

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 26/08/2025.

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

FERNANDA MANAIA DEMARQUI

Mecanismo de ação e atividade *in vitro* e *in vivo* do complexo tris(1,10-fenantrolina)ferro(II) frente a *Mycobacterium tuberculosis*

ARARAQUARA – SP
Fevereiro/2024

FERNANDA MANAIA DEMARQUI

Mecanismo de ação e atividade *in vitro* e *in vivo* do complexo tris(1,10-fenantrolina)ferro(II) 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

Fevereiro/2024

-
- D372m** Demarqui, Fernanda Manaia.
Mecanismo de ação e atividade *in vitro* e *in vivo* do complexo tris(1,10-fenantrolina)ferro(II) frente a *Mycobacterium tuberculosis* / Fernanda Manaia Demarqui. – Araraquara, 2024.
84 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. Complexo ([Fe(fen)₃]²⁺). 3. Tuberculose. I. Pavan, Fernando Rogério, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Mecanismo de ação e terapêutico *in vitro* e *in vivo* do complexo tris(1,10-fenantrolina)ferro(II) frente a *Mycobacterium tuberculosis*

AUTORA: FERNANDA MANAIA DEMARQUI

ORIENTADOR: FERNANDO ROGERIO PAVAN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências, área de conhecimento: Microbiologia pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. ALEXANDRE CUIN (Participação Virtual)
Departamento de Química / Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Profa. Dra. DANIELA FERNANDES RAMOS (Participação Virtual)
Faculdade de Medicina / Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Dra. ERICA CHIMARA SILVA (Participação Virtual)
Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses / Instituto Adolfo Lutz

Araraquara, 26 de fevereiro de 2024

Dedicatória

Dedico este trabalho às minhas irmãs, Laís e Letícia,
minhas companheiras de vida que silenciosamente
me guiaram até aqui.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, que foram fonte de inspiração para a conclusão desse trabalho, minhas irmãs, meus maiores exemplos de cuidado e força e meus cunhados pelos momentos de descontração e alegria e por cuidarem dos meus tesouros.

Agradeço aos meus sobrinhos por todo o amor e aprendizado, todos os abraços apertados e por entenderem a distância que se fez necessária nesses anos.

Agradeço ao Juliano, por sempre segurar a minha mão e nunca sequer ter hesitado em me apoiar, me ensinando muito mais do que eu jamais sonhei aprender.

Agradeço aos amigos da Ciência que passaram pela minha vida durante todos esses anos. Aos amigos Amanda, Jéssica, Murilo e Victor, muito obrigada por se fazerem presentes e serem minha fonte inesgotável de conhecimento variado. Aos amigos Angélica, Mariana, Maria Olívia, Otávio, Tatiana, Suelen e Weslei, obrigada pela companhia, pela amizade e pelo carinho de sempre. As amigas Camila, Karyn e Débora, agradeço o apoio permanente e constante, pelos ensinamentos e pelas tantas histórias que ficarão sempre guardadas.

Agradeço as minhas queridas alunas de iniciação científica, Vitória Kinoshita e Rafaela Pogianeli, por me permitirem ser parte da trajetória acadêmica de vocês. O aprendizado constante em que nos mantivemos foi profundamente enriquecedor.

Agradeço ao Doutor Masanori Asai, a Doutora Sandra Newton e ao Professor Paul Langford pela confiança que me foi creditada e pela oportunidade única que tive de aprender com três profissionais excepcionais. Agradeço a *Imperial College London* por abrir as portas para mim para que eu realizasse meu estágio no exterior e ao Programa Capes-PrInt pela bolsa concedida.

Agradeço aos colegas do Grupo de Pesquisa em Tuberculose pelas trocas e companhia ao longo desses anos, em especial ao Christian Shleider Carnero Canales pela colaboração com o desenvolvimento da análise de *docking* molecular.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, ao Corpo Docente e Discente e a Secretaria de Pós-Graduação por todo o auxílio ofertado.

Agradeço à banca, pela presença e disponibilidade em contribuir nessa etapa final do meu trabalho.

Por fim, agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Fernando Rogério Pavan, que compreendeu e acolheu as minhas dificuldades, me fez crescer acadêmica e pessoalmente e me permitiu chegar até aqui da forma mais leve possível.

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

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em
procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”*

Marcel Proust

Resumo

O tratamento disponível contra a tuberculose é composto por uma combinação de medicamentos antimicobacterianos, isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida para casos de tuberculose sensível a medicamentos. No entanto, o regime de tratamento é longo, com duração de seis meses ou mais, e associado a efeitos colaterais tóxicos. Este trabalho busca, baseado em trabalhos anteriores do grupo, aprofundar o estudo sobre o Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) como um possível candidato a fármaco contra a tuberculose e outras micobactérias não tuberculosas (MNT). Para tanto, experimentos *in vitro* foram realizados para avaliação da atividade do complexo frente as diferentes micobactérias; o mecanismo de ação foi determinado através do Sequenciamento Completo do Genoma de mutantes espontaneamente resistentes e a eficácia *in vivo* foi avaliada em modelo experimental de camundongos BALB/C. Para *M. tuberculosis* os resultados obtidos mostram que o Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) possui sinergismo a fármacos de primeira linha além de ter melhora em sua atividade em concentrações fisiológicas de NaCl. Mutações encontradas no genoma de mutantes resistentes apontam que o Complexo atua em processos relacionados a síntese de parede bacteriana, resultado que foi corroborado pela avaliação da morfologia celular após exposição ao tratamento por microscopia eletrônica de varredura (MEV). *In vivo*, o Complexo mostrou-se altamente efetivo não sendo observado crescimento bacteriano após tratamento de camundongos infectados com *M. tuberculosis*. Os casos de doenças, causadas pelas chamadas MNT vem aumentando a cada ano. O tratamento dessas infecções é por vezes mais longo do que da tuberculose. O Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) foi ativo contra três isolados clínicos de MNT. No ensaio de cinética bacteriana, ele teve comportamento bactericida contra a cepa padrão de *M. abscessus*. Em síntese, os resultados obtidos sugerem que o Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) pode representar uma alternativa promissora no arsenal terapêutico contra a tuberculose e infecções por micobactérias não tuberculosas, oferecendo uma abordagem inovadora e potencialmente mais eficaz para o tratamento dessas doenças.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), tuberculose.

Abstract

The available treatment for tuberculosis consists of a combination of antimycobacterial drugs, including isoniazid, rifampicin, ethambutol, and pyrazinamide for drug-sensitive cases of tuberculosis. However, the treatment regimen is lengthy, lasting six months or more, and is associated with toxic side effects. This study aims, based on previous work from the group, to deepen the investigation into the Complex ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) as a potential drug candidate against tuberculosis and other non-tuberculous mycobacteria (NTMs). To achieve this, *in vitro* experiments were conducted to assess the complex's activity against different mycobacteria; the mechanism of action was determined through Whole Genome Sequencing of spontaneously resistant mutants, and *in vivo* efficacy was evaluated in a BALB/C mouse experimental model. For *M. tuberculosis*, the results indicate that the Complex ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) exhibits synergy with first-line drugs and shows improved activity at physiological concentrations of NaCl. Mutations found in the genome of resistant mutants suggest that the Complex acts on processes related to bacterial cell wall synthesis, a result corroborated by the evaluation of cellular morphology after treatment through scanning electron microscopy (SEM). *In vivo*, the complex proved to be highly effective, with no observed bacterial growth after treating mice infected with *M. tuberculosis*. Cases of diseases by NTMs have been increasing each year. The treatment for these infections is sometimes longer than that for tuberculosis. The Complex ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) was active against three clinical isolates of NTM. In the bacterial kinetics assay, it exhibited bactericidal behavior against the standard strain of *M. abscessus*. In summary, the results obtained suggest that the Complex ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) may represent a promising alternative in the therapeutic arsenal against tuberculosis and infections by non-tuberculous mycobacteria, offering an innovative and potentially more effective approach to treating these diseases.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, ($[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$) Complex, tuberculosis.

Capítulo 1

1. Introdução

O gênero *Mycobacterium* é um dos gêneros bacterianos mais antigos definidos. Ele constitui o único gênero dentro da família *Mycobacteriaceae*, da ordem *Actinomycetales*. O nome do gênero faz alusão à aparência semelhante a fungos das culturas de micobactérias em meios líquidos (do grego "mycos", fungo). Elas são definidas como bacilos, não móveis, aeróbicas ou microaerofílicas, não formadoras de esporos e resistentes a ácido-álcool (RASTOGI; LEGRAND; SOLA, 2001). As micobactérias formam um gênero bastante vasto e heterogêneo, contendo 172 espécies e 13 subespécies com nomenclatura reconhecida, e novas espécies são frequentemente descritas. A grande maioria das micobactérias são organismos do ambiente que podem vir a causar doença e são conhecidas como Micobactérias não tuberculosas (MNT), no entanto, o gênero também contém dois dos patógenos mais temidos na história humana: *M. tuberculosis* e *M. leprae* (HUSSAIN, 2007).

Esta primeira parte da introdução é dedicada a algumas características comuns deste gênero diverso, enquanto os capítulos seguintes abordarão especificamente o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e as MNT.

Devido à sua estrutura de parede celular, por exemplo, todas as micobactérias exibem um alto nível de resistência a agentes antimicrobianos, como desinfetantes químicos e antibióticos (RASTOGI; LEGRAND; SOLA, 2001; FALKINHAM, 2009). A parede celular das micobactérias é um dos fatores responsáveis pelo crescimento lento característico desses organismos. Mesmo as espécies referidas como micobactérias de crescimento rápido levam até sete dias para formar colônias maduras em meios sólidos (HOWARD; BYRD, 2000; RASTOGI; LEGRAND; SOLA, 2001). Dado que a parede celular das micobactérias é uma das características mais notáveis deste gênero, a próxima seção deste capítulo é dedicada a esse assunto.

