

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. Ticiania Sidorenko de Oliveira Capote e Profa. Dra. Raquel Mantuaneli 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 (CIM<sub>90</sub>)  $\leq 5 \mu\text{M}$  e índices de seletividade  $\geq 10$ . 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 (MIC<sub>90</sub>) 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

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Imagem esquemática representando a estrutura da membrana e parede celular micobacteriana.....  | 16 |
| <b>Figura 2.</b> Estrutura química dos ácidos micólicos presentes na parede celular do <i>M. tuberculosis</i> .....   | 16 |
| <b>Figura 3.</b> Representação esquemática da transmissão e patogenia da TB.....  | 19 |
| <b>Figura 4.</b> Composto BZ8.....  | 22 |
| <b>Figura 5.</b> Esquema cronológico do experimento <i>in vivo</i> .....  | 34 |
| <b>Figura 6.</b> Fluxograma das análises realizadas com os compostos benzofuroxanos e o número total de compostos analisados em cada etapa.....   | 38 |
| <b>Figura 7.</b> Estrutura dos novos compostos benzofuroxanos apresentados de acordo com seus valores de concentração inibitória mínima (CIM <sub>90</sub> ).....   | 43 |
| <b>Figura 8.</b> Gráfico de população para apresentação da concentração inibitória mínima (CIM <sub>90</sub> ) 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 |
| <b>Figura 9.</b> Resultado do crescimento das unidades formadoras de colônias (UFC/ml) em log <sub>10</sub> 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 CIM<sub>90</sub>. Barras brancas indicam 1  $\mu\text{m}$ .....66

## Lista de Tabelas

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

## Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introdução.....</b>   | <b>14</b> |
| 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        |
| <br>  |           |
| <b>2. Objetivos .....</b>   | <b>24</b> |
| 2.1. Objetivo geral.....  | 24        |
| 2.2. Objetivos específicos .....  | 24        |
| <br>  |           |
| <b>3. Materiais e Métodos.....</b>  | <b>26</b> |
| 3.1 Síntese dos compostos benzofuroxanos.....   | 26        |
| 3.2 Cultivo das cepas de <i>Mycobacterium spp.</i> .....  | 26        |
| 3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM <sub>90</sub> ) frente <i>M. tuberculosis</i> em estado metabólico ativo - REMA.....    | 27        |
| 3.4 Determinação do índice de citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ) frente células macrófágicas (J774A.1) e fibroblastos pulmonares (MRC-5). ..... | 27        |
| 3.5 Determinação do índice de seletividade (IS) .....   | 28        |
| 3.6 Avaliação frente isolados clínicos resistentes.....   | 28        |
| 3.7 Avaliação do Espectro de Atividade.....   | 29        |
| 3.8 Avaliação da atividade intramacrofágica.....  | 31        |
| 3.9 Avaliação do efeito combinatório entre compostos benzofuroxanos com a RFP.....  | 32        |
| 3.10 Avaliação do potencial inibitório de <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv <i>in vivo</i> .....  | 33        |
| 3.11 Ensaio de acúmulo de brometo de etídio .....   | 35        |
| 3.12 Avaliação de membrana celular por Microscopia Eletrônica de Varredura .....  | 36        |
| 3.13 Seleção de mutante resistente e extração de DNA.....   | 36        |
| <br>  |           |
| <b>4 Resultados e Discussão.....</b>  | <b>38</b> |
| 4.1 Resultados da avaliação do potencial inibitório, citotoxicidade e seleção dos compostos mais ativos e seguros .....                         | 39        |
| 4.2 Resultados da avaliação do espectro de ação, atividade contra isolados clínicos resistentes e inibição do bacilo intramacrofágico .....     | 42        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.3      | Resultados da avaliação da combinação de fármacos com a RFP e atividade inibitória <i>in vivo</i> .....   | 57        |
| 4.4      | Resultados da busca do mecanismo de ação: avaliação de inibição de bombas de efluxo, de alterações em parede e seleção de mutante resistente..... | 64        |
| <b>5</b> | <b>Conclusão .....</b>  | <b>69</b> |
|          | <b>Referências .....</b>  | <b>71</b> |

# **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 ¼ 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  $\beta$ -lactâmicos, por apresentarem enzimas  $\beta$ -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 macrofágico 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

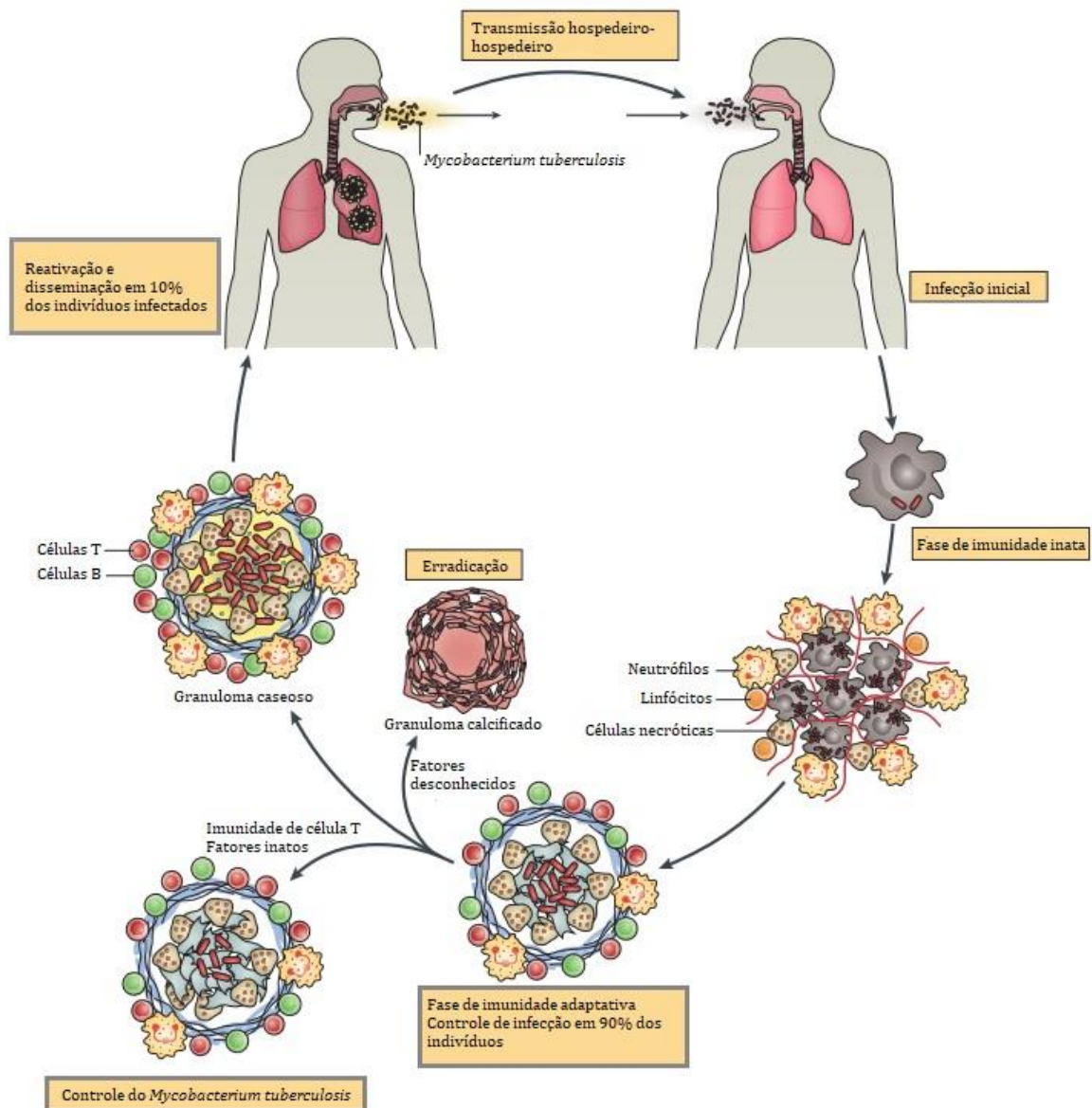
A infecção por *M. tuberculosis* ocorre através das vias aéreas, pela formação de aerossóis que são expelidos pelo doente ao tossir. Num segundo indivíduo, as bactérias presentes nessas gotículas alcançam os alvéolos pulmonares e ali promovem uma infecção primária (PEDDIREDDY; DODDAM; AHMED, 2017; ZUIGA *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 ¼ 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*.

