partir da síntese de novos compostos benzofuranos que, previamente, já apresentaram excelente atividade contra o *M. tuberculosis*.

A partir dos resultados obtidos anteriormente em nosso grupo, por Dos Santos Fernandes e Souza *et al.* (2017), foram desenvolvidos 31 novos compostos benzofuroxanos a partir da estrutura molecular do composto BZ8 apresentado na Figura 4 (DOS SANTOS FERNANDES *et al.*, 2017).



Composto BZ8

Figura 4. Composto BZ8. Fonte: (DOS SANTOS FERNANDES *et al.*, 2017)

O composto BZ8 apresentou-se como o mais ativo frente a *M. tuberculosis* em suas análises *in vitro* e, posteriormente, *in vivo*, dentro de uma grande coleção previamente sintetizada. De acordo com os autores, ele apresentou valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) de 1,10 e 6,62 µM frente *M. tuberculosis* em estado ativo e não-replicante, respectivamente. Foi ativo ainda contra cepas mono-resistentes e promoveu a esterilização pulmonar após tratamento por 29 dias em camundongos Balb/c (administrado em microemulsão via-oral, 5x/semana, 200 mg/kg/animal em volume de 200 µL) (DOS SANTOS FERNANDES *et al.*, 2017).

Apesar do grande potencial apresentado pelo BZ8, melhorias poderiam ser obtidas e, por meio da síntese de uma nova série de compostos, estabelecemos a hipótese de que novos benzofuroxanos derivados do BZ8 poderiam ser mais ativos frente a bactérias em estado replicante e não-replicante e ainda apresentar atividade frente isolados multirresistentes e que fossem ainda mais seguros, estáveis e biodisponíveis (considerando uma administração direta *in vivo*).

Dos 31 compostos previamente sintetizados, 18 apresentaram valores de CIM₉₀ frente a cepa padrão de *M. tuberculosis* H₃₇Rv em concentração inferior a 25 µg/mL e, por isso, foram escolhidos para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

2. Objetivos

3. Materiais e Métodos

4 Resultados e Discussão

5 Conclusão

A busca de novos fármacos para o tratamento da tuberculose se justifica devido a problemática da resistência aos antimicrobianos e o aumento do número de casos e óbitos notificados nos últimos anos.

O estudo do potencial dos compostos benzofuroxanos desenvolvido nesse projeto foi amplo e profundo visto que buscamos avaliar suas atividades *in vitro* aplicando diferentes técnicas e *in vivo* como forma de prever seu mecanismo de ação.

Dos 18 compostos inicialmente avaliados pudemos observar diversas melhorias em seus potenciais biológicos frente a *M. tuberculosis* se comparados ao seu composto precursor, o BZ 8. Principalmente se avaliarmos os resultados obtidos para o composto líder denominado TB 10, que apresentou as melhores respostas mediante as análises realizadas em cada etapa do trabalho.

As melhorias apresentadas correspondem a todas as suposições criadas em nossa hipótese: encontrar um composto que apresentasse maior potencial inibitório frente cepa padrão de *M. tuberculosis* H₃₇Rv, atividade inibitória contra isolados clínicos multirresistentes e ainda melhor biodisponibilidade *in vivo*.

A maior vantagem dentre as descritas se deu pela capacidade do TB 10 em inibir bactérias com perfil de múltiplas resistências aos fármacos da terapia padrão da tuberculose. Sendo essa uma das principais problemáticas entorno do tratamento, encontrar um novo composto com esse perfil é de grande valia.

Além de promissor nesses cenários, os compostos apresentaram valores de índice de seletividade satisfatórios, demonstrando baixa citotoxicidade *in vitro* e alta segurança *in vivo*, como observado após tratamento diário em altas doses.

In vivo ainda foram capazes de inibir consideravelmente o crescimento do *M. tuberculosis* sensível sem a necessidade de proteção que garantisse sua estabilidade estrutural, como o BZ8 anteriormente requeria.

O composto TB 10 apresentou também atividade sinérgica quando em associação com a RFP, estreito espectro de ação e ainda será avaliado quanto ao seu mecanismo de ação por meio de análise de dados de sequenciamento genômico.