1.1 A parede celular micobacteriana

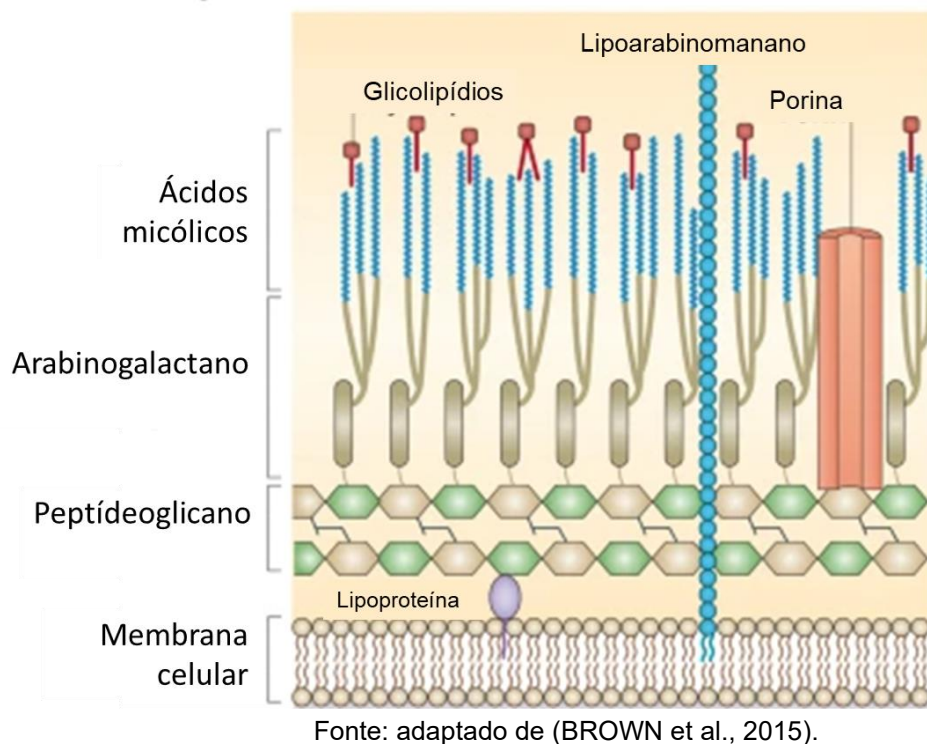
A parede celular das micobactérias é uma das mais complexas de todas as paredes celulares bacterianas e confere muitas de suas características distintivas, incluindo a característica de resistência ao álcool-ácido e a resistência natural a muitos antibióticos, ao gênero *Mycobacterium* (CHATTERJEE, 1997; COLE et al., 1998). Sua estrutura esquemática é representada na **Figura 1**. As camadas mais internas do

envelope celular das micobactérias, ou seja, a membrana citoplasmática e a camada de peptidoglicano, são muito semelhantes à parede celular de bactérias gram-positivas. A camada de peptidoglicano é cercada por uma camada de arabinogalactano composta por uma macromolécula de polissacarídeo ramificado, constituída por arabinose e galactose. Essa estrutura serve como ancoragem para um dos componentes mais importantes da parede celular das micobactérias; uma densa camada de ácidos micólicos de cadeia longa. Os ácidos micólicos são ácidos graxos alifáticos compostos por duas cadeias, uma curta com 22-26 átomos de carbono e outra longa com 50-56 átomos de carbono. Além dessa estrutura básica, as cadeias de ácidos micólicos podem conter cadeias laterais metiladas, grupos metoxi, ligações insaturadas e anéis ciclopropano (KOLATTUKUDY et al., 1997; KAUR et al., 2009).

Os anéis ciclopropano contribuem para a virulência das micobactérias ao proteger o organismo contra derivados tóxicos de oxigênio, e sua ocorrência está associada a espécies patogênicas (CHATTERJEE, 1997; KOLATTUKUDY et al., 1997). A camada de ácidos micólicos é cercada por outra camada de ácidos graxos de cadeia longa composta por trealose dimicolatos e sulfolipídios, que exerce uma série de efeitos na interação hospedeiro-patógeno, notadamente interferindo na fagocitose e na resposta imune inata (KAUR et al., 2009). As cadeias de carbono dos ácidos micólicos e dos lipídios externos se intercalam em certa medida, formando uma estrutura semelhante a um zíper (ZUBER et al., 2008). Os micósides, moléculas complexas geralmente pertencentes à classe de peptidoglicolipídios, são encontrados na parte externa do envelope das micobactérias. Por fim, a parede celular das micobactérias contém o lipoarabinomanano, um polissacarídeo ramificado.

Figura 1 – Parede celular micobacteriana. As paredes celulares das micobactérias consistem em finas camadas de peptidoglicano e arabinogalactano, e uma espessa camada de ácidos micólicos.

Glicolipídios e porinas também são encontrados nessas paredes celulares, assim como o lipoarabinomanano, que é ancorado à membrana celular pelo diacilglicerol. Esta parede celular envolve uma única membrana lipídica.



1.2 Tuberculose, um problema de saúde global

1.2.1 Epidemiologia

A tuberculose encontra-se entre as doenças infecciosas que mais matam no mundo. Além do aspecto agressivo da doença em indivíduos com a infecção ativa, calcula-se que cerca de um quarto da população mundial, cerca de dois bilhões de pessoas, esteja atualmente infectado com *Mycobacterium tuberculosis*, seu principal agente etiológico, mas não apresentam a forma ativa da doença. Globalmente, em 2022, 7,5 milhões de pessoas foram diagnosticadas e oficialmente notificadas como novos casos de tuberculose. Isso representou um aumento em relação ao nível pré-COVID (7,1 milhões em 2019), 16% acima do nível de 2021, 28% acima do nível de 2020 e o maior número para um único ano desde que a OMS iniciou o monitoramento global da tuberculose em meados da década de 1990 (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2023).

Em três das seis regiões monitoradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) - Mediterrâneo Oriental, Sul da Ásia Oriental e Pacífico Ocidental - observou-se um pequeno declínio no número absoluto de casos, enquanto regiões como África e Europa apresentaram uma diminuição mais acelerada. A região das Américas mostra-se a mais preocupante visto que apresenta um lento aumento na incidência

devido, em especial, a uma tendência de alta no Brasil desde 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

1.2.2 A história da tuberculose

A tuberculose é uma doença muito antiga e tem acompanhado a humanidade por vários milênios. Ela é mencionada em textos médicos antigos da China, Índia, Egito e Grécia (DANIEL, 2006), e o DNA de micobactérias foi encontrado em múmias egípcias (ZINK et al., 2007) e mais recentemente em uma múmia pré-colombiana no Peru (KONOMI et al., 2002). A partir do século 17, casos de tuberculose pulmonar aumentaram vertiginosamente na Europa até se tornar a principal causa de morte em adultos nos séculos 18 e início do 19; as taxas de mortalidade nas cidades norte-americanas correspondiam às observadas nas capitais europeias (DANIEL, 2006). Em resposta à magnitude avassaladora da doença, a tuberculose, muitas vezes chamada de “consumo” na época, foi romantizada e aparece em muitas obras literárias desse período. A partir do final do século 19, a epidemia começou a diminuir e as taxas de mortalidade por tuberculose começaram a reduzir na Europa e na América do Norte (BUIKSTRA, 2005). O tratamento convencional da tuberculose antes dos antibióticos era baseado em ar fresco, alta altitude e sanatórios.

Em 1865, Jean-Antoine Villemin estabeleceu que a tuberculose era de fato uma doença infecciosa e, em 1882, Robert Koch finalmente conseguiu isolar o patógeno da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecido como bacilo de Koch. Quase 40 anos depois, Albert Calmette e Camille Guérin realizaram a primeira vacinação contra a tuberculose (usando *M. bovis* atenuado) e logo depois, a BCG (Bacilo Calmette-Guérin) foi amplamente usada para imunizar crianças na França e em outros lugares. Finalmente, a descoberta da estreptomicina, o primeiro antibiótico que exerce atividade bactericida contra *M. tuberculosis* em 1944, tornou possível o tratamento eficaz da tuberculose.

1.2.3 A patogênese

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *M. tuberculosis* e outros membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) tradicionalmente dividida

entre suas formas ativa (infecciosa e sintomática) e latente (não infecciosa e assintomática). No entanto, essa classificação indica apenas os dois extremos do espectro da doença. Sabe-se atualmente que parte da população infectada pode vir a apresentar uma forma infecciosa ativa com quadro clínico inconclusivo e até mesmo ausência de sintomas, sendo classificada como tuberculose subclínica (KENDALL; SHRESTHA; DOWDY, 2021). Juntas, as formas subclínica e os casos de tuberculose latente formam um grande reservatório de *M. tuberculosis*, tornando a erradicação da tuberculose uma meta difícil de ser atingida.

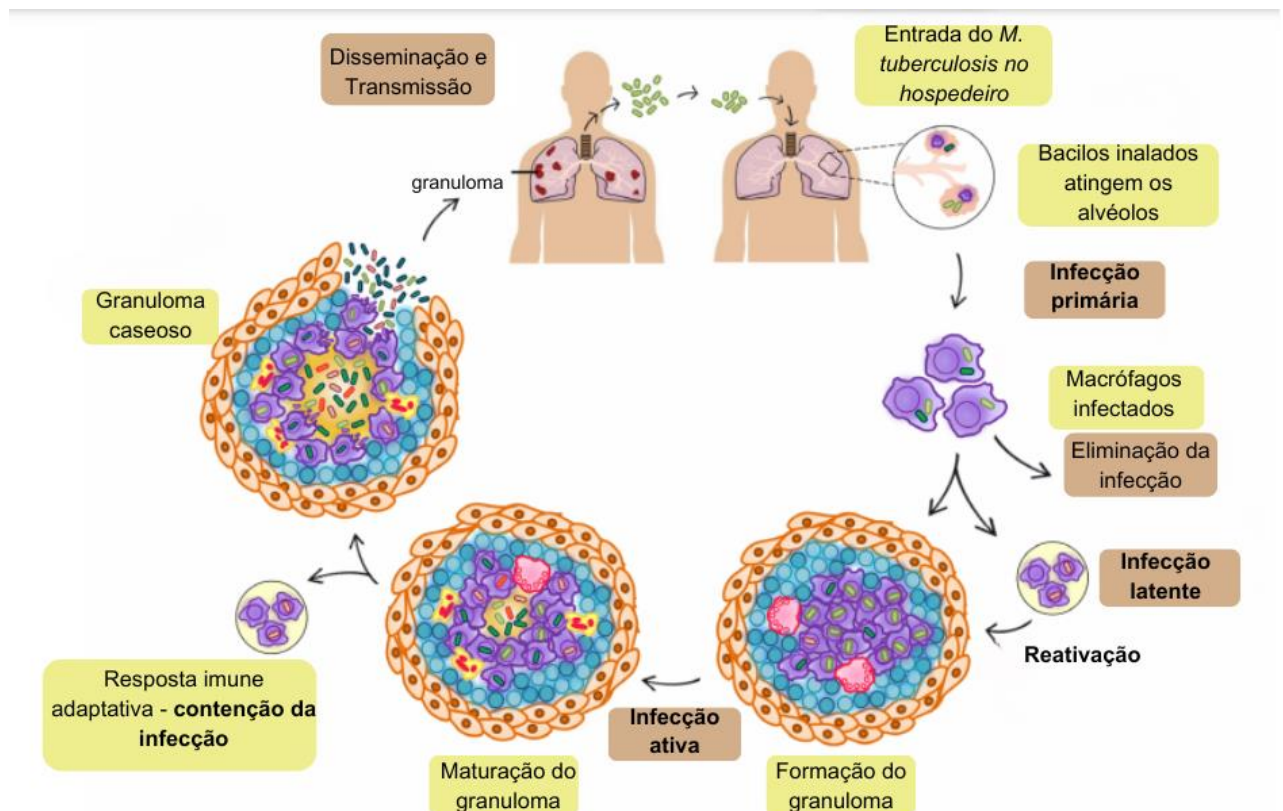
A transmissão da tuberculose ocorre quando uma pessoa com a doença ativa expulsa bacilos de *M. tuberculosis* em gotículas microscópicas (1-5 µm de diâmetro) de saliva ou pela tosse, por exemplo. Essas gotículas são suficientemente pequenas para permanecerem no ar por várias horas, o que também permite que alcancem os alvéolos sem serem retidas pelo sistema mucociliar. A tuberculose é uma doença que tipicamente se desenvolve nos pulmões (tuberculose pulmonar) mas que pode afetar outros órgãos (tuberculose extrapulmonar). Ao serem inalados, os bacilos se depositam nos alvéolos terminais onde são inicialmente encontrados e fagocitados por macrófagos e outras células dendríticas. Dentro dos macrófagos, *M. tuberculosis* é capaz de sobreviver e se multiplicar, sendo este seu primeiro nicho intracelular (SMITH, 2003; PHILIPS; ERNST, 2012).