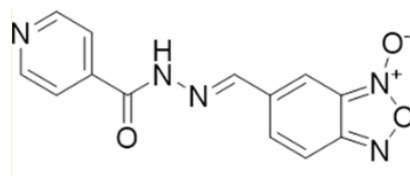
| Classificação da cepa de <i>Mtb</i> | Resistente a RFP | Resistente a INH | Resistente a qualquer FLQ | Resistente aos fármacos do grupo A |
|-------------------------------------|------------------|------------------|---------------------------|------------------------------------|
| <b>RR- TB</b>                       | X                |                  |                           |                                    |
| <b>MDR – TB</b>                     | X                | X                |                           |                                    |
| <b>Pré- XDR -TB</b>                 | X                | X                | X                         |                                    |
| <b>XDR -TB</b>                      | 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 (CIM<sub>90</sub>) 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 CIM<sub>90</sub> frente a cepa padrão de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv em concentração inferior a 25 µg/mL e, por isso, foram escolhidos para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Avaliação da atividade *in vitro* de 18 novos compostos benzofuroxanos frente a *M. tuberculosis*, avaliação *in vivo* dos compostos mais promissores e determinação do mecanismo de ação.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM<sub>90</sub>) dos 18 novos compostos benzofuroxanos pelo método de REMA frente cepa padrão sensível de *M. tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv);
- Determinar o Índice de Citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) dos 18 novos compostos benzofuroxanos frente fibroblastos pulmonares MRC-5 e macrófagos murinos J774A.1;
- Determinar o Índice de Seletividade (IS) destes compostos a fim de estabelecer os mais promissores para testes posteriores, sendo escolhidos aqueles cujo valor de IS  $\geq$  10 (IS=IC<sub>50</sub>/CIM<sub>90</sub>);
- Determinar a CIM<sub>90</sub> frente isolados clínicos de *M. tuberculosis* monorresistentes, multirresistentes (MDR-TB) e extensivamente resistentes (XDR-TB);
- Avaliar a atividade dos compostos frente *M. tuberculosis* em estado intramacrofágico;
- Determinar o espectro de ação dos compostos frente diferentes cepas bacterianas Gram-positivas e negativas, outras micobactérias e frente *Cândida albicans*;
- Avaliar o efeito da combinação dos melhores compostos com a rifampicina;

- Avaliar o potencial inibitório dos compostos mais promissores *in vivo* por meio da infecção e tratamento de camundongos Balb/C;
- Avaliar possível mecanismo de ação por inibição de bombas de efluxo;
- Avaliar possível mecanismo de ação por alterações de parede celular após diferentes tempos de exposição ao composto por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Selecionar mutante resistente do composto líder para posterior sequenciamento genômico.

### **3. Materiais e Métodos**

#### 3.1 Síntese dos compostos benzofuroxanos

Todos os compostos benzofuroxanos foram sintetizados e fornecidos pelo grupo do Prof<sup>o</sup> Dr. Jean Leandro dos Santos, do laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FERNANDES *et al.*, 2021).

#### 3.2 Cultivo das cepas de *Mycobacterium* spp.

A cepa micobacteriana padrão de *M. tuberculosis* utilizada para a grande parte dos experimentos foi a cepa H<sub>37</sub>Rv, ATCC 27294, sensível aos fármacos da terapia padrão de TB.

Para os testes de REMA com isolados clínicos de *M. tuberculosis*, foram utilizadas estirpes oriundas de pacientes tratados no hospital Clemente Ferreira entre os anos de 2007 e 2009. Foram avaliados 10 diferentes isolados clínicos com diferentes perfis de resistência.

Também foram utilizadas cepas de *Mycobacterium bovis* TMC1011 (ATCC 35734) e *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (ATCC 700084).

Todas as cepas foram armazenadas em freezer -80 °C e, para utilização, foram cultivadas em meio Middlebrook 7H9, suplementado a 10% com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) a 37 °C sob agitação por um período de 7 a 20 dias. Para o experimento, o caldo em cultivo encontrava-se numa turbidez mínima de 1 Mc Farland e, para tanto, cada uma das cepas apresentou diferentes tempos para o alcance da concentração necessária.

### 3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM<sub>90</sub>) frente *M. tuberculosis* em estado metabólico ativo - REMA

A atividade anti-*M. tuberculosis* dos compostos foi determinada pelo método REMA (*Resazurin Microtiter Assay*) descrito por Palomino e colaboradores (2002). As soluções estoques dos compostos foram preparadas em DMSO a 10 mg/mL e diluídas em caldo Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado com OADC, para a obtenção de concentrações de 0,09-25µg/mL. RFP, solubilizada em DMSO e INH, solubilizada em água, foram utilizadas como controle do experimento em concentrações de 0,004-1,0 µg/mL por serem fármacos padrão da terapia. Uma suspensão de *M. tuberculosis* H37Rv, cultivada como descrito anteriormente, foi ajustada para 10<sup>5</sup> UFC/mL e foram adicionados 100 µL do inóculo a cada poço de uma microplaca de 96 poços juntamente com 100 µL dos compostos nas concentrações descritas. As placas foram incubadas em estufa durante 7 dias a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. No sétimo dia, foram adicionados 30 µL de resazurina a 0,01%, solubilizada em água. A fluorescência dos poços foi lida após 24 h utilizando-se o leitor de placas Cytation 3 (Biotek®). A Concentração inibitória mínima (CIM<sub>90</sub>) foi definida como a menor concentração na qual houve 90% de inibição do crescimento das bactérias (PALOMINO *et al.*, 2002).

### 3.4 Determinação do índice de citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) frente células macrófágicas (J774A.1) e fibroblastos pulmonares (MRC-5).

Nos ensaios de citotoxicidade foram utilizadas células MRC-5 (ATCC CCL-171) e J774A.1 (ATCC TIB-67), descongeladas e cultivadas em meio DMEM (Vitrocell®) e RPMI

(Vitrocell®), respectivamente, enriquecidos com 10% de soro fetal bovino e acrescidos de sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L).

As células foram cultivadas em garrafas e incubadas à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> até atingir a confluência celular. Um volume de 2,5 x10<sup>5</sup> células/mL de MRC-5 e 1,0 x10<sup>6</sup> células/mL de J774A.1 foram semeados em microplaca de 96 orifícios, com volume final de 100 µL, incubadas por 24 h à 37 °C com 5 % CO<sub>2</sub> para permitir a adesão celular. Após este período, os compostos foram acrescentados às placas num intervalo de diluição de 0,39-100 µg/mL com incubações de 24 h para ambos os tipos celulares e ainda 72 h para os macrófagos à 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, em meios ausentes de antibiótico e antimicótico.

Foram adicionados 50 µL de 0,01 % de resazurina (solubilizada em água destilada e estéril) e, após 3 h, foi realizada a leitura da fluorescência utilizando-se o leitor Synergy H1 (Biotek®). O valor de IC<sub>50</sub> foi definido como a menor concentração dos compostos em que 50 % das células permaneceram viáveis (PAVAN *et al.*, 2010).

### 3.5 Determinação do índice de seletividade (IS)

O IS (índice de seletividade) é calculado por meio da divisão do valor de IC<sub>50</sub> obtido frente a linhagem celular MRC-5 pelo valor de CIM<sub>90</sub> frente a *M. tuberculosis*. Compostos que apresentem valores de IS maiores ou iguais a 10 são considerados promissores pois demonstram que a toxicidade apresentada pelo composto é 10x maior frente à cepa bacteriana em comparação às células eucarióticas (CAMPOS *et al.*, 2020).

### 3.6 Avaliação frente isolados clínicos resistentes

Para a determinação da CIM<sub>90</sub> frente às cepas clínicas resistentes de *M. tuberculosis* foi realizada a metodologia de REMA, conforme método apresentado anteriormente. Como controles foram utilizados RFP, INH, linezolida (LNZ), amicacina (AMK) e gatifloxacina (GAT)/ moxifloxacina (MOX) nas mesmas concentrações dos compostos (0,09 - 25 mg/mL).

Para a classificação das cepas clínicas como mono-resistentes a INH (Mono INH), MDR-TB (cepas multidrogas resistente) ou XDR-TB (cepas extensivamente resistentes) foram utilizados valores de *cutt-off* previamente determinados por Heysell e colaboradores (2015) nos quais, valores de CIM<sub>90</sub> maiores que 2,4 µM, 3,6 µM , 6,8 µM e 4,9 µM para RFP, INH, AMK e GAT/MOX respectivamente, indicam cepas resistentes a estes fármacos (HEYSELL *et al.*, 2015).

Para resistência a linezolida, consideramos valores maiores que 1 µg/mL ( 2,96 µM) de acordo com a OMS (KADURA *et al.*, 2020).

### 3.7 Avaliação do Espectro de Atividade

#### **3.7.1 Avaliação frente bactérias Gram-positivas e negativas**

A análise dos compostos benzofuroxanos frente diversas espécies bacterianas foram realizada em parceria com o laboratório de Pesquisa em Bacteriologia e Genética Bacteriana, sob coordenação do Prof.º Dr. Leonardo Neves de Andrade, da USP (Universidade de São Paulo) de Ribeirão Preto.

A metodologia utilizada baseou-se nas recomendações da EUCAST (2020), utilizando-se caldo Mueller Hinton II para maior parte das bactérias em estudo e, quando frente a bactérias fastidiosas, realizou-se a suplementação do meio com sangue lisado de cavalo e b-NAD (Caldo MH-F) de acordo com as recomendações do BrCAST.

### 3.7.2 Avaliação frente *M. smegmatis* e *M. bovis*

Para a avaliação da CIM dos compostos benzofuroxanos frente outras cepas do gênero *Mycobacterium*, a metodologia do REMA foi realizada com pequenas alterações.

Para a preparação do inóculo em caldo Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado com OADC, as soluções foram incubadas até escala n. 1 de Mac Farland e diluídas em 1:100 para utilização. Os tempos de incubação também foram diferentes entre as cepas devido às diferenças entre os tempos de multiplicação de cada espécie. Para *M. bovis*, o período de incubação e exposição dos compostos foi de 7 dias, seguido de 24h de incubação para reação do revelador e, para *M. smegmatis*, devido ao seu rápido crescimento, o período de incubação e exposição aos compostos foi de apenas 48 horas, com incubação para leitura da resazurina de 12 horas (FORBES *et al.*, 2015).