Acreditamos, portanto, que com o descobrimento do mecanismo de ação estaremos diante de um novo e promissor composto que tem forte potencial para se tornar um fármaco componente de esquema de tratamento efetivo contra *M. tuberculosis* sensível e resistente.

Referências

ADAMS, Kristin N. *et al.* Diverse Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Develop Macrophage-Induced Rifampin Tolerance. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 219, n. 10, p. 1554–1558, 2019.

ALDOUS, Wade K. *et al.* Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 2471–2473, 2005.

ALLIANCE, Global *et al.* Handbook of anti-tuberculosis agents. Introduction. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 85–86, 2008.

ALTAF, Mudassar *et al.* Evaluation of the *Mycobacterium smegmatis* and BCG models for the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* inhibitors. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 90, n. 6, p. 333–337, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2010.09.002>.

BALGANESH, Meenakshi *et al.* Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 2643–2651, 2012.

BEHR, Marcel A. *et al.* Latent tuberculosis: Two centuries of confusion. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 204, n. 2, p. 142–148, 2021.

BELISLE, John T. *et al.* Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. **Science**, [s. l.], v. 276, n. 5317, p. 1420–1422, 1997.

BROWN, Lisa *et al.* Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 620–630, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3480>.

CALEFFI-FERRACIOLI, Katiany R. *et al.* Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 93, n. 6, p. 660–663, 2013.

CALEFFI-FERRACIOLI, Katiany R. *et al.* Morphological changes and differentially expressed efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* exposed to a rifampicin and verapamil combination. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 97, p. 65–72, 2016.

CAMPOS, Debora L. *et al.* Bactericidal effect of pyridine-2-thiol 1-oxide sodium salt and its complex with iron against resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antibiotics**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 120–124, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41429-019-0243-3>.

CARDONA, Pere-Joan. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 38–46, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimce.2017.10.009>.

CHAI, Qiyao *et al.* New insights into the evasion of host innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*. **Cellular and Molecular Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 901–913, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0502-z>.

CHANWONG, Sakarin *et al.* Intracellular growth and drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 87, n. 2, p. 130–133, 2007.

DAFFÉ, M.; ETIENNE, G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. **Tubercle and Lung Disease**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 153–169, 1999.

DAHL, John L. Electron microscopy analysis of *Mycobacterium tuberculosis* cell division. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 240, n. 1, p. 15–20, 2004.

DAHL, John L. Scanning electron microscopy analysis of aged *Mycobacterium tuberculosis* cells. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 277–281, 2005.

DOOKIE, Navisha *et al.* Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 73, n. 5, p. 1138–1151, 2018.

DOS SANTOS FERNANDES, Guilherme Felipe *et al.* Design, Synthesis, and Characterization of N-Oxide-Containing Heterocycles with in Vivo Sterilizing Antitubercular Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 60, n. 20, p. 8647–8660, 2017.

ELINGS, Wouter *et al.* B-Lactamase of Mycobacterium tuberculosis Shows Dynamics in the Active Site That Increase upon Inhibitor Binding. **Antimicrobail Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 1–13, 2020.

FERLUGA, Janez *et al.* Natural and trained innate immunity against Mycobacterium tuberculosis. **Immunobiology**, [s. l.], v. 225, n. 3, 2020.

FERNANDES, Guilherme F. S. *et al.* Benzofuroxan Derivatives as Potent Agents against Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. **ChemMedChem**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 1268–1282, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.202000899>.

FORBES, Lauren *et al.* A high throughput screening assay for anti-mycobacterial small molecules based on adenylate kinase release as a reporter of cell lysis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1–14, 2015.

FORRELLAD, Marina A. *et al.* Virulence factors of the mycobacterium tuberculosis complex. **Virulence**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.

GAO, Wei; HOWDEN, Benjamin P.; STINEAR, Timothy P. Evolution of virulence in Enterococcus faecium, a hospital-adapted opportunistic pathogen. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 41, p. 76–82, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.030>.