Células imunes que carregam bacilos podem ser transportadas para além da barreira alveolar, causando uma infecção sistêmica. Em indivíduos saudáveis, esse pode ser o fim da infecção, com a erradicação precoce da bactéria anteriormente ao desenvolvimento da resposta imune adaptativa, que ocorre de 2 a 8 semanas após a infecção (VERRALL et al., ; ARNVIG; YOUNG, 2012; KANABALAN et al., 2021).

Quando a infecção progride, a ativação dos macrófagos juntamente com a resposta imune adaptativa resulta na fusão fagossomo-lisossomo e na liberação de uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias que, apesar de consolidarem a resposta imune do hospedeiro, causam inflamação e danos ao tecido pulmonar. A tuberculose ativa desenvolvida através de uma infecção primária ou de reativação de uma infecção latente é caracterizada pela replicação ativa de *M. tuberculosis* e pela necrose do tecido pulmonar causada pela resposta pró-inflamatória excessiva do hospedeiro (O'GARRA et al., 2013; KUMAR et al., 2019).

Ainda durante a patogênese, células do sistema imune infectadas começam a se agregar e são centralmente compartimentalizadas por fagócitos de modo a formar outra característica fundamental da tuberculose: o granuloma. A integridade estrutural dos granulomas é mantida pelo equilíbrio entre a perda e o recrutamento de células imunes que ocorre em indivíduos saudáveis, originando um granuloma maduro (EHLERS; SCHAIBLE, 2013). Sob tais condições, a bactéria entra em um estado metabolicamente inativo, ou seja, ainda é viável, mas encontra-se dormente e não replicante, que é induzido pelas condições de hipoxia no interior do granuloma, levando a forma de tuberculose latente. Em um indivíduo cujo sistema imunológico está comprometido, a desregulação do equilíbrio pode ocorrer ao longo do tempo, levando à reativação da tuberculose. A **Figura 2** representa graficamente a patogênese e a formação do granuloma.

Figura 2. Patogênese e formação do granuloma em tuberculose. A infecção com *M. tuberculosis* pode resultar um espectro variado de desfechos. A infecção primária se origina com a inalação de bacilos de *M. tuberculosis* para o interior dos pulmões. Após a fagocitose, uma lesão pulmonar pode vir a se formar. Durante a infecção ativa, os macrófagos infectados iniciam uma resposta inflamatória, recrutando células do sistema imunológico inato para que a infecção seja contida em um granuloma. A infecção pode ser encerrada pela resposta imune ou em resposta ao tratamento. Alternativamente, a infecção pode permanecer estável, em estado latente, por muitos anos. Em um episódio de reativação da tuberculose, a infecção pode progredir para a cavitação de granulomas, levando a liberação de bacilos de *M. tuberculosis* nas vias aéreas



Fonte: adaptado de (PARBHOO; SAMPSON; MOUTON, 2020).

1.3 Diagnóstico e tratamento

Atualmente, o método mais difundido para detectar a tuberculose latente é o teste cutâneo de tuberculina. Ele é baseado em uma reação de hipersensibilidade tardia à injeção intradérmica de tuberculina, uma preparação de antígenos de *M. tuberculosis* que indica a existência de imunidade mediada por células contra micobactérias (COLE et al., 1998; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). É importante notar que um resultado positivo no teste cutâneo não necessariamente indica infecção por tuberculose, uma vez que a vacinação com BCG ou o contato com certas micobactérias não tuberculosas também resultam no desenvolvimento de imunidade mediada por células contra micobactérias. Por outro lado, a imunossupressão (causada por medicamentos imunossupressores ou pelo HIV, por exemplo) resultará em uma reação de hipersensibilidade mais fraca (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). Uma alternativa ao teste cutâneo de tuberculina é o ensaio de liberação de interferon- γ (IGRA). Este ensaio *in vitro*, disponível em diferentes versões, mede a liberação de interferon- γ a partir de células T em resposta à exposição a antígenos específicos de *M. tuberculosis* (LALVANI et al., 2001).

A tuberculose pulmonar geralmente causa anormalidades (ou seja, nódulos, infiltrados ou cavidades) na radiografia de tórax, no entanto, especialmente pacientes soropositivos para o HIV com tuberculose ativa podem apresentar resultados radiográficos imperceptíveis (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000). Para validar o diagnóstico de tuberculose, é necessário confirmar a presença de *M. tuberculosis* em uma amostra do paciente. Para a tuberculose pulmonar, os testes bacteriológicos são mais comumente realizados usando o escarro, mas outras amostras, como lavagens gástricas ou aspirados brônquicos, também são usados. Se houver suspeita de tuberculose extrapulmonar, a amostra será adaptada ao local da suposta doença.

O método bacteriológico mais rápido e amplamente utilizado para confirmar a tuberculose é o cultivo das micobactérias a partir da amostra clínica. Com um limite de detecção de 10 UFC/mL, este método é muito mais sensível do que a microscopia de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). Além disso, o teste de sensibilidade a medicamentos requer o cultivo da cepa infectante. Para cultivar micobactérias a partir de uma amostra clínica, a amostra é homogeneizada e descontaminada e inoculada em meio de cultura sólido (Löwenstein-Jensen ou Middlebrook 7H10 ou 7H11) ou líquido (Middlebrook 7H9 ou 7H12), tornando-se seletivo pela adição de antibióticos.

Meios líquidos têm a grande vantagem de proporcionar um crescimento muito mais rápido das bactérias. Tipicamente, o crescimento micobacteriano é detectável após 1-3 semanas no meio líquido, enquanto as colônias no meio sólido se tornam visíveis somente após 3-8 semanas. Com base no resultado positivo do cultivo, a espécie de micobactéria do isolado é identificada. Além disso, estão disponíveis ensaios com sondas de ácido nucleico que permitem a identificação dos membros do MTBC, bem como 39 espécies de MNT (GenoType® MTBC e Mycobacterium CM/AS, Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemanha).

A recuperação de *M. tuberculosis* (ou outro membro do MTBC) de uma amostra clínica confirma o diagnóstico de tuberculose. Atualmente, o tratamento de primeira linha disponível contra a tuberculose é composto por uma combinação de medicamentos antimicobacterianos, geralmente consistindo em isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (ETH) e pirazinamida (PZA) para casos de tuberculose sensível a medicamentos (OMS, 2017). No entanto, o regime de tratamento é longo, com duração de seis meses ou mais, e associado a efeitos colaterais tóxicos (TWEED et al., 2018). Em casos de resistência, outros fármacos são considerados, como será detalhado no tópico a seguir. O emprego da poliquimioterapia é preferencial como tratamento pois reduz rapidamente a carga micobacteriana, limitando a morbidade, mortalidade e transmissão da doença; tem como alvo a população micobacteriana persistente e minimiza o risco de resistência a medicamentos (LEE et al., 2020).

Os fármacos de primeira e segunda linha foram desenvolvidos há mais de 50 anos, durante a “época de ouro dos antibióticos”. A bedaquilina (BDQ), (Sirturo, TMC207), foi o primeiro fármaco a surgir com um novo mecanismo de ação após um longo período, sendo aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 2012 e, então, introduzida na terapia de cepas resistentes pela OMS (OSBORNE, 2013). Ensaios clínicos envolvem a introdução da bedaquilina na terapêutica, assim como a associação de novas gerações dos fármacos de primeira linha, diminuição do tempo de tratamento e substituições dos fármacos injetáveis (BÉLARD et al., 2015). A delamanida foi aprovada pela Agência Europeia de Medicamentos em 2014, apresentando um potencial efeito bactericida contra *M. tuberculosis* (RYAN; LO, 2014). Também em 2014, a Pretomanida foi aprovada pela FDA para o tratamento de tuberculose resistente ao tratamento preconizado (FDA, 2014). Já a Linezolida foi aprovada pela FDA em 2000 para o tratamento de infecções resistentes causadas por

bactérias gram-positivas. Em 2003, os primeiros resultados *in vitro* da atividade da linezolida contra *M. tuberculosis* sensível ou resistente aos fármacos de primeira linha foram publicados e ao longo dos anos, outros estudos foram realizados até que em 2013 Lee e colaboradores demonstraram o seu uso para o tratamento de tuberculose extensivamente resistente com resultados de um ensaio clínico (TATO et al., 2006; MIN et al., 2013). Desde então, ensaios clínicos vêm sendo realizados na busca pela melhor adequação desses novos antibióticos em termos de dosagem, duração de tratamento e combinações a serem ofertadas

1.4 Resistência

M. tuberculosis pode desenvolver resistência a antibióticos através de vários mecanismos como: a) Mutações: A bactéria pode adquirir mutações genéticas que alteram o alvo do antibiótico, tornando-o menos eficaz; b) Bombas de efluxo: *M. tuberculosis* possui bombas de efluxo que podem bombear antibióticos para fora de sua célula, reduzindo a concentração da droga em seu interior; c) Enzimas: A bactéria pode produzir enzimas que inativam os antibióticos, tornando-os menos eficazes; d) Formação de biofilme: biofilmes são comunidades de bactérias cercadas por uma matriz protetora. Os biofilmes podem proteger a bactéria dos antibióticos, dificultando o tratamento; e) Tolerância a antibióticos: *M. tuberculosis* pode entrar em um estado de dormência, no qual é menos metabolicamente ativo e menos suscetível a antibióticos (AL-SAEEDI; AL-HAJJOJ, 2017).