Os resultados apresentados são a média de três ensaios independentes e representam a menor concentração de composto capaz de inibir 90% do crescimento dessas micobactérias.

### 3.7.3 Avaliação frente *Cândida albicans* (ATCC 90028)

Para avaliação do potencial inibitório dos compostos benzofuroxanos, realizamos um teste de microdiluição em placa frente cepa de *Cândida albicans*, de acordo com a metodologia a seguir.

Inicialmente, um cultivo foi realizado em ágar Sabouraud e, após 48h de incubação, colônias foram coletadas para preparação do inóculo em caldo. Para tal, 20 mL de caldo Sabouraud dextrose foram aliquotados em falcons de 50 mL e raspado de levedura da placa inicial foi adicionado. A solução foi incubada por 48h a 37 °C, sem agitação, até a utilização. Para o experimento, avaliamos a concentração por meio de fluorescência a 530 nm,

adequando para valores de absorvância entre 0,1 e 0,15, correspondente a  $1 \times 10^6$  UFC/mL e o inóculo foi diluído para  $2 \times 10^3$  UFC/mL para utilização (RODRÍGUEZ-TUDELA *et al.*, 2001).

Em uma microplaca de 96 orifícios, caldo Sabouraud foi distribuído com os compostos numa diluição seriada de 0,39 a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Após 48h de incubação nas mesmas condições anteriores, foi realizada a leitura da absorvância a 570 nm e aplicação da resazurina com seguida leitura de fluorescência a 530/590nm.

Os resultados apresentados são a média de dois ensaios independentes e os valores representam a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 90% das células de levedura.

### 3.8 Avaliação da atividade intramacrofágica

A atividade intramacrofágica foi determinada através da infecção *in vitro* de macrófagos por bactérias *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. As células macrofágicas J774A.1 foram cultivadas, semeadas em placa de 24 poços ( $5 \times 10^5$  células/mL) e incubadas por 24h a 37 °C, atmosfera a 5% CO<sub>2</sub> até a obtenção de confluência celular. Após este período foi realizada a fagocitose das bactérias por meio da aplicação de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL de inóculo de *M. tuberculosis*, por um período de 2h. Após a incubação, realizou-se a adição de solução de amicacina a 200  $\mu\text{g/mL}$  para esterilização do meio extracelular. Para a confirmação da infecção, foram lisadas as células de dois poços da placa com Triton 0,1% (Sigma®) e esse volume foi plaqueado em ágar Middlebrook 7H10 para análise da infecção pré-tratamento.

A análise da atividade inibitória dos compostos frente às bactérias intramacrofágicas foi realizada através da adição de 1 mL de solução em valores iguais ou múltiplos (5x e 10x) ao valor da CIM<sub>90</sub> (dependendo do IS apresentado pelo composto). Como controle, foi utilizada RFP nas mesmas condições. A placa de 24 poços, contendo as células e o

tratamento, foi incubada por 72h até a lise dos macrófagos e plaqueamento do volume sobrenadante em meio sólido Middlebook 7H10 suplementado com OADC.

As placas foram incubadas por um período de 20-30 dias, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> para a contagem de UFC/mL. O resultado é apresentado como a média de três ensaios independentes e demonstrará a porcentagem de inibição do crescimento das micobactérias intracelulares após 72h de tratamento (SOLCIA *et al.*, 2021).

### 3.9 Avaliação do efeito combinatório entre compostos benzofuroxanos com a RFP

Com a finalidade de avaliar o potencial sinérgico ou antagônico entre os compostos mais promissores e a RFP realizamos a avaliação dos compostos em combinação por meio da técnica de *checkerboard*.

Inicialmente realizamos a diluição seriada do composto teste em meio líquido Middlebook 7H9 no sentido vertical (linha A até linha H) entre as colunas 1-10, num volume de 50 µL. Essas concentrações foram determinadas tomando como base o valor da CIM<sub>90</sub> previamente determinada para ambos os compostos pelo método de REMA respectivamente.

Aplicamos meio de cultura (100 µL) na coluna 11 (controle de crescimento bacteriano) e (200 µL) na coluna 12 (controle negativo).

Em outra placa realizamos a diluição seriada do fármaco RFP em meio líquido Middlebook 7H9 no sentido horizontal (Colunas 1-10) em todas as linhas, considerando seu valor de CIM<sub>90</sub>.

Realizamos a transferência de 50 µL de solução de RFP da placa de diluição para a placa de experimento contendo o composto teste, respeitando os poços respectivos, de forma a obter um volume final de 100 µL em todos dos poços entre as colunas 1 e 10.

Foram acrescentados 100 µL de solução de *Mycobacterium tuberculosis* ( $5 \times 10^5$  UFC/mL) em todos os poços das colunas 1-11 e a placa foi incubada por 7 dias a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Após incubação, 30 µL de solução de rezasurina (0,01 %) foi acrescentada a todos os poços da placa e foi realizada a leitura da fluorescência após 24h.

Por meio da fluorescência, realizamos a análise do resultado utilizando a fórmula descrita a seguir. Classificamos o efeito da combinação dos compostos em: sinérgico (valores  $\leq 0,5$ ), neutro (de 0,5 a 4,0) ou antagônico ( $\geq 4,0$ ), de acordo com Caleffi-Ferracioli e colaboradores (2013).

$$FICI = \left( \frac{\text{CIM fármaco 1 combinado}}{\text{CIM fármaco 1}} \right) + \left( \frac{\text{CIM fármaco 2 combinado}}{\text{CIM fármaco 2}} \right)$$

Onde FICI= índice de concentração inibitória fracionada e CIM= concentração inibitória mínima para 90% do crescimento bacteriano (CALEFFI-FERRACIOLI *et al.*, 2013).

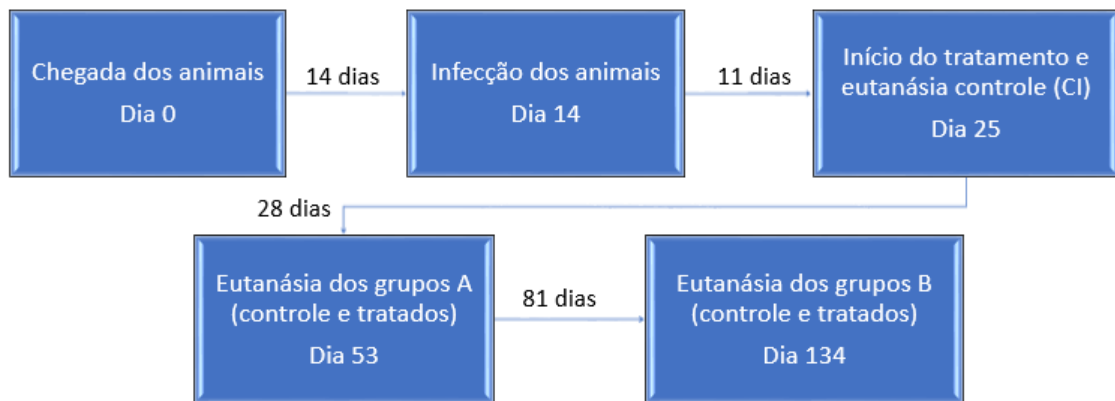
### 3.10 Avaliação do potencial inibitório de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv *in vivo*

Por meio de inoculação intranasal (20 uL) de uma suspensão de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv ( $1,5 \times 10^5$  UFC), camundongos Balb/C fêmeas foram infectados e tratados para a avaliação da atividade inibitória dos compostos líder, utilizando-se como controle do experimento o fármaco da terapia padrão RFP.

Os camundongos infectados foram divididos em 9 grupos, sendo eles repetições de tratamento para uma análise dupla: Grupos RFP A e B; B1 (benzofuroxano 1) A e B; B2 (benzofuroxano 2) A e B e controles de veículo A e B. Além destes, um grupo para controle

da infecção (CI) foi separado. Os grupos Controle continham 4 animais enquanto os grupos tratados, 5 animais.

A figura 5 abaixo apresenta, em ordem cronológica, o desenvolvimento do experimento e o número de dias entre cada etapa executada.



**Figura 5.** Esquema cronológico do experimento *in vivo*

Após 14 dias da infecção dos animais, iniciamos o tratamento. Todos os camundongos receberam um volume de dose de 500uL de suspensão, sendo utilizado como solvente/veículo óleo de girassol, numa concentração de composto a 200mg/kg/animal numa frequência de 5x/semana. Aos animais do grupo controle foi administrado apenas o veículo, no mesmo volume. Para adequação da dose, todos os animais eram pesados semanalmente e a suspensão era preparada de acordo com a média de peso de cada um dos grupos. Neste dia também foram eutanasiados os animais do controle de infecção (CI).

A eutanásia dos animais foi realizada por aprofundamento de anestesia, utilizando-se solução de cetamina e xilazina por injeção intraperitoneal. Os pulmões foram coletados e armazenados em frascos de 2 mL contendo solução de PBS 1x estéril com esferas de cerâmica (*Lysing Matrix D – MP Biomedicals*) e macerados no *FastPrep™* seguindo-se as

recomendações de procedimento de acordo com o fabricante (6,0 m/seg, 40 seg) em duas repetições.

O volume macerado foi então diluído seriadamente e plaqueado (100 uL) em meio sólido Middlebrook 7H11 suplementado com OADC 10%. As placas foram então armazenadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C até contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

Os animais dos grupos A foram eutanasiados após 4 semanas de tratamento, de acordo com a descrição anterior e seus pulmões foram submetidos ao mesmo procedimento de lise e plaqueamento. Os animais dos grupos B foram mantidos em biotério NB3 e eutanasiados ao final dos 81 dias e os pulmões foram coletados e utilizados de acordo com a descrição prévia.