GOOSSENS, Sander N; SAMPSON, Samantha L; RIE, Annelies Van. Mechanisms of drug-induced tolerance in Mycobacterium tuberculosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 34, n. October 2020, p. 1–21, 2021.

GORRIE, Claire *et al.* Genomics of vancomycin-resistant enterococcus faecium. **Microbial Genomics**, [s. l.], v. 5, n. 7, 2019.

HASHEMIAN, Seyed Mohammad Reza; FARHADI, Tayebbeh; GANJPARVAR, Mojdeh. Linezolid: A review of its properties, function, and use in critical care. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. 12, p. 1759–1767, 2018.

HENRY BOOM, W.; SCHAIBLE, Ulrich E.; ACHKAR, Jacqueline M. The knowns and unknowns of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 131, n. 3, p. 20–22, 2021.

HEYSELL, Scott K. *et al.* Sensititre MycoTB plate compared to bactec MGIT 960 for first- and second-line antituberculosis drug susceptibility testing in Tanzania: A call to operationalize MICs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 59, n. 11, p. 7104–7108, 2015.

JANKUTE, Monika *et al.* Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 405–423, 2015. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-091014-104121>.

KADURA, Suha *et al.* Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed *Mycobacterium tuberculosis* drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], p. 1–13, 2020.

KANIPE, Carly; PALMER, Mitchell V. *Mycobacterium bovis* and you: A comprehensive look at the bacteria, its similarities to *Mycobacterium tuberculosis*, and its relationship with human disease. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 125, n. June, p. 102006, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102006>.

KOCH, Anastasia; MIZRAHI, Valerie. *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 555–556, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.012>.

KORNFELD, Hardy; MANCINO, Giorgio; COLIZZI, Vittorio. The role of macrophage cell death in tuberculosis. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 71–78, 1999.

MACHADO, Diana *et al.* Ion channel blockers as antimicrobial agents, efflux inhibitors, and enhancers of macrophage killing activity against drug resistant mycobacterium tuberculosis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1–28, 2016.

MALTEMPE, Flaviane Granero *et al.* Activity of rifampicin and linezolid combination in Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 104, p. 24–29, 2017.

MATSUMOTO, Makoto *et al.* OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. **PLoS Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 2131–2144, 2006.

MELANDER, Roberta J.; ZURAWSKI, Daniel V.; MELANDER, Christian. Narrow-spectrum antibacterial agents. **MedChemComm**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 12–21, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C7MD00528H>.

MIGLIORI, G. B. *et al.* 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: The new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic? **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 423–427, 2007.

MOTAMEN, Sara; QUINN, Ronald J. Analysis of Approaches to Anti-tuberculosis Compounds. **ACS Omega**, [s. l.], v. 5, n. 44, p. 28529–28540, 2020.

MOULE, Madeleine G.; CIRILLO, Jeffrey D. Mycobacterium tuberculosis Dissemination Plays a Critical Role in Pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. February, p. 1–12, 2020.

MOURIK, Bas C. *et al.* Improving treatment outcome assessment in a mouse tuberculosis model. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-24067-x>.

NILLER, Hans Helmut *et al.* Pathogenic mechanisms of intracellular bacteria. **Current Opinion in Infectious Diseases**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 309–315, 2017. Disponível em: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00001432-201706000-00009>.

NUNES-ALVES, Cláudio *et al.* In search of a new paradigm for protective immunity to TB. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 289–299, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3230>.

OTTO, Michael. *Staphylococcus epidermidis* - the “accidental” pathogen. **Nat Rev Microbiol**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 555–567, 2009.

PALOMINO, Juan-carlos *et al.* Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobail Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PAVAN, Fernando R. *et al.* Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 598–601, 2010.

PEDDIREDDY, Vidyullatha; DODDAM, Sankara Narayana; AHMED, Niyaz. Mycobacterial dormancy systems and host responses in tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 8, n. FEB, p. 1–19, 2017.

PELOQUIN, Charles A.; DAVIES, Geraint R. The Treatment of Tuberculosis. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 1455–1466, 2021.