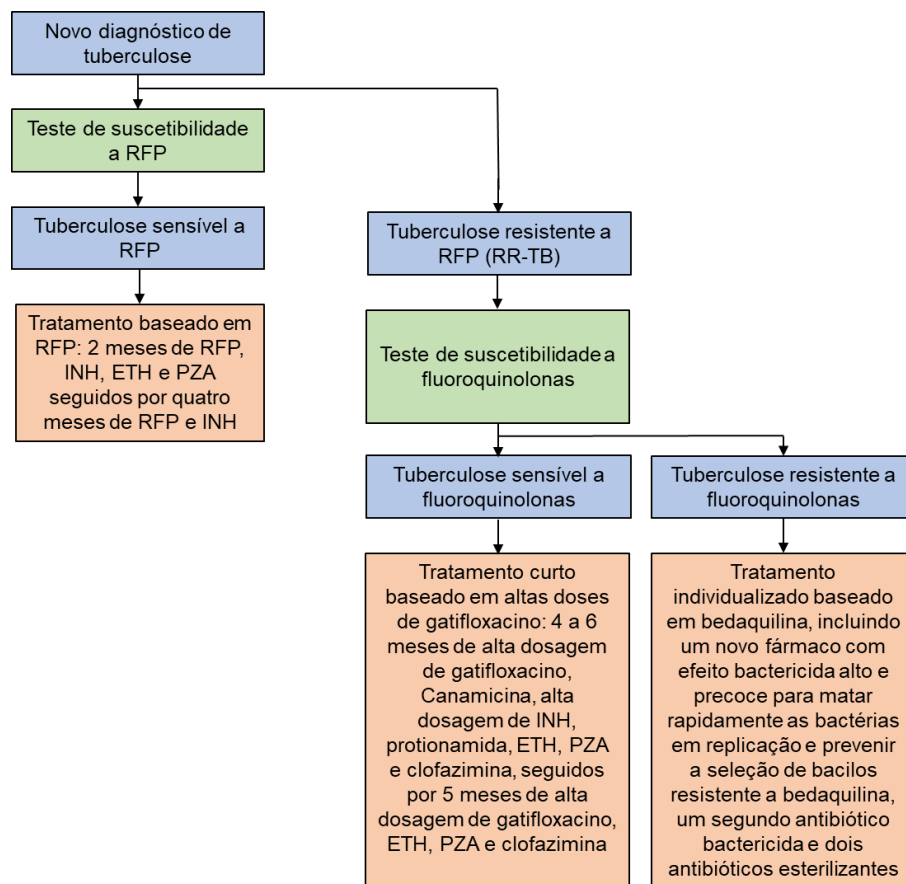
Esses mecanismos de resistência podem ocorrer isoladamente ou em combinação, levando a cepas multirresistentes de *M. tuberculosis*. O aumento dessas cepas é uma preocupação crescente de saúde pública. Outro fator interessante é que *M. tuberculosis* não carrega elementos móveis, sendo suas mutações todas cromossomais.

A classificação das cepas de *M. tuberculosis* resistentes é baseada nos fármacos de primeira (RIF e INH) e segunda linha fluoroquinolonas (FLQ) e fármacos injetáveis: cepas rifampicina-resistentes (RR-TB), multi-fármaco resistentes (MDR-TB), resistentes a rifampicina e isoniazida; pré-extensivamente resistentes (XDR-TB), apresentam resistência adicional a fluoroquinolonas (PRASAD; SRIVASTAVA, 2013; CHAUDHARI et al., 2016) e totalmente resistentes (XDR-TB), são as cepas pré-XDR-

TB com resistência adicional a bedaquilina e/ou linezolida. Essa classificação é utilizada nas estimativas globais de casos de tuberculose (RIBEIRO, ; SEAWORTH; GRIFFITH, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). A **Figura 3** mostra o manejo do tratamento de acordo com a suscetibilidade da cepa ao tratamento.

MDR e XDR-TB são responsáveis por altos níveis (43%) de falha no tratamento (WHO, 2020). Devido ao limitado avanço na descoberta de medicamentos para tuberculose, apenas três novos compostos: bedaquilina, delamanida e pretomanida, foram desenvolvidos e aprovados para uso clínico nas últimas quatro décadas (TIBERI et al., 2018). Para cumprir os objetivos da “End TB strategy” da OMS, são urgentemente necessários medicamentos e regimes de tratamento mais seguros, eficazes e eficientes. Em agosto de 2021, havia 25 compostos antimicobacterianos nas fases 1, 2 e 3 de ensaios clínicos. Entre esses encontram-se dezesseis novos compostos, incluindo dois que receberam aprovação regulatória acelerada, um que foi recentemente aprovado pela FDA para uso exclusivo antifúngico e antibacteriano e o reposicionamento de seis compostos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Figura 3. Cascata de tratamento contra a tuberculose



Fonte: adaptado de (DECROO et al., 2020).

1.5 Pesquisa de novos fármacos - Complexos metálicos

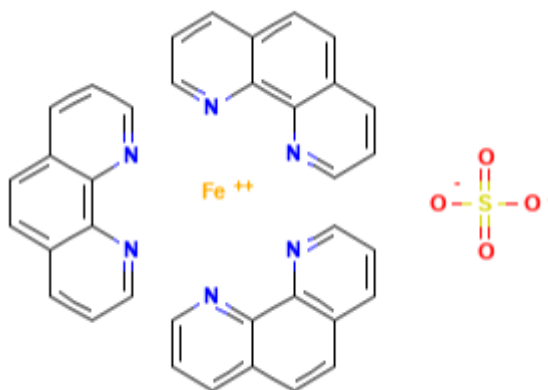
No âmbito da busca por novos medicamentos, diversas abordagens são empregadas, incluindo o desenvolvimento de novas classes de fármacos, a síntese de análogos de medicamentos e o reposicionamento de fármacos, que envolve atribuir um novo uso a compostos já conhecidos e comercializados (PAVAN et al., 2011; LAW et al., 2013). Esta tese representa a continuidade à pesquisa do grupo (SOLCIA et al., 2021), propondo a reutilização do complexo metálico ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), que até então não foi descrito como fármaco.

Estudos mostram que complexos metálicos, particularmente aqueles contendo metais de transição como ferro, cobre e cobalto, tem potencial para serem utilizados como antibióticos, podendo agir por uma variedade de mecanismos, incluindo interferência com enzimas bacterianas, geração de espécies reativas de oxigênio, rompimento da membrana celular bacteriana e inibição da replicação do DNA bacteriano (DORKOV et al., 2008; PANDYA et al., 2022).

Embora o uso de complexos metálicos como antibióticos seja promissor, ainda há muitos desafios a serem superados incluindo o desenvolvimento de complexos metálicos com alto índice de seletividade para bactérias, além de melhorar a farmacocinética e a farmacodinâmica desses compostos para torná-los mais eficazes para uso como antibióticos.

A fenantrolina (fen) é uma molécula ligante altamente competente na coordenação com diversos metais e exibe uma notável atividade anti fúngica *in vitro* a 37°C (COYLE et al., 2003). A sua complexação com o ferro resulta na formação do complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), que foi o foco desse trabalho (**Figura 4**). O uso da fenantrolina tem sido amplamente explorado ao longo de décadas devido à sua versatilidade química, apresentando uma excelente combinação de propriedades estruturais e químicas, além de ser biologicamente ativa, com atividade antifúngica documentada (BOTTEGA et al., 2016). Além dessas características, esse composto químico é facilmente adquirido comercialmente, solúvel em água e possui baixo custo, fatores relevantes ao considerar seu potencial contra a tuberculose.

Figura 4. Estrutura química do Sulfato de tris-(1,10-fenantrolina)ferro(II) - $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$



Fonte: *pubchem*. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24848008>.

Neste cenário, o trabalho de Solcia e colaboradores (SOLCIA et al., 2021), desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em tuberculose da UNESP, aponta o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ como um promissor candidato a fármaco para o tratamento da tuberculose, sendo ativo e seletivo contra *M. tuberculosis* sensível, em cepas resistentes ao tratamento convencional e em bacilos em estado não replicante, apontando para ação em tuberculose latente. Ensaio de verificação de atividade intracelular mostram resultados do complexo semelhante a rifampicina, com uma inibição de aproximadamente 60% do crescimento bacteriano em dose igual a duas vezes a sua CIM..

Ainda no trabalho de Solcia, verificou-se que o complexo não possui perfil mutagênico, apresenta baixa citotoxicidade frente a linhagens celulares (macrófagos J774A.1, fibroblastos MRC-5 e hepatócitos HepG2) e estreito espectro de ação, sendo altamente seletivo para inibição de micobactérias. O complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ incorporado a um Sistema Lipídico Nanoestruturado (SLN) do tipo microemulsionado mostrou-se biodisponível 2h após a administração, com pico de concentração plasmática após 6 horas. O complexo não apresentou toxicidade aguda quando administrado via oral em doses de 300 e 2000 mg/kg por 14 dias em camundongos BALB/c

A incorporação do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ a um SLN, visa aumentar a estabilidade, melhorar sua biodisponibilidade e, possivelmente, potencializar a ação do composto, reduzindo a dosagem e os possíveis efeitos colaterais. Em um novo trabalho desenvolvido por Machado esse sistema foi caracterizado, tendo sido testada

sua estabilidade de armazenamento e em diferentes meios de cultura e pHs, apresentando características interessantes que favoreceriam a circulação do $\text{SLN}+([\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+})$ no organismo (MACHADO, 2021).

Frente ao exposto, o complexo metálico $([\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+})$ representa uma proposta interessante a ser considerada para o tratamento da tuberculose, sendo de baixo custo, fácil acesso e apresentando bons resultados preliminares.