A contagem das UFC/mL após 60 dias foi realizada a fim de determinar o potencial inibitório dos compostos avaliados em comparação com o controle sem tratamento e ainda controle com fármaco da terapia.

Este protocolo experimental foi desenvolvido utilizando-se como base o trabalho de Mourik e colaboradores (MOURIK *et al.*, 2018).

### 3.11 Ensaio de acúmulo de brometo de etídio

Como forma de investigar a capacidade dos compostos benzofuroxanos em inibir a atividade das bombas de efluxo, realizou-se a técnica de acúmulo de brometo de etídio (EtBr).

De acordo com a metodologia descrita por Caleffi-Ferracioli e colaboradores, um inóculo de *M. tuberculosis* foi ajustado para uma concentração em DO<sub>600</sub> de 0,4 e 100 µL dessa solução foi adicionado aos poços de uma microplaca de 96 poços. Foram acrescentados ainda, em concentrações iguais a 1/2 CIM<sub>90</sub>, 50 µL de EtBr e 50 µL do composto a ser testado. Como controles foram utilizados verapamil e RFP (CALEFFI-FERRACIOLI *et al.*, 2016).

A placa foi incubada em leitor de placas, Cytation H1, e a fluorescência foi lida a cada 3 min, pelo período de 1 hora, resultando em 21 pontos de uma curva analítica em gráfico de fluorescência relativa com relação ao tempo e através das curvas obtidas foi possível averiguar a capacidade do composto em inibir a atividade das bombas de efluxo.

### 3.12 Avaliação de membrana celular por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para avaliar possíveis alterações na parede celular micobacteriana após exposição aos compostos benzofuroxanos, realizamos a observação de cultivos expostos a 1x e 2x a CIM por períodos de 24 a 72h em microscópio eletrônico de varredura.

Cultivos de *M. tuberculosis* num volume de 5mL a  $10^5$  UFC/mL foram inoculados com o composto benzofuroxano e controles sem tratamento, INH e ETH nas condições descritas.

Após incubação a 37 °C sob agitação, os cultivos foram centrifugados por 10min a 3000 rpm e lavados com PBS 1x para retirada do meio de cultura. Fixador Karnovisk foi adicionado e as amostras foram armazenadas em geladeira *overnight*. Retirado o fixador, a amostra foi coberta com tampão cacodilato e armazenada até análise (CALEFFI-FERRACIOLI *et al.*, 2016).

As amostras foram enviadas e analisadas sob responsabilidade da Prof Dra Sonia Nair Baó, do Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB).

### 3.13 Seleção de mutante resistente e extração de DNA

A fim de selecionar o mutante resistente ao melhor composto benzofuroxano identificado, foram preparadas placas de ágar Middlebrook 7H11 suplementadas com OADC

contendo concentrações variadas de composto (0,78 a 25 µg/mL) nas quais foram plaqueados 100 µL de um inóculo bacteriano a  $10^5$  UFC/mL. As placas foram incubadas a 37°C e atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> até observação de crescimento bacteriano.

Consideramos um mutante resistente a colônia que pudesse apresentar crescimento em valores maiores que a CIM<sub>90</sub> pré-estabelecida pelo método de REMA.

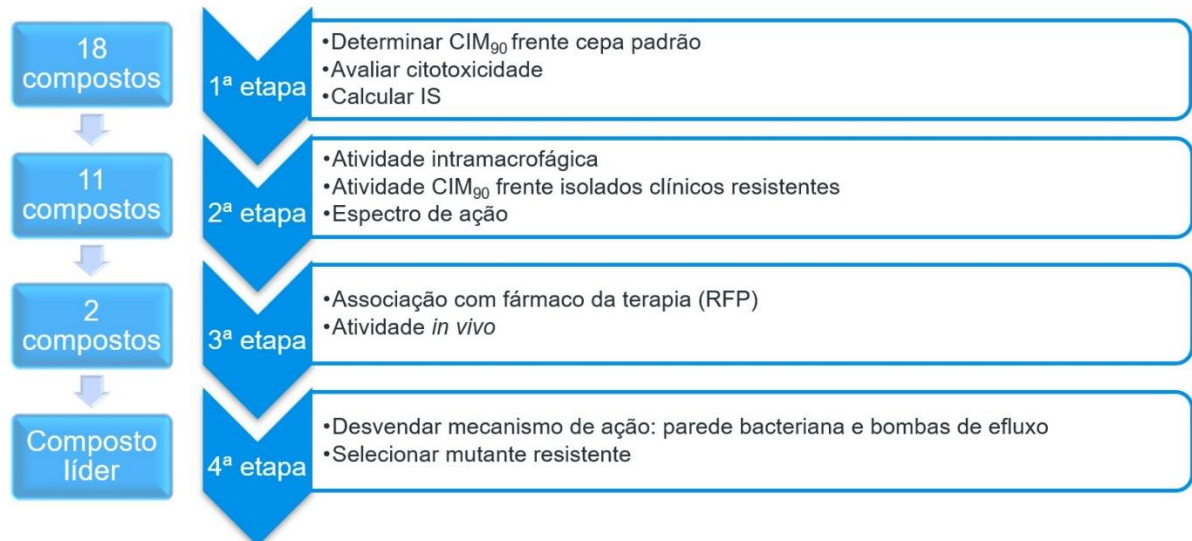
Após o crescimento do mutante, o procedimento de extração de DNA seguiu por meio de coleta da colônia isolada em microtubo contendo 250 µL de tampão TE (10 mM) e *beads* de vidro. A colônia foi desfeita em vórtex por 5 min e o conteúdo líquido foi transferido de frasco. Foram acrescentados 20 µL de acetato de sódio (3 M) e 440 µL de etanol 96%, seguindo para o vórtex por mais 10 segundos e incubação a -20°C por 1 hora.

O conteúdo foi centrifugado a 13000 rpm por 15min e o sobrenadante foi retirado, seguindo-se com adição de etanol 70% (1 mL) por 1 min e remoção total do líquido com secagem. O pellet foi ressuspenso em 50 µL de água milliq e o tubo foi aquecido a 55°C por 10 min com 3 ciclos de vórtex de 10 segundos (ALDOUS *et al.*, 2005).

A concentração e qualidade do material extraído foi analisada utilizando espectrofotômetro Nanodrop (ND 2000 – Thermo Fischer Scientific) e o material foi armazenado a -20°C até sequenciamento genômico.

## 4 Resultados e Discussão

A Figura 6 a seguir apresenta o fluxograma de trabalho realizado e o número de compostos analisados em cada etapa do processo.



**Figura 6.** Fluxograma das análises realizadas com os compostos benzofuroxanos e o número total de compostos analisados em cada etapa.

Os resultados obtidos serão apresentados respeitando-se as etapas apresentadas no fluxograma acima, sendo a primeira etapa composta pelas metodologias de REMA, citotoxicidade e cálculo do IS nas quais 18 compostos benzofuroxanos foram avaliados.

Seguiram para a segunda etapa os 11 compostos benzofuroxanos selecionados de acordo com seus valores de CIM<sub>90</sub> e IS. Esses foram avaliados quanto ao potencial inibitório frente bactérias intramacrofágicas, bactérias resistentes e ainda quanto ao espectro de atividade frente outras espécies bacterianas.

Para a terceira etapa seguiram os 2 compostos que foram mais bem avaliados quanto ao efeito frente isolados clínicos resistentes. Esses foram testados quando em associação com a RFP e ainda seus potenciais inibitórios *in vivo*.

O composto líder foi selecionado e avaliado na quarta e última etapa do trabalho quanto ao seu potencial em inibir bombas de efluxo e promover alterações na parede micobacteriana. Isolamos também uma bactéria resistente ao composto com o intuito de, posteriormente, avaliar seu genoma para investigar o alvo da mutação relacionada à resistência e assim, seu possível mecanismo de ação.

#### 4.1 Resultados da avaliação do potencial inibitório, citotoxicidade e seleção dos compostos mais ativos e seguros

Iniciamos a avaliação dos novos compostos benzofuroxanos pelo método de REMA descrito previamente. Por meio deste experimento foi possível avaliar o potencial dos compostos em inibir 90% do crescimento da cepa sensível de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. Os compostos que apresentaram valores de CIM<sub>90</sub> menores ou iguais a 5 µM foram considerados os mais promissores. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2 abaixo.

Dentre os 18 compostos mais ativos, apresentaram valores de CIM<sub>90</sub> ≤ 5 µM os TBs 04, 05, 10, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20 e 29, um total de 11 compostos ou 61% dos benzofuroxanos.

Considerando a hipótese inicialmente apresentada, com o objetivo de se obter compostos mais ativos do que o BZ8, previamente avaliado por nosso grupo, podemos destacar os compostos TB 10 e TB 13 como os mais potentes, devido aos valores de CIM<sub>90</sub> de 0,09 e 0,70 µM respectivamente.

Relembrando, o composto BZ8 apresentou valor de CIM<sub>90</sub> frente *M. tuberculosis* em estado metabólico ativo de 1,10 µM (DOS SANTOS FERNANDES *et al.*, 2017).