PINHEIRO, Marina *et al.* Interactions of isoniazid with membrane models: Implications for drug mechanism of action. **Chemistry and Physics of Lipids**, [s. l.], v. 183, p. 184–190, 2014.

QUIGLEY, Jeff *et al.* The cell wall lipid PDIM contributes to phagosomal escape and host cell exit of Mycobacterium tuberculosis. **mBio**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 1–12, 2017.

RAMIREZ, Maria S.; TOLMASKY, Marcelo E. Amikacin: Uses, resistance, and prospects for inhibition. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 12, 2017.

RODRIGUES, Liliana *et al.* Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: Correlation with antibiotic resistance. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 35, 2011. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/35>.

RODRIGUES, Liliana; CRAVO, Pedro; VIVEIROS, Miguel. Efflux pump inhibitors as a promising adjunct therapy against drug resistant tuberculosis: a new strategy to revisit mycobacterial targets and repurpose old drugs. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 741–757, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1760845>.

RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. *et al.* Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 7, p. 2513–2517, 2001.

SCHOREY, Jeffrey S; SCHLESINGER, Larry S. Innate Immune Responses to Tuberculosis. [s. l.], p. 1–27, 2016.

SHARIQ, Mohd *et al.* COVID-19 and tuberculosis: the double whammy of respiratory pathogens. **European Respiratory Review**, [s. l.], v. 31, n. 164, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1183/16000617.0264-2021>.

SIA, Jonathan Kevin; GEORGIEVA, Maria; RENGARAJAN, Jyothi. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Innate Immune Cells. **Journal of Immunology Research**, [s. l.], v. 2015, 2015.

SINIGAGLIA, Alessandro *et al.* Tuberculosis-Associated MicroRNAs: From Pathogenesis to Disease Biomarkers. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 1–23, 2020.

SOLCIA, Mariana Cristina *et al.* Growth-inhibitory effects of tris-(1,10-phenanthroline) iron (II) against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and in vivo. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 128, n. April, p. 1–8, 2021.

T, Joseph Antony Sundarsingh *et al.* Features of the biochemistry of *Mycobacterium*

smegmatis, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Infection and Public Health**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 1255–1264, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.023>.

TANG, Patrick; JOHNSTON, James. Treatment of Latent Tuberculosis Infection. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, [s. l.], p. 371–379, 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s40506-017-0135-7>.

TURNER, Richard D. *et al.* Tuberculosis Infectiousness and Host Susceptibility. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 216, n. S6, p. S636–S643, 2017.

VAN BAMBEKE, F. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 1055–1065, 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkg224>.

VARDEVANYAN, P. O. *et al.* The binding of ethidium bromide with DNA: Interaction with single- and double-stranded structures. **Experimental and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 527–533, 2003.

VASAVA, Mahesh S. *et al.* A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 252–275, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijtb.2017.03.002>.

VOSKUIL, Martin I. *et al.* Inhibition of Respiration by Nitric Oxide Induces a *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy Program. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 198, n. 5, p. 705–713, 2003. Disponível em: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20030205>.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2020**. [S. l.: s. n.], 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2017**. Geneva: [s. n.], 2017. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259366/1/9789241565516-eng.pdf?ua=1>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2021**. [S. l.: s. n.], 2021. *E-book*. Disponível em: <http://apps.who.int/bookorders.%0Ahttps://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Latent tuberculosis infection Updated and consolidated guidelines for programmatic management. **Patient Care**, [s. l.], v. 38, n. 8, p. 13–14, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2022 (Monitoring health of the SDGs)**. [S. l.: s. n.], 2022. *E-book*. Disponível em: <http://apps.who.int/bookorders>.

XU, Junjie *et al.* A unique Mycobacterium ESX-1 protein co-secretes with CFP-10/ESAT-6 and is necessary for inhibiting phagosome maturation. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 3, p. 787–800, 2007.

YADAV, Prakrati *et al.* Integrating health planning and primary care infrastructure for COVID-19 and tuberculosis care in India: Challenges and opportunities. **International Journal of Health Planning and Management**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 632–642, 2022.

ZUIGA, Joaquin *et al.* Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, [s. l.], v. 2012, 2012.