1.5 Modelos animais na pesquisa de novos fármacos contra a tuberculose

O avanço na pesquisa em tuberculose tem dependido bastante de modelos de infecção em animais, o que permite aos pesquisadores compreender a patogênese, progressão da doença e a biologia interativa entre patógeno e hospedeiro. Além disso, os modelos animais desempenharam um papel fundamental na avaliação da eficácia e toxicidade de medicamentos e vacinas antes de sua utilização em ensaios clínicos em humanos. Uma análise da literatura no banco de dados NCBI revelou que aproximadamente 35% dos artigos de pesquisa sobre tuberculose citaram o uso de modelos de infecção em animais em seus estudos (ZHAN et al., 2017). Camundongos, porquinhos-da-índia, coelhos, primatas não humanos e peixes-zebra são os animais mais comumente utilizados na pesquisa da tuberculose. Apesar de mimetizar um ou mais aspectos da doença, como sinais clínicos, progressão da doença, patologia e respostas imunológicas, cada modelo tem suas limitações biológicas. Além disso, desafios mais amplos associados ao uso de animais em pesquisa precisam ser superados, como regulamentação ética, custo, tempo, cuidados e a necessidade de instalações especializadas para animais. Portanto, nenhum modelo único é perfeito para todos os usos pretendidos.

Os camundongos são os animais mais popularmente utilizados na pesquisa da tuberculose, devido ao seu pequeno tamanho, facilidade de manejo e custo relativamente baixo (FONSECA et al., 2017). Como animais experimentais amplamente utilizados, sua fisiologia, imunologia e genética são extensivamente caracterizadas (BUCSAN et al., 2019). Camundongos (C57BL/6 ou BALB/c) infectados pelo trato respiratório por *M. tuberculosis* podem desenvolver uma doença pulmonar crônica com duração de até seis meses (YANG et al., 2021).

Historicamente, os modelos de camundongos forneceram uma abundância de informações sobre as interações imunológicas entre o *M. tuberculosis* e o hospedeiro, desempenhando um papel fundamental na identificação do papel dos linfócitos T (ORME; COLLINS, 1983). Os camundongos estão entre os modelos animais mais sofisticados na pesquisa, com a disponibilidade de linhagens puras e heterogêneas, *knockout* de genes e camundongos humanizados, possibilitando a realização de modelagens mais complexas da doença e estudos direcionados ao hospedeiro (YANG et al., 2021). Outro atrativo desse modelo é a grande variedade de reagentes imunológicos disponíveis para uso em ensaios funcionais (ZHAN et al., 2017).

Apesar de sua popularidade, há desvantagens no uso de camundongos como modelo para a tuberculose. A progressão da doença em camundongos pode variar amplamente de acordo com a cepa/dose de infecção aplicada e a cepa de camundongo utilizada (YANG et al., 2021). Avaliar a gravidade da doença é desafiador, pois os camundongos infectados não apresentam sintomas clínicos óbvios, como ocorre em humanos, até as fases posteriores da infecção (por exemplo, perda de peso, qualidade da pelagem, alterações comportamentais, irritação e inflamação localizada) (BOUTÉ et al., 2017; NEMETH et al., 2020). As cepas puras mais amplamente utilizadas, C57BL/6 e BALB/c, não desenvolvem granulomas como observado em humanos. Em vez disso, eles formam lesões difusas, não caseosas e não necróticas (KRAMNIK; BEAMER, 2016).

Embora existam modelos de infecção alternativos, mais éticos, como os de peixe-zebra e moscas-das-frutas, esses modelos requerem o uso de espécies de micobactérias substitutas, como *Mycobacterium marinum*, e podem apresentar respostas distintas das induzidas por *M. tuberculosis*. Dessa forma, há uma demanda por modelos alternativos de *M. tuberculosis* que possam reproduzir aspectos cruciais da doença, incluindo a formação de granulomas, que é uma característica distintiva da tuberculose em seres humanos (VAN LEEUWEN; VAN DER SAR; BITTER, 2002; DIONNE; GHORI; SCHNEIDER, 2003; PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018).

Nos últimos anos, a larva do inseto *Galleria mellonella* tornou-se um modelo popular para estudar a patogênese de bactérias Gram positivas e negativas e patógenos fúngicos (TSAI; LOH; PROFT, 2016; PEREIRA et al., 2018), tendo sido descrita em relação a mais de 65 patógenos bacterianos e fúngicos, com mais de 1500 artigos registrados no NCBI PubMed apenas na última década. A utilização da

G. mellonella como modelo de infecção se deve a diversas propriedades vantajosas. O complexo sistema imunológico inato da *G. mellonella* compartilha alta semelhança estrutural e funcional com a dos mamíferos e apresenta diversas vantagens em relação a modelos convencionais como a manutenção das larvas e seu tamanho reduzido, permitindo fácil manuseio e dosagem precisa de patógenos e/ou medicamentos; (ASAI et al., 2020, 2022).

Em trabalho de 2019 desenvolvido no laboratório do Professora Paul Langford e da Dr. Sandra Newton, da *Imperial College*, em Londres, Asai e colaboradores descrevem um novo modelo de infecção de larvas de *G. mellonella* com bactérias do complexo *M. tuberculosis* para triagem de compostos contra tuberculose, usando larvas infectadas com *Mycobacterium bovis* BCG *lux* bioluminescente (ASAI et al., 2019). Outro obstáculo a ser superado na pesquisa de tuberculose é a necessidade de ser realizada em laboratório de nível biossegurança 3 (NB3). Em um novo trabalho publicado em 2020, Asai e colaboradores apresentam um modelo de infecção utilizando o duplo mutante auxotrófico $\Delta leuD\Delta panCD$ da cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

No Laboratório de Pesquisa em Tuberculose da Unesp de Araraquara são realizadas diversas parcerias com laboratórios de Química Medicinal para triagem de novos compostos contra a tuberculose, além dos compostos aos quais são estudados um novo uso, como é o caso deste projeto. Para a triagem, em sua maioria, os ensaios realizados se restringiam a testes *in vitro*. O modelo de infecção e tratamento em *G. mellonella* traria uma abordagem *in vivo* inicial enriquecedora, alavancando os resultados e a discussão acerca dos resultados obtidos e possibilitando um melhor aproveitamento de tempo e de recursos financeiros.

Assim, parte do trabalho apresentado nesta tese foi realizado na *Imperial College*, em parceria com o Professor Paul Langford e a Dra. Sandra Newton, de forma que o modelo de infecção fosse estabelecido também no Laboratório de Pesquisa em Tuberculose da Unesp de Araraquara. Os resultados obtidos nesse período apontam que, apesar de promissor, o modelo de infecção tem limitações e deve ser utilizado com ressalvas a partir da análise inicial da composição química do seu composto ou fármaco.

Conclusão

Os resultados apresentados revelam a promissora atividade do Complexo contra a cepa BCG lux. Considerando o contexto global da tuberculose, uma doença que continua a representar um desafio significativo para a saúde pública, especialmente causada por *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*, as descobertas destacam a importância de explorar novas abordagens terapêuticas.

A sinergia observada com antibióticos de uso comum, como rifampicina e pretomanida, é encorajadora, sugerindo que o Complexo pode ser uma adição valiosa à terapia existente. A liberação controlada do complexo também foi investigada, mostrando uma taxa de liberação significativa em condições simuladas do estômago, indicando uma possível adequação para diferentes tipos de infecções.

Além disso, a análise do alvo molecular revelou uma possível interação do complexo com o gene PonA1, associado à síntese da parede bacteriana. A modelagem estrutural e o *docking* molecular apontaram para interações estáveis entre o complexo e diferentes bolsos da proteína PonA1.

A observação de mudanças fenotípicas nas células de *M. tuberculosis* após a exposição ao complexo, incluindo a perda do formato regular e a presença de tecido celular morto, sugere um impacto significativo na morfologia e integridade celular.

Ao avaliar a eficácia *in vivo* em larvas de *G. mellonella* previamente infectadas com BCG lux, os resultados indicam uma ausência de atividade significativa nas concentrações testadas. A hipótese de interação complexa entre a infecção, a metabolização do composto pelas larvas e o excesso de ferro presente no complexo pode ter contribuído para a diminuição na taxa de sobrevivência larval e o insucesso do tratamento.

Por outro lado, a atividade do Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) contra *M. tuberculosis* foi claramente evidenciada em um modelo murino. Os camundongos tratados com o complexo apresentaram uma redução significativa nas UFC, indicando uma eficácia superior ao tratamento convencional com isoniazida, um antibiótico de primeira linha. A ausência de crescimento micobacteriano em ambos os grupos tratados com o complexo, seja em sua forma livre ou associado a uma matriz lipídica, destaca sua potencial aplicação como um agente anti-tuberculose.

Em suma, os resultados destacam o potencial do Complexo como um agente terapêutico eficaz contra *M. tuberculosis*, promovendo sinergia com antibióticos existentes, mostrando atividade em diferentes condições e apresentando características favoráveis de liberação controlada. Considerando a crescente ameaça da resistência antimicrobiana, a identificação de novos compostos com amplo espectro de atividade e mecanismos de ação distintos é crucial para enfrentar desafios contínuos no tratamento da tuberculose. Dada a complexidade das interações entre compostos antimicrobianos e cepas bacterianas, estudos adicionais podem ser necessários para validar e compreender completamente os resultados observados.

Capítulo 2

1. Micobactérias não tuberculosas

O termo micobactérias não tuberculosas (MNT) designa todos os membros do gênero *Mycobacterium* que não fazem parte do complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae*. Às vezes, também são chamados de micobactérias atípicas, micobactérias ambientais ou micobactérias que não sejam de tuberculose (MOTT) e formam um grupo muito vasto e heterogêneo de microrganismos. A característica definidora das MNT é que, ao contrário do complexo MTBC e *M. leprae*, elas não são patógenos obrigatórios. Elas foram isoladas em uma ampla variedade de habitats terrestres e aquáticos, como poeira, aerossóis e biofilmes, bem como sistemas de distribuição de água doméstica e hospitalar (FALKINHAM, 2002; VAEREWIJCK et al., 2005). Sua ocorrência generalizada e persistência em sistemas de distribuição de água foram associadas à capacidade de formar rapidamente biofilmes (HALL-STOODLEY; LAPPIN-SCOTT, 1998), mediados por sua membrana externa hidrofóbica. Além disso, a impermeabilidade da parede celular das micobactérias as torna resistentes a vários desinfetantes, por exemplo, algumas espécies de micobactérias mostraram ser 330 vezes mais resistentes ao cloro, amplamente usado no saneamento da água potável, do que *Escherichia coli* (FALKINHAM, 2002; LE DANTEC et al., 2002). Além disso, foi demonstrado que algumas espécies de micobactérias, especialmente as potencialmente patogênicas, são capazes de sobreviver em amebas de vida livre e às vezes até em cistos de amebas, o que confere proteção adicional contra procedimentos de desinfecção para as bactérias (THOMAS; MCDONNELL, 2007).