Dessa forma, apenas com nossa primeira análise, pudemos comprovar que a síntese dos novos benzofuroxanos foi assertiva, visto que um primeiro objetivo já foi atingido por meio do aumento da atividade inibitória desses novos compostos.

Após a primeira análise do potencial inibitório, avaliamos a citotoxicidade frente as linhagens celulares de MRC-5 e J774A.1. As células foram expostas aos compostos por 24h e, após este período, avaliamos a concentração necessária para a inibição de 50% das células inoculadas. Os valores obtidos também são apresentados na Tabela 2.

De maneira geral, todos os compostos apresentaram-se bastante seguros, com valores de  $IC_{50} > 40 \mu\text{M}$  frente às células macrofágicas (24 h) e maiores que  $28 \mu\text{M}$  frente aos fibroblastos pulmonares (MRC-5) após 24h. Apesar de parecerem valores baixos de concentração, o fator mais determinante para a análise da citotoxicidade é o cálculo do índice de seletividade, que considera como promissor o composto que apresente valores de  $IS \geq 10$ , indicando um potencial inibitório pelo menos 10x maior para a bactéria do que para as células eucarióticas avaliadas (CAMPOS *et al.*, 2020). O cálculo deste índice foi realizado e os valores para todos os compostos são apresentados na Tabela 2.

De maneira resumida, 16 dos 18 compostos avaliados (~89%) apresentaram valores de IS maiores que 10, sendo que todos os compostos de maior potencial inibitório frente ao *M. tuberculosis* (com valores de  $CIM_{90} \geq 5 \mu\text{M}$ ) se incluem neste grupo. Apenas os compostos TB 09 e TB 15, que previamente já não apresentaram valores de  $CIM_{90}$  muito promissores, não atingiram o valor de IS mínimo e, por isso, não serão avaliados nas próximas análises.

Assim, de acordo com os valores obtidos nos experimentos desta primeira etapa, podemos determinar quais compostos foram escolhidos para a continuação dos estudos de acordo com as determinações previamente apresentadas: valores de  $CIM \leq 5 \mu\text{M}$  e  $IS \geq 10$ .

Para a segunda etapa de testes prosseguiram os TBs: 04, 05, 10, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20 e 29, onze dos 18 compostos inicialmente avaliados. Os TBs: 01, 02, 03, 08, 09, 12 e 15 apresentaram valores de CIM maiores que o pré-determinado e, de acordo com o cálculo do IS, os compostos não selecionados devido à alta citotoxicidade foram os TBs 09 e 15, previamente já descartados devido ao baixo potencial contra o bacilo.

**Tabela 2.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM<sub>90</sub>) frente *Mycobacterium tuberculosis*, concentração inibitória frente células eucarióticas (CI<sub>50</sub>) J774A.1 e MRC-5 e índice de seletividade (IS) dos compostos benzofuroxanos e controles. Os valores são representação da média ± desvio padrão de três ensaios independentes.

| Compostos   | CIM <sub>90</sub> frente a <i>M. tuberculosis</i><br>H <sub>37</sub> Rv (µM) | CI <sub>50</sub> J774A.1<br>24h (µM) | CI <sub>50</sub> J774A.1<br>72h (µM) | CI <sub>50</sub> MRC-5<br>24 h (µM) | IS<br>MRC-5 |
|-------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------|
| TB 01       | 11,75 ± 3,19   | > 230,71                             | 207,62 ± 40,00                       | > 230,71                            | > 19,63     |
| TB 02       | 7,96 ± 4,07  | > 223,48                             | 114,68 ± 37,65                       | > 223,48                            | > 28,07     |
| TB 03       | 6,98 ± 3,81  | > 215,76                             | > 215,76                             | > 215,76                            | > 30,90     |
| TB 04       | 2,69 ± 1,12  | > 213,73                             | 185,93 ± 48,14                       | > 213,73                            | > 79,58     |
| TB 05       | 3,82 ± 1,36  | > 221,52                             | 156,08 ± 72,42                       | > 221,52                            | > 58,06     |
| TB 08       | 10,97 ± 3,60   | > 197,82                             | 178,01 ± 34,31                       | > 197,82                            | > 18,04     |
| TB 09       | 18,19 ± 9,26   | 181,65 ± 22,22                       | 144,35 ± 45,58                       | 127,81 ± 44,53                      | 7,03        |
| TB 10       | 0,09 ± 0,04  | > 230,24                             | 206,48 ± 41,16                       | 180,04 ± 86,94                      | > 2085,24   |
| TB 11       | 2,22 ± 1,20  | > 229,66                             | 184,07 ± 78,97                       | > 229,66                            | > 103,28    |
| TB 12       | 5,22 ± 2,33  | > 279,07                             | 183,82 ± 83,97                       | > 279,07                            | > 53,46,19  |
| TB 13       | 0,70 ± 0,26  | 40,83 ± 10,72                        | 25,77 ± 2,49                         | 57,07 ± 48,15                       | 81,38       |
| TB 14       | 2,53 ± 1,29  | > 195,18                             | 45,51 ± 21,61                        | > 195,18                            | > 77,09     |
| TB 15       | 31,57 ± 9,98   | > 216,68                             | 200,74 ± 27,61                       | > 216,68                            | > 6,86      |
| TB 16       | 2,89 ± 1,55  | 226,42 ± 75,47                       | 182,02 ± 71,46                       | 238,15 ± 55,15                      | 82,40       |
| TB 18       | 1,84 ± 0,94  | > 223,11                             | > 223,11                             | > 223,11                            | > 121,58    |
| TB 19       | 2,45 ± 1,01  | > 216,71                             | 36,92 ± 3,27                         | 28,14 ± 2,71                        | 11,49       |
| TB 20       | 1,56 ± 0,85  | > 210,31                             | > 210,31                             | > 210,31                            | > 134,68    |
| TB 29       | 2,50 ± 1,08  | > 240,16                             | > 240,13                             | > 240,13                            | > 96,15     |
| Rifampicina | 0,05 ± 0,01  | > 121,51                             | *ND                                  | > 121,51                            | > 2430,31   |
| Isoniazida  | 0,95 ± 0,44  | > 729,18                             | ND                                   | > 729,18                            | > 1695,77   |
| BZ8**       | 1,10   | ND                                   | ND                                   | 519,2                               | 472         |

\*ND = não-determinado; \*\*Dados publicados por Dos Santos Fernandes *et. al*, 2017.

Consideramos promissores os compostos com esse valor de CIM<sub>90</sub> pois acreditamos que, quanto maior o potencial inibitório do composto, menor a concentração necessária para atingirmos o efeito desejado. Assim, considerando o esquema de tratamento preconizado para cepas sensíveis, que possui duração mínima de 6 meses, a necessidade de uma menor concentração de composto para obtenção dos resultados pode diminuir os problemas de toxicidade, efeitos adversos e ainda de custos para obtenção do fármaco.

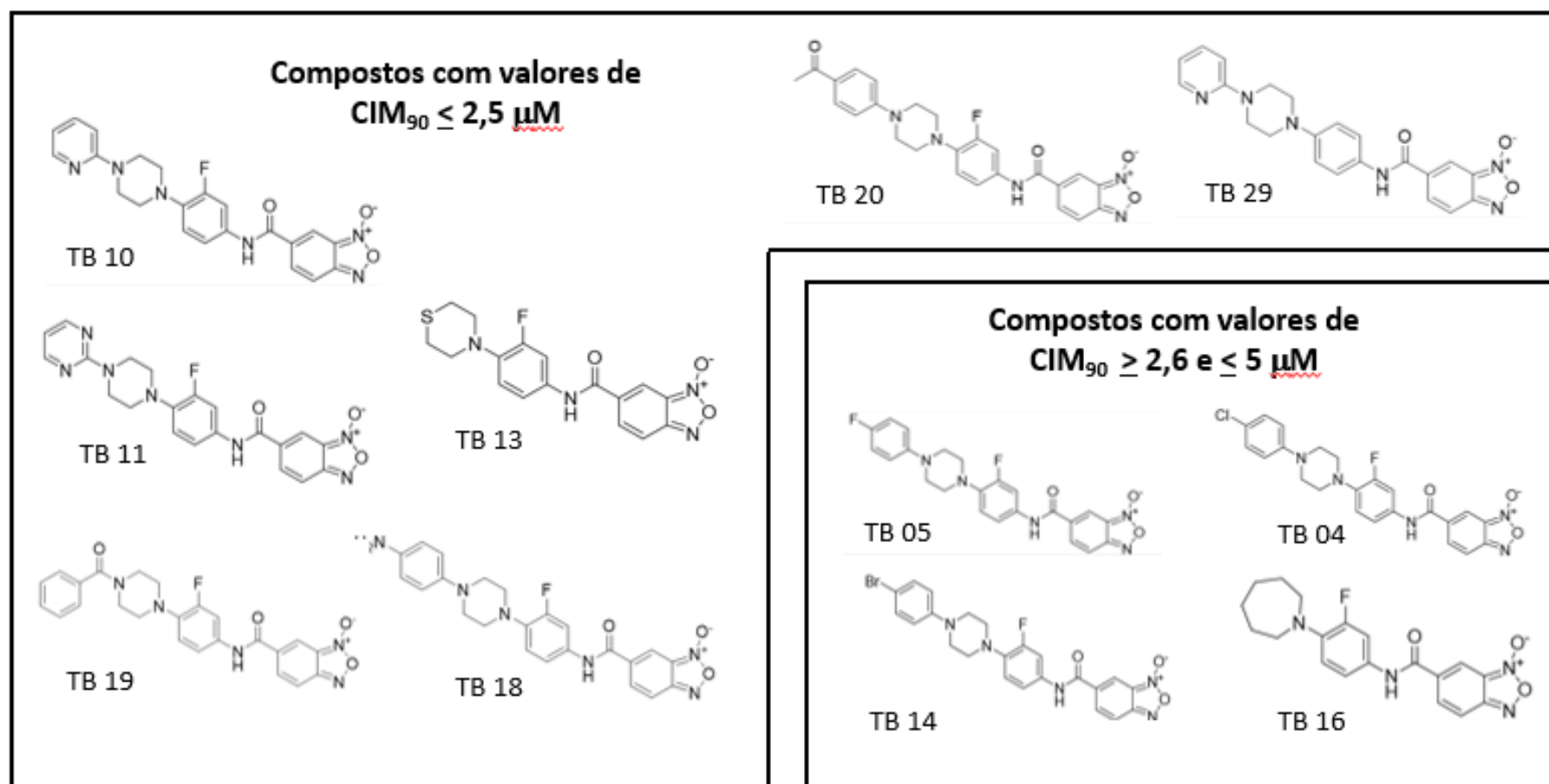
Na figura 7 a seguir são apresentadas as 11 estruturas químicas dos compostos inicialmente mais ativos. Por meio dessas estruturas podemos observar as características dos compostos mais ativos (CIM<sub>90</sub> < 2,5 µM) e menos ativos (2,5 < CIM<sub>90</sub> < 5 µM) até o momento.