No laboratório, a maioria das MNT cresce bem a 35°C nos meios de cultura usados para *M. tuberculosis* (Middlebrook 7H11, 7H9, LJ etc.). Existem, no entanto, algumas exceções; *M. xenopi* é mais termofílico, atingindo o crescimento ideal a 42°C – 45°C, enquanto outras espécies, como *M. ulcerans*, *M. marinum* ou *M. haemophilum*, preferem temperaturas em torno de 30°C (WALLACE; BROWN; GRIFFITH, 2003).

As MNT foram reconhecidas como patógenos humanos em potencial na década de 1930, mas não despertaram muito interesse de pesquisa até que suas frequências de isolamento aumentassem drasticamente no contexto da epidemia de AIDS. Avanços recentes na terapia antirretroviral resultaram em uma diminuição da incidência da doença pelo complexo de *M. avium* (MAC) disseminada em pacientes com AIDS; no entanto, a taxa de doença pulmonar por MNT parece estar aumentando

(WAGNER; YOUNG, 2004; PREVOTS; MARRAS, 2015). Nas últimas décadas, foram relatados aumentos nas frequências de isolamento de MNT em muitas partes do mundo (HENRY et al., 2004; MOORE et al., 2010; PREVOTS; MARRAS, 2015). Mudanças na população em geral, como o envelhecimento, o aumento no número de pessoas usando imunossupressores ou o aumento na prevalência de doenças pulmonares predisponentes, bem como uma maior conscientização dos médicos em relação às MNT e uma diminuição na imunidade cruzada devido à queda da tuberculose em países desenvolvidos, também são apontados como possíveis fatores contribuintes para esse aumento observado (WAGNER; YOUNG, 2004; VAN INGEN et al., 2009; MOORE et al., 2010; PREVOTS; MARRAS, 2015).

1.2 MNT como patógenos oportunistas

Várias espécies de MNT podem atuar como patógenos oportunistas. Elas têm sido implicados em uma variedade de doenças, como infecções de pele e tecidos moles, infecções de ossos e articulações, doenças pulmonares, linfadenite, infecções relacionadas a corpos estranhos (por exemplo, infecções relacionadas a cateteres) e bacteremia em pacientes com AIDS, entre outros (WAGNER; YOUNG, 2004; VAN INGEN et al., 2009). A doença por MNT está comumente associada a fatores predisponentes como imunossupressão, doença (pulmonar) subjacente ou trauma/cirurgia (WAGNER; YOUNG, 2004). A doença disseminada por *M. avium* constituía uma causa importante de morbidade e mortalidade em doentes terminais com AIDS antes da introdução da profilaxia com claritromicina e da terapêutica anti-retroviral altamente ativa (HORSBURGH et al., 2001; KARAKOUSIS; MOORE; CHAISSON, 2004). Embora a apresentação desta doença tenha diminuído fortemente como resultado dos avanços na terapia da AIDS, outras doenças micobacterianas estão em ascensão (WAGNER; YOUNG, 2004).

1.3 Doenças pulmonares

Apesar da falta de estudos populacionais que documentem a prevalência da doença pulmonar por MNT, estas infecções são consideradas cada vez mais comuns. Em países industrializados, a doença pulmonar é a manifestação clínica mais comum da doença por MNT, sendo organismos do MAC os agentes etiológicos mais comuns. Infelizmente, muitos estudos não identificaram os isolados MAC ao nível da espécie.

Descobriu-se recentemente que *M. avium* e *M. intracelulare*, as duas principais espécies do MAC, exibem uma patogenicidade distintamente diferente. Embora *M. avium* seja responsável pela grande maioria das infecções por MAC disseminadas em pacientes com AIDS, *M. intracelulare* apresenta um maior potencial patogênico para causar doença pulmonar em pacientes não-HIV. *M. kansasii*, *M. xenopi* e *M. abscessus* também são frequentemente associadas a doença pulmonar (WAGNER; YOUNG, 2004; WINTHROP et al., 2012; PREVOTS; MARRAS, 2015); esta última é particularmente preocupante em doentes como fibrose cística (JÖNSSON et al., 2007).

A doença pulmonar por MNT está frequentemente associada a doenças pulmonares estruturais, como doença pulmonar obstrutiva crônica, bronquiectasia, pneumoconiose, tuberculose prévia, cancro do pulmão ou, como mencionado anteriormente, fibrose cística (HENRY et al., 2004; GRIFFITH et al., 2012a). Além disso, *M. intracelulare* exibe uma predisposição para causar doença pulmonar em mulheres na pós-menopausa sem quaisquer fatores de risco óbvios (HAN et al., 2005). Ao contrário da tuberculose, o diagnóstico de doença pulmonar por MNT não pode ser estabelecido apenas baseado no isolamento de MNT de uma única amostra pulmonar. Vários critérios clínicos e microbiológicos devem ser atendidos para diagnosticar validamente a doença pulmonar por MNT e extensas diretrizes foram publicadas sobre esse assunto.

O diagnóstico de doenças causadas por MNT é também um fator de complicação já que essas bactérias são encontradas comumente no ambiente e pelo alto número de espécies detectadas, mais de 170. Frente a esse cenário, é notável que mais pesquisas devem ser realizadas para que doenças causadas por MNT possam ser diagnosticadas e tratadas de forma mais eficiente.

1.4 Infecções de pele e de tecidos moles

Numerosas espécies de MNT foram relatadas como implicadas em doenças cutâneas ao longo dos anos. Entre os patógenos cutâneos mais frequentes, além do *M. ulcerans*, está o *M. marinum*, um parente próximo do *M. ulcerans*, causando “granuloma de piscina” ou “granuloma de aquário”, afetando tipicamente os membros e apresentando-se como pápula violeta solitária (WAGNER; YOUNG, 2004; GRIFFITH et al., 2012a), como pode ser observado na **Figura 1**. As micobactérias de

crecimento rápido (RGM) *M. fortuitum*, *M. abscessus* e *M. chelonae* também estão frequentemente envolvidas em infecções de pele e tecidos moles. Tais infecções são, na maioria dos casos, precedidas por lesões que rompem a pele e permitem a entrada de bactérias e normalmente apresentam-se como uma infecção localizada. Após fratura exposta ou outros traumas que impliquem a inoculação da bactéria, todas as três espécies também podem causar infecções de ossos, articulações ou tendões (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002; WAGNER; YOUNG, 2004; GRIFFITH et al., 2012a).

Figura 1 - Disseminação linfangítica nodular esporotricóide característica do *Mycobacterium marinum*



Fonte: (FRANCO-PAREDES et al., 2019)

Em pacientes sob tratamento imunossupressor, foi observada doença cutânea disseminada. Esta apresentação da doença constitui a forma mais frequente da doença por *M. chelonae*. Além disso, no ambiente clínico, estas três espécies de RGM têm estado envolvidas em abscessos pós-injeção, infecções de feridas cirúrgicas e infecções relacionadas com cateteres (BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2002; WAGNER; YOUNG, 2004).

5. Conclusão

Os resultados desta pesquisa destacam o potencial do Complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) como um agente antimicrobiano ativo contra micobactérias não tuberculosas (MNT). Inicialmente, o complexo mostrou atividade contra diferentes

cepas de MNT, incluindo *M. abscessus*, *M. abscessus* subespécie *massiliense*, *M. abscessus* subespécie *bolleti* e *M. fortuitum*.

Além disso, o estudo revelou que o Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) age sinergicamente com a amicacina contra isolados clínicos de *M. abscessus* e *M. abscessus* subespécie *bolleti*. Essa sinergia é particularmente relevante, considerando a complexidade do tratamento de infecções causadas por MNT, que frequentemente requer terapias prolongadas e combinações de agentes antimicrobianos.

O Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) não apresentou atividade contra biofilmes de MNT. A resistência de biofilmes é uma característica desafiadora associada a infecções persistentes e recorrentes, o que destaca a necessidade de estratégias adicionais ou combinações terapêuticas para abordar esse aspecto da patogênese das MNT.

O Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) exibiu comportamento bactericida contra a cepa padrão ATCC de *M. abscessus* e isolados clínicos de *M. abscessus* e *M. abscessus* subespécie *bolleti*. Esses resultados sugerem que o complexo pode oferecer uma abordagem eficaz para o tratamento de infecções causadas por essas cepas de MNT.

Em suma, embora o Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) tenha apresentado promissora atividade antimicrobiana contra MNT, incluindo sinergia com a amicacina, a ausência de atividade contra biofilmes destaca a complexidade do desafio terapêutico associado a essas infecções. Estratégias adicionais e investigações mais aprofundadas são necessárias para explorar totalmente o potencial terapêutico desse complexo.

Referências

- AL-SAEEDI, M.; AL-HAJJOJ, S. Diversity and evolution of drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Drug Resistance**, 13 out. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S144446>. Acesso em: 7 fev. 2023.
- AMERICAN THORACIC SOCIETY. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. **American Review of Respiratory Disease**, v. 142, n. 3, p. 725–735, 2000.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nature Reviews Microbiology** 2010 8:4, v. 8, n. 4, p. 260–271, 8 mar. 2010. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2319>. Acesso em: 23 jan. 2024.
- ANZA, M. et al. Antimicrobial Activity, in silico Molecular Docking, ADMET and DFT Analysis of Secondary Metabolites from Roots of Three Ethiopian Medicinal Plants. **Advances and applications in bioinformatics and chemistry : AABC**, v. 14, p. 117–132, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34447254/>. Acesso em: 5 jan. 2024.
- ARNVIG, K. B.; YOUNG, D. B. Non-coding RNA and its potential role in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. <http://dx.doi.org/10.4161/rna.20105>, v. 9, n. 4, p. 427–436, 2012. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/rna.20105>>. Acesso em: 26 jan. 2023.
- ASAI, M. et al. *Galleria mellonella*: An Infection Model for Screening Compounds Against the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. November, 2019.
- ASAI, M. et al. A novel biosafety level 2 compliant tuberculosis infection model using a $\Delta\text{leuD}\Delta\text{panCD}$ double auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 811–824, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1781486>.
- ASAI, M. et al. *Galleria mellonella* as an infection model for the virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. 2022. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kvir20>. Acesso

em: 14 set. 2022.

BÉLARD, S. et al. Bedaquiline for the treatment of drug-resistant tuberculosis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 13, n. 5, p. 535–553, 2015.