#### 4.2 Resultados da avaliação do espectro de ação, atividade contra isolados clínicos resistentes e inibição do bacilo intramacrofágico

Na segunda etapa de avaliação dos compostos, determinamos o espectro de atividade, a ação inibitória intramacrofágica e frente isolados clínicos resistentes dos 11 compostos benzofuroxanos previamente designados.

Iniciamos com a apresentação dos resultados dos benzofuroxanos mais promissores frente diferentes cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas (Tabela 3) além de outras cepas do gênero *Mycobacterium* sp. (Tabela 4) e, por último, frente a levedura *Cândida albicans*.

Quando avaliados frente à espécie fúngica de *Cândida albicans*, nenhum dos compostos foi capaz de inibir o crescimento da levedura em concentrações de até 100 µg/mL, mesmo em duplicata experimental e, por isso, consideramos os compostos inativos frente à cepa leveduriforme de *C. albicans*.



**Figura 7.** Estrutura dos novos compostos benzofuroxanos apresentados de acordo com seus valores de concentração inibitória mínima ( $CIM_{90}$ ).



De acordo com os resultados apresentados frente às diferentes cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, de forma geral, os compostos benzofuroxanos não são ativos frente essas espécies avaliadas. Uma exceção pôde ser observada: o composto TB 11 apresentou potencial inibitório relevante frente 3 das 10 cepas bacterianas testadas, apresentando valores de CIM<sub>90</sub> menores que 6,25 µg/mL (14,35 µM) para as espécies *S. epidermidis*, *E. faecium* e *E. faecalis*.

Apesar da atividade do TB 11, dez dos 11 compostos testados podem ser classificados como compostos de estreito espectro de ação por não apresentarem atividade contra as cepas bacterianas testadas, mas apenas ação inibitória restrita ao gênero *Mycobacterim* sp.

De acordo com a definição de Melander e colaboradores (2018), os compostos antimicrobianos podem ser divididos em dois grandes grupos: antibióticos de amplo espectro de ação (quando são ativos frente múltiplas espécies) e antibióticos de estreito espectro de ação (quando apresentam atividade antibacteriana específica para algum gênero ou espécie) (MELANDER; ZURAWSKI; MELANDER, 2018).

Os antimicrobianos de amplo espectro oferecem algumas desvantagens aos tratamentos por favorecerem a seleção e a disseminação da resistência entre várias espécies além de prejudicarem a microbiota do hospedeiro (MELANDER; ZURAWSKI; MELANDER, 2018).

Para o uso prolongado nos tratamentos frente ao *M. tuberculosis* é preferível que os fármacos tenham um estreito espectro de forma a atenuarem esses efeitos adversos descritos. Porém, fármacos de amplo espectro como a RFP, não serão descartados desde que seu uso represente maiores vantagens ao tratamento.

Ainda sobre os resultados frente às diferentes bactérias, ao avaliarmos o valor de CIM<sub>90</sub> apresentado frente às cepas Gram-positivas o composto TB 11 apresentou valores de CIM<sub>90</sub> bastante importantes frente às cepas de *E. faecium* e *E. faecalis*, de 0,78 e 6,25 µg/mL

respectivamente. São valores consideráveis e importantes devido aos problemas causados por essas bactérias.

Essas espécies bacterianas são conhecidas por serem os agentes de infecções nosocomiais mais comumente isolados no mundo e que apresentam grandes problemas de resistência aos fármacos e diversos fatores de virulência, sendo o *E. faecium* resistente à vancomicina um dos patógenos de alta prioridade na busca de novos tratamentos, de acordo com uma lista publicada em 2017 pela OMS (GAO; HOWDEN; STINEAR, 2018; GORRIE *et al.*, 2019).

Assim, mesmo que frente ao *M. tuberculosis* o composto TB 11 não se destaque como o fármaco mais potente, é válida a projeção do mesmo como um possível composto a ser mais profundamente estudado frente ao gênero *Enterococcus* spp.

Já frente ao *S. epidermidis*, o valor de CIM<sub>90</sub> apresentado pelo composto TB 11 foi de 1,56 µg/mL. Apesar de ser uma espécie bacteriana comum ao tecido epitelial humano, ela pode ser responsável por graves infecções hospitalares, visto que essa espécie oportunista é a mais comumente encontrada em infecções relacionadas à dispositivos médicos de alta permanência como cateteres e, por isso, essa atividade apresentada pode ser bastante interessante se estudos mais aprofundados forem conduzidos (OTTO, 2009).

Para avaliar de maneira ainda mais específica a ação dos compostos benzofuroxanos, analisamos seu potencial frente as bactérias *M. bovis* e *M. smegmatis* e os resultados são apresentados na Tabela 4.

Comparando os valores de CIM<sub>90</sub> apresentados frente essas espécies, podemos identificar que os TBs mais ativos para *M. bovis* foram: TBs 11, 13 e 29 (com valores de CIM<sub>90</sub> < 5 µM) e, frente ao *M. smegmatis*, nenhum dos compostos foi tão ativo e os valores de CIM<sub>90</sub> foram sempre maiores do que 20 µM. Essa diferença entre os valores de CIM pode ser explicada devido às similaridades e diferenças entre as espécies.

**Tabela 4.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM<sub>90</sub>) dos compostos benzofuroxanos frente *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium smegmatis* em µM.

| <b>Compostos</b> | <b><i>M. bovis</i></b> | <b><i>M. smegmatis</i></b> |
|------------------|------------------------|----------------------------|
| <b>TB 04</b>     | 45,35 ± 11,43          | > 53,43                    |
| <b>TB 05</b>     | 7,75 ± 7,62            | > 55,37                    |
| <b>TB 10</b>     | 27,03 ± 14,43          | 41,07 ± 20,05              |
| <b>TB 11</b>     | 1,56 ± 0,29            | 54,40 ± 4,24               |
| <b>TB 13</b>     | 0,85 ± 0,61            | 24,17 ± 13,00              |
| <b>TB 14</b>     | > 48,80                | 34,84 ± 19,75              |
| <b>TB 16</b>     | 23,43 ± 10,12          | > 67,50                    |
| <b>TB 18</b>     | > 55,80                | > 55,80                    |
| <b>TB 19</b>     | 17,98 ± 10,20          | 33,11 ± 28,25              |
| <b>TB 20</b>     | 35,22 ± 24,54          | 31,37 ± 27,00              |
| <b>TB 29</b>     | 2,30 ± 0,81            | > 60,03                    |
| <b>RFP</b>       | 0,10 ± 0,01            | > 1,21                     |

Começaremos pelo *M. bovis*, que apresenta uma similaridade genética de 99,95% em comparação ao *M. tuberculosis*. Essa espécie comumente conhecida por infectar o gado pode sim estar presente nas infecções humanas de TB e, por isso, deve ser avaliada e identificada. Isso se dá devido à promiscuidade para hospedeiros que essa espécie bacteriana apresenta. Sua identificação é importante principalmente devido ao esquema de tratamento a ser implementado, visto que *M. bovis* é universalmente resistente à pirazinamida (PZA) e seu tratamento tem duração mínima de 9 meses – visto que a PZA não é utilizada e, no tratamento frente à *M. tuberculosis* promove efeito sinérgico à RFP, o que ajuda no encurtamento do esquema terapêutico (KANJIPE; PALMER, 2020).

Apesar da baixa estimativa por falta de diagnóstico adequado, em 2017 foram notificados 142 mil novos casos e 12,5 mil mortes provocadas por *M. bovis* ao redor do mundo. Alguns pontos sobre as diferenças genéticas entre as cepas merecem destaque: (1) *M. bovis* não apresenta genes diferentes do *M. tuberculosis*, mas um genoma menor e (2) a diferença entre hospedeiros “preferidos” se dá por diferenças na expressão gênica (KANJIPE; PALMER, 2020).

Já a *M. smegmatis* - que apresenta uma similaridade aproximada de 70% – têm sido comumente utilizada em laboratórios em substituição à *M. tuberculosis* por sua característica de rápido crescimento e não virulência (ALTAF *et al.*, 2010; T *et al.*, 2020).

Apesar dessas características, é uma cepa que tem sido avaliada quanto sua real atuação na busca por novos compostos ativos para o tratamento de TB, visto que apresenta uma sensibilidade de apenas 50% com relação a compostos inibidores de *M. tuberculosis* (ALTAF *et al.*, 2010).

Assim, considerando as características genéticas das cepas avaliadas, podemos justificar o melhor potencial dos compostos benzofuroxanos frente à *M. bovis* devido à alta similaridade genética e, ainda assim, compreender que os compostos não demonstraram os mesmos valores de CIM por diferenças na expressão gênica entre as cepas.

Já para *M. smegmatis*, o resultado está em concordância com os dados publicados anteriormente por Altaf e colaboradores (2010) que demonstraram que a cepa apresenta menor sensibilidade aos fármacos inibidores de *M. tuberculosis*.

Os compostos benzofuroxanos também foram avaliados frente 10 diferentes isolados clínicos que apresentaram diversos perfis de resistência. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5 a seguir.

Foram utilizados diversos fármacos controle neste experimento a fim de avaliar o potencial de resistência de cada uma das cepas testadas e, assim, classificá-las de acordo com a nova nomenclatura para cepas resistentes de *M. tuberculosis*.

A classificação de cada cepa se deu da seguinte forma: cepas mono-resistentes a INH: CFs 44 e 184; cepas MDR-TB: CFs 48, 61, 105, 162, 165 e 171 e cepas Pré-XDR-TB: CFs 81 e 169.

**Tabela 5.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM<sub>90</sub>) dos compostos benzofuroxanos frente isolados clínicos de *M. tuberculosis* em µM.

| Classif. | Mono INH      | Mono INH      | MDR           | MDR           | MDR         | MDR           | MDR           | MDR          | Pré-XDR       | Pré-XDR       |
|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| Comp.    | CF 44         | CF 184        | CF 61         | CF 48         | CF 165      | CF 171        | CF 162        | CF 105       | CF 169        | CF 81         |
| TB 04    | 13,04 ± 14,81 | 1,52 ± 1,08   | 0,75 ± 0,33   | 40,07 ± 18,89 | 2,47 ± 2,31 | 52,96 ± 0,80  | > 53,43       | > 53,43      | > 53,43       | 33,39 ± 24,64 |
| TB 05    | 8,93 ± 2,91   | 10,82 ± 12,07 | 4,65 ± 4,23   | 37,61 ± 14,56 | 0,20 ± 0,00 | 13,88 ± 8,70  | 16,53 ± 11,63 | > 55,38      | 3,66 ± 1,15   | 6,26 ± 6,16   |
| TB 10    | 4,71 ± 3,11   | 0,96 ± 1,04   | 0,56 ± 0,47   | 22,38 ± 9,37  | 1,84 ± 1,73 | 0,26 ± 0,05   | 2,24 ± 1,47   | > 57,26      | 0,28 ± 0,10   | 1,68 ± 1,32   |
| TB 11    | 1,09 ± 0,34   | 0,93 ± 0,73   | 9,40 ± 9,09   | 22,94 ± 9,45  | 0,21 ± 0,00 | 0,93 ± 0,62   | 1,21 ± 0,61   | > 57,42      | 49,84 ± 10,73 | 1,92 ± 1,55   |
| TB 13    | 0,52 ± 0,09   | 0,37 ± 0,15   | 0,28 ± 0,02   | 22,76 ± 13,20 | 0,24 ± 0,00 | 0,25 ± 0,01   | 0,26 ± 0,00   | > 66,78      | 0,40 ± 0,03   | 0,27 ± 0,00   |
| TB 14    | 1,28 ± 0,81   | 1,17 ± 0,03   | 10,98 ± 10,09 | 29,55 ± 8,65  | 2,35 ± 2,25 | 36,22 ± 21,78 | 48,80 ± 0,00  | > 48,80      | > 48,80       | 3,55 ± 3,32   |
| TB 16    | 2,01 ± 0,10   | 1,30 ± 1,11   | 4,98 ± 4,56   | 36,53 ± 7,15  | 1,38 ± 0,84 | 1,95 ± 1,22   | 2,20 ± 0,67   | > 67,50      | 1,03 ± 0,001  | 0,92 ± 0,47   |
| TB 18    | 0,80 ± 0,00   | 0,59 ± 0,27   | 4,84 ± 4,28   | 26,48 ± 4,09  | 1,45 ± 0,03 | 4,55 ± 2,57   | 13,33 ± 0,05  | > 55,78      | 52,97 ± 1,60  | 3,88 ± 2,78   |
| TB 19    | 5,33 ± 2,94   | 1,24 ± 0,06   | 6,90 ± 6,01   | 22,02 ± 7,87  | 1,47 ± 0,06 | 0,90 ± 0,30   | 1,06 ± 0,40   | > 54,18      | 1,39 ± 0,13   | 0,41 ± 0,01   |
| TB 20    | 23,47 ± 20,73 | 1,15 ± 0,58   | 16,80 ± 6,48  | 39,37 ± 13,34 | 6,77 ± 5,43 | 18,23 ± 8,56  | 48,69 ± 5,51  | > 52,58      | > 52,58       | 2,18 ± 2,15   |
| TB 29    | 3,60 ± 0,68   | 1,84 ± 0,32   | 1,68 ± 0,78   | 22,86 ± 11,35 | 1,43 ± 0,22 | 0,44 ± 0,31   | 0,61 ± 0,17   | > 60,03      | 3,22 ± 0,27   | 8,67 ± 7,84   |
| LNZ      | ND            | ND            | ND            | 33,88 ± 1,27  | 0,95 ± 0,01 | 0,58 ± 0,02   | 0,41 ± 0,03   | 4,15 ± 0,52  | 0,95 ± 0,59   | 0,47 ± 0,32   |
| RFP      | < 0,12        | < 0,12        | > 30,38       | > 30,38       | > 30,38     | > 30,38       | > 30,38       | > 30,38      | 6,95 ± 0,19   | > 30,38       |
| INH      | > 182,30      | > 182,30      | > 182,30      | > 182,30      | > 182,30    | 71,56 ± 24,71 | > 182,30      | > 182,30     | > 182,30      | > 182,30      |
| MO/GA    | 0,24 ± 0,00   | 0,61 ± 0,07   | 3,37 ± 0,69   | 3,11 ± 0,36   | 0,40 ± 0,04 | 2,48 ± 1,12   | 4,69 ± 4,17   | 0,25 ± 0,01  | 10,64 ± 4,96  | 41,60 ± 35,81 |
| AMK      | 1,48 ± 1,12   | 0,24 ± 0,00   | > 42,69       | 12,27 ± 6,77  | 5,33 ± 0,95 | 0,24 ± 0,10   | > 42,69       | 7,54 ± 11,48 | 0,36 ± 0,11   | 19,52 ± 12,55 |

\*ND: não determinado; LNZ: linezolida; RFP: rifampicina; INH: isoniazida; MO: moxifloxacina; GA: gatifloxacina; AMK: amicacina. Mono INH: cepas classificadas como mono resistentes à isoniazida; MDR: cepas multidrogas resistente; XDR: cepas extensivamente resistentes.

De acordo com o mecanismo de ação da INH que age inibindo a síntese dos ácidos micólicos presentes na parede celular das micobactérias através da inibição da enzima InhA, podemos dizer que os isolados 44 e 184 possuem alterações genotípicas ou até mecanismos de tolerância que impedem a ação deste medicamento (ALLIANCE *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*, 2014).

Avaliando os resultados apresentados pelos compostos benzofuroxanos frente aos isolados 44 e 184, podemos dizer que apresentaram excelente atividade pois, considerando um *cut-off* de 10  $\mu\text{M}$  (por serem cepas resistentes), 8 dos 11 compostos inibiram ambos os isolados.

Os TBs mais potentes frente esses isolados foram: 10, 11, 13, 14, 16, 18 e 29, com valores de CIM < 5  $\mu\text{M}$ . Podemos ainda supor, que o mecanismo de ação desses compostos com ação inibitória frente a esses isolados, é diferente da INH por não apresentarem resistência cruzada.

Sendo as MDRs-TB cepas resistentes à INH e à RFP (que atua inibindo a síntese de proteínas através da inibição da atividade da enzima RNA-polimerase, impedindo a transcrição do RNA mensageiro), podemos acreditar que são cepas genotipicamente mais resistentes por conseguirem escapar de 2 mecanismos de ação completamente distintos (ALLIANCE *et al.*, 2008).

As cepas MDR podem ainda ser subdivididas em 3 grupos: cepas MDR-TB+0 pois apresentam resistência apenas à INH e RFP (165 e 171); cepas MDR-TB+1 pois também são resistentes à amicacina (61 e 162) e cepas MDR-TB+2 por serem resistentes à amicacina e linezolida (48 e 105).

A amicacina é um fármaco injetável pertencente a classe dos aminoglicosídeos. Sua atividade ocorre pela inibição da síntese correta de proteínas ao ligar-se ao ribossomo bacteriano, modificando a estrutura 16S do RNA ribossomal (rRNA), promovendo erros na

tradução do RNA mensageiro (mRNA) (DOOKIE *et al.*, 2018; RAMIREZ; TOLMASKY, 2017).