BILLMAN-JACOB, H.; HAITE, R. E.; COPPEL, R. L. Characterization of a *Mycobacterium smegmatis* Mutant Lacking Penicillin Binding Protein 1. v. 43, n. 12, p. 3011–3013, 1999.

BOTTEGA, F. C. et al. Sais de tetrafenilfosfônio e tris(1,10-fenantroline)ferro(II) de complexos aniônicos de dibutilestanho(IV) com ditiocarbimatos: síntese, caracterização e atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 39, n. 5, p. 554–560, 1 jun. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160064>. Acesso em: 11 jun. 2021.

BOUTÉ, M. et al. The C3HeB/FeJ mouse model recapitulates the hallmark of bovine tuberculosis lung lesions following *Mycobacterium bovis* aerogenous infection. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, 7 nov. 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Recomendações Para O Diagnóstico E Tratamento Das Doenças Causadas Por Micobactérias Não Tuberculosas No Brasil**. [s.l.: s.n.].v. 1

BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing *Mycobacteria*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 716, out. 2002. Disponível em: [/pmc/articles/PMC126856/](http://pmc/articles/PMC126856/). Acesso em: 12 jan. 2024.

BROWN, L. et al. **Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi***Nature Reviews Microbiology* Nature Publishing Group, , 16 set. 2015. .

BRYANT, J. M. et al. Population-level genomics identifies the emergence and global spread of a human transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. **Science (New York, N.Y.)**, v. 354, n. 6313, p. 751, 11 nov. 2016. Disponível em: pmc/articles/PMC5142603. Acesso em: 23 jan. 2024.

BUCHANAN, A. N. et al. The current state of animal models and genomic approaches towards identifying and validating molecular determinants of *Mycobacterium*

tuberculosis infection and tuberculosis disease. **Pathogens and Disease**, v. 77, n. 4, 1 jun. 2019. Disponível em: pmc/articles/PMC6687098. Acesso em: 12 jan. 2024.

BUIKSTRA, C. A. R. J. E. The bioarchaeology of tuberculosis: a global view on a reemerging disease. **International Journal of Osteoarchaeology**, v. 15, n. 5, p. 383–385, 2005.

BURKHART, P. V.; SABATÉ, E. Adherence to Long-Term Therapies: Evidence for Action. **Journal of Nursing Scholarship**, v. 35, n. 3, p. 207–207, 1 set. 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1547-5069.2003.tb00001.x>. Acesso em: 23 jan. 2024.

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

CHATTERJEE, D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 1, n. 4, p. 579–588, 1 dez. 1997.

CHAUDHARI, K. et al. *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) GyrB inhibitors: An attractive approach for developing novel drugs against TB. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 160-185, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.034>.

CHEN, C. et al. In vitro degradation and drug-release properties of water-soluble chitosan cross-linked oxidized sodium alginate core-shell microgels. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 23, n. 16, p. 2007–2024, 2012.

COLE, S. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. November, p. 537–544, 1998.

COYLE, B. et al. Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes. **BioMetals**, v. 16, n. 2, p. 321–329, jun. 2003.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, p. 1862–1870, 2006.

DE LA RUA-DOMENECH, R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of

bovine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, n. 2, p. 77–109, 1 mar. 2006.

DECROO, T. et al. Tuberculosis treatment: one-shot approach or cascade of regimens? **The Lancet Respiratory**, v. 8, p. e4–e5, 2020. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/hand>>. Acesso em: 9 fev. 2023.

DIONNE, M. S.; GHORI, N.; SCHNEIDER, D. S. *Drosophila melanogaster* Is a Genetically Tractable Model Host for *Mycobacterium marinum*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3540–3550, 2003.

DORKOV, P. et al. Synthesis, structure and antimicrobial activity of manganese(II) and cobalt(II) complexes of the polyether ionophore antibiotic Sodium Monensin A. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 1, p. 26–32, jan. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17692921/>>. Acesso em: 6 fev. 2023.

DUNKOV, B.; GEORGIEVA, T. Insect iron binding proteins: Insights from the genomes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 4, p. 300–309, 1 abr. 2006.

EHLERS, S.; SCHAIBLE, U. E. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. **Frontiers in Immunology**, v. 3, Article 411, 2013. Disponível em: <http://www.frontiersin.org>. Acesso em: 6 fev. 2023.

ESTEBAN, J.; MUÑOZ-EGEA, M.-C. *Mycobacterium bovis* and Other Uncommon Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex . **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 6, 23 dez. 2016. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/spectrum>. Acesso em: 14 jan. 2024.

FALKINHAM, J. O. Nontuberculous mycobacteria in the environment. **Clinics in Chest Medicine**, v. 23, n. 3, p. 529–551, 1 set. 2002.

FALKINHAM, J. O. Surrounded by mycobacteria: Nontuberculous mycobacteria in the human environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 356–367, 2009.

FALZARI, K. et al. In vitro and in vivo activities of macrolide derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1447–1454, 2005.

FARHAT, M. R. et al. Genomic analysis identifies targets of convergent positive

selection in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1183–1189, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2747>.

FDA Approves new drug for treatment-resistant forms of tuberculosis that affects the lungs. FDA. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-drug-treatment-resistant-forms-tuberculosis-affects-lungs>. Acesso em: 22 jan. 2024.

FILIPPOVA, E. V. et al. Crystal structures of the transpeptidase domain of the *Mycobacterium tuberculosis* penicillin-binding protein PonA1 reveal potential mechanisms of antibiotic resistance. **FEBS Journal**, p. 2206–2218, 1 jun. 2016a.

FILIPPOVA, E. V et al. Crystal structures of the transpeptidase domain of the *Mycobacterium tuberculosis* penicillin-binding protein PonA1 reveal potential mechanisms of antibiotic resistance. **FEBS Journal**, v. 283, n. 12, p. 2206–2218, 2016b.

FONSECA, K. L. et al. Experimental study of tuberculosis: From animal models to complex cell systems and organoids. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2017. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC5560521>. Acesso em: 12 jan. 2024.

FRANCO-PAREDES, C. et al. Cutaneous mycobacterial infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 1, 1 jan. 2019. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/cmr>. Acesso em: 15 jan. 2024.

GAO, W. et al. The cyclic peptide ecumicin targeting CLpC1 is active against *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 880–889, 1 fev. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25421483>. Acesso em: 11 jun. 2021.

GOPALASWAMY, R. et al. Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections-a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, p. 74, 2020. Disponível em: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. TheCreativeCommonsPublicDomainDedicationwaiver. Acesso em: 22 nov. 2022.

GRIFFITH, D. E. et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 175, n. 4, p. 367–416, 20 dez. 2012a.

Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>. Acesso em: 1 dez. 2022.

GRIFFITH, D. E. et al. Clinical and Molecular Analysis of Macrolide Resistance in Mycobacterium avium Complex Lung Disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 174, n. 8, p. 928–934, 20 dez. 2012b. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.200603-450OC>. Acesso em: 23 jan. 2024.

HALL-STOODLEY, L.; LAPPIN-SCOTT, H. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species Mycobacterium fortuitum. **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, n. 1, p. 77–84, 1 nov. 1998. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13258.x>. Acesso em: 12 jan. 2024.

HAN, X. Y. et al. Clinical Significance and Epidemiologic Analyses of Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare among Patients without AIDS. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4407, set. 2005. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC1234053>. Acesso em: 12 jan. 2024.

Deatherage, D. E.; Barrick, J. E. Identification of Mutations in Laboratory-Evolved Microbes from Next-Generation Sequencing Data Using breseq. **Methods in Molecular Biology**, v. 1151, n. p. 1–8, 2014.

HENRY, M. T. et al. Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. **The European respiratory journal**, v. 23, n. 5, p. 741–746, maio 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15176690>. Acesso em: 12 jan. 2024.

HORSBURGH, C. R. et al. Disseminated Mycobacterium avium complex disease among patients infected with human immunodeficiency virus, 1985-2000. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 33, n. 11, p. 1938–1943, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11692307>. Acesso em: 12 jan. 2024.

HOWARD, S. T.; BYRD, T. F. The rapidly growing mycobacteria: Saprophytes and parasites. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 15, p. 1845–1853, 2000.

HOWER, V. et al. A general map of iron metabolism and tissue-specific subnetworks. **Molecular BioSystems**, v. 5, n. 5, p. 422–443, 2009.

HUGONETT, J.-E. et al. Meropenem-clavulanate is effective against extensively

drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 323, n. 11, p. 75, 2009.

HUSSAIN, T. Leprosy and tuberculosis: an insight-review. **Critical reviews in microbiology**, v. 33, n. 1, p. 15–66, jan. 2007. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17453929>. Acesso em: 7 mar. 2024.

JÖNSSON, B. E. et al. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with Focus on Cystic Fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1497, maio 2007. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC1865885>. Acesso em: 12 jan. 2024.

KANABALAN, R. D. et al. Human tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. **Microbiological Research**, v. 246, n. January, p. 126674, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126674>.

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

KARAKOUSIS, P. C.; MOORE, R. D.; CHAISSON, R. E. *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. **Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 9, p. 557–565, 1 set. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15336223>. Acesso em: 12 jan. 2024.

KAUR, D. et al. Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Advances in Applied Microbiology**, 2009. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html. Acesso em: 4 jan. 2024.

KELL, D. B. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. **BMC medical genomics**, v. 2, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19133145>. Acesso em: 14 jan. 2024.

KIESER, K. J. et al. Phosphorylation of the Peptidoglycan Synthase PonA1 Governs the Rate of Polar Elongation in *Mycobacteria*. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 6, e1005010. 2015.

KIM, D.-D. et al. Surface-modified solid lipid nanoparticles for oral delivery of docetaxel: enhanced intestinal absorption and lymphatic uptake. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 495, jan. 2014.

KOLATTUKUDY, P. E. et al. Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 263–270, 1997.

KONOMI, N. et al. Detection of mycobacterial DNA in andean mummies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4738–4740, 1 dez. 2002. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/jcm>. Acesso em: 4 jan. 2024.

KRAMNIK, I.; BEAMER, G. Mouse models of human TB pathology: roles in the analysis of necrosis and the development of host-directed therapies. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 2, p. 221, 1 mar. 2016. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC4779126>. Acesso em: 12 jan. 2024.

KUMAR, M. et al. Potential anti-mycobacterium tuberculosis activity of plant secondary metabolites: Insight with molecular docking interactions. **Antioxidants**, v. 10, n. 12, p. 1990, 1 dez. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/12/1990/htm>. Acesso em: 5 jan. 2024.

KUMAR, N. P. et al. Plasma proinflammatory cytokines are markers of disease severity and bacterial burden in pulmonary tuberculosis. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. 1–8, 2019.

KUMAR, S. N. et al. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 3143–3150, nov. 2012.

LALVANI, A. et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 163, n. 4, p. 824–828, 2001.

LAN, Z.; BASTOS, M.; MENZIES, D. Treatment of human disease due to Mycobacterium bovis: a systematic review. **European Respiratory Journal**, v. 48, n. 5, p. 1500–1503, 1 nov. 2016. Disponível em: <https://erj.ersjournals.com/content/48/5/1500>. Acesso em: 14 jan. 2024.

LAW, G. L. et al. **Drug repurposing: a better approach for infectious disease drug discovery?** *Current Opinion in Immunology* Elsevier Ltd, , 1 out. 2013. .

Disponível em: </pmc/articles/PMC4015799/>. Acesso em: 11 jun. 2021.

LE DANTEC, C. et al. Chlorine Disinfection of Atypical Mycobacteria Isolated from a Water Distribution System. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1025, 2002. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC123737>. Acesso em: 12 jan. 2024.

LEE, A. et al. State of the art review. Current and future treatments for tuberculosis. **BMJ (Clinical Research ed.)**, v. 368, m216, 2020. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.m216>. Acesso em: 12 jan. 2024.

LI, Y. et al. Galleria mellonella-a novel infection model for the mycobacterium tuberculosis complex. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 1126–1137, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1491255>.

LI, Y. et al. Galleria mellonella - a novel infection model for the Mycobacterium tuberculosis complex. 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1491255>. Acesso em: 13 jan. 2024.

LOCKE, M.; NICHOL, H. Iron economy in insects: Transport, metabolism, and storage. **Annual Review of Entomology**, v. 37, n. 1, p. 195–215, 1992.

MACHADO, R. T. A. **Estudo de caracterização do complexo tris-(1,10-fenantrolina)ferro(II) incorporado ao sistema lípidico nanoestruturado e sua atividade antiMycobacterium tuberculosis**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2021.

MARTÍNEZ, J. L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 365–367, 18 jul. 2008. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1159483>. Acesso em: 23 jan. 2024.

MIN, S. et al. Linezolid for treatment of chronic extensively drug-resistant tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 16, 1508-1518, 2013.

MOORE, J. E. et al. Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. **BMC Public Health**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 15 out. 2010. Disponível em:

<https://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2458-10-612>.
Acesso em: 12 jan. 2024.

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

MUNDHE, P. et al. Design, synthesis, characterization, and anti-tubercular activity of novel ethyl-3-benzoyl-6, 8-difluoroindolizine-1-carboxylate analogues: Molecular target identification and molecular docking studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1284, p. 135359, 15 jul. 2023.

MUÑOZ, M.; VILLAR, I.; GARCÍA-ERCE, J. A. An update on iron physiology. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 15, n. 37, p. 4617, 10 out. 2009. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC2754509>. Acesso em: 14 jan. 2024.

NEMETH, J. et al. Contained Mycobacterium tuberculosis infection induces concomitant and heterologous protection. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 7, p. e1008655, 1 jul. 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1008655>. Acesso em: 12 jan. 2024.

O'GARRA, A. et al. **The immune response in tuberculosis. Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 475-527, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>.

ONG, S. T. et al. Iron-withholding strategy in innate immunity. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 295–314, 2 jun. 2006.

ORME, I. M.; COLLINS, F. M. Protection against Mycobacterium tuberculosis infection by adoptive immunotherapy. Requirement for T cell-deficient recipients. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 158, n. 1, p. 74, 7 jul. 1983. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC2187069/?report=abstract>. Acesso em: 12 jan. 2024.

OSBORNE, R. First novel anti-tuberculosis drug in 40 years. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 89–91, fev. 2013.

PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. The Formation and Function of Granulomas. **Annual Review of Immunology**, p. 25, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol>. Acesso em: 13 jan. 2024.

PANDYA, J. H. et al. Synthesis, crystal feature and spectral characterization of paeonol derived Schiff base ligands and their Cu(II) complexes with antimicrobial activity. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 99, n. 4, p. 100403, 1 abr. 2022. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0019452222000656>. Acesso em: 6 fev. 2023.

PARBHOO, T.; SAMPSON, S. L.; MOUTON, J. M. Recent Developments in the Application of Flow Cytometry to Advance our Understanding of Mycobacterium tuberculosis Physiology and Pathogenesis. **Cytometry Part A**, v. 97, n. 7, p. 683-693, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.a.24030>. Acesso em: 6 fev. 2023.

PAVAN, F. R. et al. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 5099–5107, out. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21875763>. Acesso em: 11 jun. 2021.

PEREIRA, T. C. et al. Recent Advances in the Use of Galleria mellonella Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 4, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30486393>. Acesso em: 28 mar. 2022.

PHILIPS, J. A.; ERNST, J. D. Tuberculosis pathogenesis and immunity. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, p. 353–384, 2012.

PRASAD, R.; SRIVASTAVA, D. K. Continuing Education Multi drug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) management: Current issues. **CEGH: Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 1, p. 124–128, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cegh.2013.02.003>. Acesso em: 18 dez. 2019.

PREVOTS, D. R.; MARRAS, T. K. Epidemiology of Human Pulmonary Infection with Nontuberculous Mycobacteria: A Review. **Clinics in Chest Medicine**, v. 36, n. 1, p. 13–34, 1 mar. 2015.

RASTOGI, N.; LEGRAND, E.; SOLA, C. The Mycobacteria: An introduction to nomenclature and pathogenesis. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v. 20, n. 1,

p. 21–54, 2001.

RIBEIRO, C. M. Perfil de resistência a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) Faculdade de ciências Farmacêuticas, Unesp, 2018. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/153486/ribeiro_cm_me_arafcf_ar.pdf?sequence=3&isAllowed=y. Acesso em: 9 abr. 2020.

RULLAS, J. et al. Fast standardized therapeutic-efficacy assay for drug discovery against tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 2262–2264, 2010.

RYAN, N. J.; LO, J. H. Delamanid: first global approval. **Drugs**, v. 74, n. 9, p. 1041–1045, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24923253>. Acesso em: 22 jan. 2024.

SEAWORTH, B. J.; GRIFFITH, D. E. Therapy of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 2, 1 abr. 2017.

SILVA, A. P. B. et al. Activity of Bacteriophage D29 Loaded on Nanoliposomes against Macrophages Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Diseases**, v. 11, n. 4, 150, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/diseases11040150>. Acesso em: 5 jan. 2024.

SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 463, 1 jul. 2003. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC164219>. Acesso em: 14 jan. 2024.

SNEWIN, V. A. et al. Assessment of immunity to mycobacterial infection with luciferase reporter constructs. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4586–4593, 1999. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/iai>. Acesso em: 13 jan. 2024.

SOLCIA, M. C. et al. Growth-inhibitory effects of tris-(1,10-phenanthroline) iron (II) against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and in vivo. **Tuberculosis**, v. 64, n. 5, p. 1–8, 2021.

TATO, M. et al. *In vitro* activity of linezolid against *Mycobacterium tuberculosis* complex, including multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates. **International**

Journal of Antimicrobial Agents, v. 28, n. 1, p. 75–78, 2006.

THOMAS, V.; MCDONNELL, G. Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 349–357, 1 out. 2007. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02206.x>. Acesso em: 12 jan. 2024.

TIBERI, S. et al. New drugs and perspectives for new anti-tuberculosis regimens. **Pulmonology**, v. 24, n. 2, p. 86–98, 1 mar. 2018.

TSAI, C. J. Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2 abr. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26730990/>. Acesso em: 28 mar. 2022.

TWEED, C. D. et al. Toxicity associated with tuberculosis chemotherapy in the REMoxTB study. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

VAEREWIJCK, M. J. M. et al. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 5, p. 911–934, 1 nov. 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1017/S1462399403005908>. Acesso em: 12 jan. 2024.

VAN INGEN, J. et al. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. **Thorax**, v. 64, n. 6, p. 502–506, 1 jun. 2009. Disponível em: <https://thorax.bmj.com/content/64/6/502>. Acesso em: 12 jan. 2024.

Van LEEUWEN, L. M.; VAN DER SAR, A. M.; BITTER, W. Animal Models of Tuberculosis: Zebrafish. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 3, a018580, 2015. Disponível em: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org>. Acesso em: 13 jan. 2024.

VERRALL, A. J. et al. Early clearance of Mycobacterium tuberculosis: a new frontier in prevention. **Immunology**, v. 141, n. 4, p. 506–513, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imm.12223>. Acesso em: 6 fev. 2023.

WAGNER, D.; YOUNG, L. S. Nontuberculous mycobacterial infections: A clinical

review. **Infection**, v. 32, n. 5, p. 257–270, out. 2004. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s15010-004-4001-4>. Acesso em: 12 jan. 2024.

WALLACE, R. J.; BROWN, B. A.; GRIFFITH, D. E. Nosocomial outbreaks/pseudo outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, p. 453–490, 28 nov. 2003. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.52.1.453>. Acesso em: 12 jan. 2024.

WINTHROP, K. L. et al. Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Clinical Features. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 7, p. 977–982, 20 dez. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0503OC>. Acesso em: 12 jan. 2024.

WORLD HEALTH ORGANISATION. **Global Tuberculosis Report 2023**. malaria. Geneva: World Health Organization; 2023. ISBN 978-92-4-008385-1 (electronic version).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). **Burden, Global Treatment, Enrollment O N Mdr-tb Outcomes, Treatment**, 2016. Geneva: World Health Organization, 2016. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549639>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2021**. Geneva: World Health Organization, 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). **WHO consolidated guidelines on tuberculosis**. Geneva: World Health Organization, module 2, 22 March 2021, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240022676>.

YANG, H.-J. et al. One Size Fits All? Not in In Vivo Modeling of Tuberculosis Chemotherapeutics. Tuberculosis Chemotherapeutics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, Article 613149, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.613149>. Acesso em: 12 jan. 2024.

ZHAN, L. et al. Animal models for tuberculosis in translational and precision medicine. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, Article 717, May 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00717>. Acesso em: 15 jan. 2024.

ZINK, A. R. et al. Molecular history of tuberculosis from ancient mummies and skeletons. **International Journal of Osteoarchaeology**, v. 17, n. 4, p. 380–391, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/oa.909>. Acesso em: 07 jul. 2023

ZUBER, B. et al. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 16, p. 5672–5680, ago. 2008. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/jb>. Acesso em: 4 jan. 2024.