Também atuando na inibição de síntese de proteínas temos a linezolida, que age por meio da ligação à subunidade 23S do rRNA inibindo a criação do complexo de iniciação e reduzindo o comprimento e a taxa de alongamento das cadeias peptídicas durante a tradução do mRNA (HASHEMIAN; FARHADI; GANJPARVAR, 2018; PELOQUIN; DAVIES, 2021).

Para as cepas MDR-TB+0 os compostos benzofuroxanos foram bastante ativos, sendo que 7 dos 11 compostos apresentaram CIM < 10 µM em ambas as cepas. Para MDR-TB+1, foram 6 dos 11 compostos ativos frente ambas as cepas no valor de CIM mencionado e para MDR-TB+2, nenhum composto benzofuroxano foi ativo.

Esse é o resultado que mais surpreende quando avaliamos as cepas resistentes. Há uma similaridade entre a resistência à linezolida e à amicacina com a não-inibição das cepas pelos compostos benzofuroxanos tornando um ponto de análise bastante importante quanto ao mecanismo de ação dos compostos benzofuroxanos pois pode estar relacionado com vias metabólicas também relacionadas com os mecanismos da linezolida e da amicacina.

Podemos sugerir, a partir dessa análise, que os compostos benzofuroxanos tenham efeito inibitório por meio da inibição da síntese de proteínas visto que ambos os fármacos, aos quais os isolados clínicos também foram resistentes, apresentam esse mecanismo de ação.

Maiores informações serão obtidas por meio das próximas análises, principalmente com os dados da análise do sequenciamento genômico do mutante.

Voltando a classificação dos isolados clínicos, devemos destacar que a classificação das cepas MDR-TB+2 pode ser errônea ao considerarmos que cepas XDR-TB apresentam resistência a um dos fármacos do Grupo A, ao qual a linezolida se inclui. Porém, neste

trabalho, as classificamos como MDR-TB por não apresentarem resistência à nenhuma das fluoroquinolonas testadas.

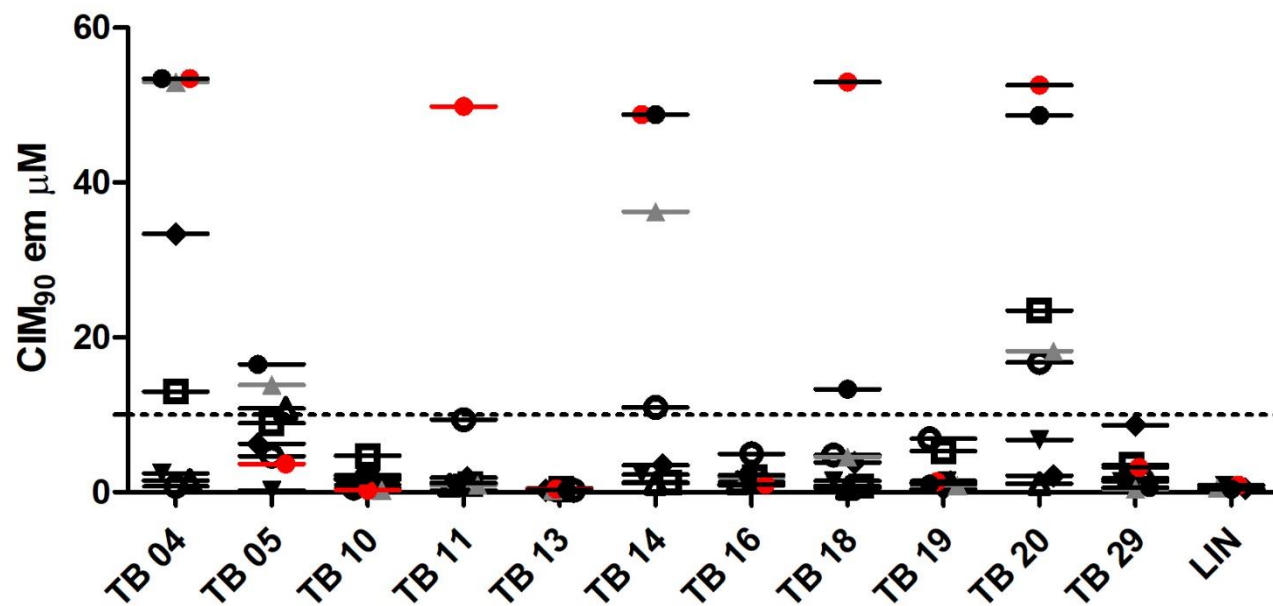
Não podemos esquecer da análise dos benzofuroxanos frente às cepas Pré-XDR-TB (81 e 169). São cepas resistentes à RFP, INH e algum fármaco do grupo das fluoroquinolonas, neste caso moxifloxacino e gatifloxacino. Os compostos benzofuroxanos foram bastante ativos frente essas cepas e 6 dos 11 compostos inibiram ambas as cepas com valores de CIM < 10  $\mu$ M.

Por fim, para demonstrar o potencial dos benzofuroxanos frente às cepas resistentes, apresentamos um gráfico de população (Figura 8) no qual, considerando um *cut-off* de 10  $\mu$ M e excluindo as cepas nas quais nenhum composto foi ativo (CFs 48 e 105), podemos observar os compostos mais potentes.

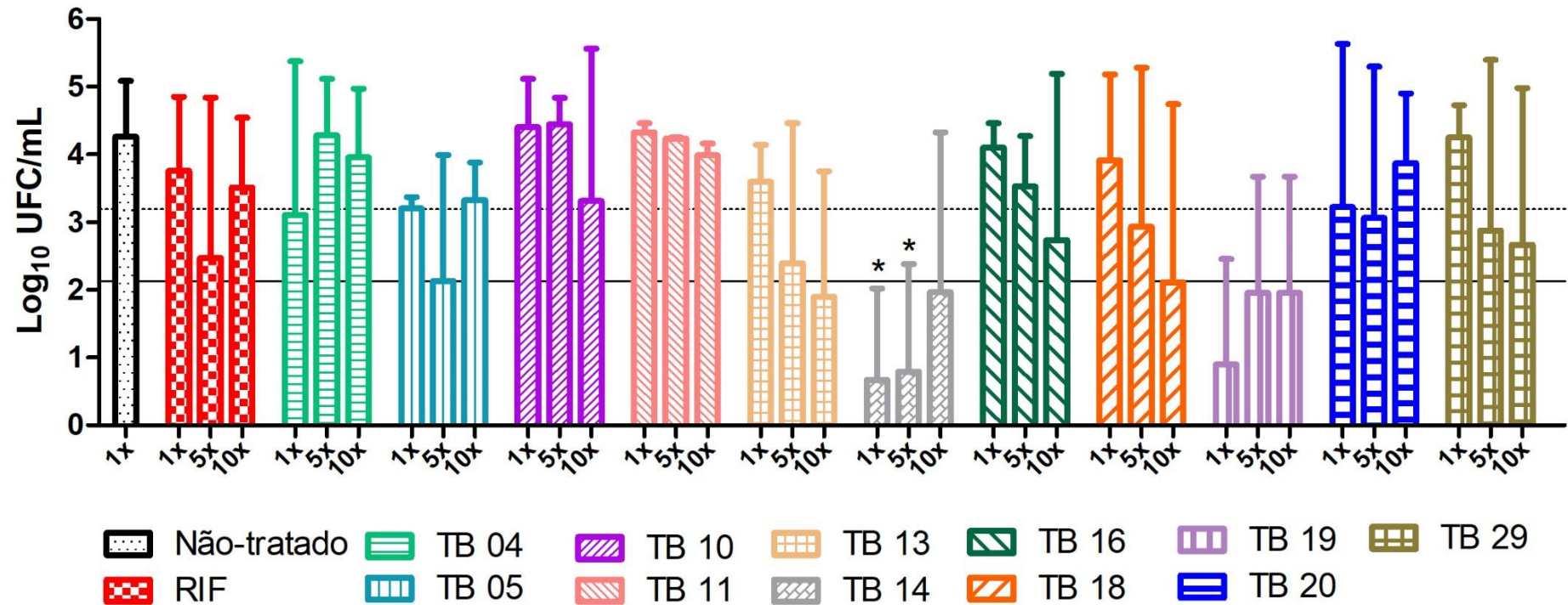
Os benzofuroxanos TBs 10, 13, 16, 19 e 29 foram muito potentes frente 6 das 8 cepas resistentes analisadas neste gráfico, apresentando valores de CIM < 10  $\mu$ M para todas as cepas. Ainda devemos valorizar os compostos TB 10, TB 13 e TB 16 que apresentaram valores de CIM < 5  $\mu$ M nessas condições, demonstrando que são os compostos de maior potencial inibitório de todo o grupo.

Dessa forma, mais um objetivo foi alcançado com os novos compostos: conseguimos desenvolver novas moléculas capazes de inibir não somente cepas mono-resistentes (como o BZ8) mas cepas multi-resistentes aos fármacos padrão da terapia de TB.

A seguir, apresentamos os resultados da avaliação do potencial dos benzofuroxanos frente às bactérias intramacrofágicas. Os dados da inibição do crescimento obtidos após 40 dias do plaqueamento em meio sólido são apresentados no gráfico da Figura 9. Foram avaliados os 11 compostos benzofuroxanos e, como controles, observamos o crescimento de bactérias intramacrofágicas sem tratamento (controle não-tratado) e ainda com a RFP. Os compostos e a RFP foram avaliados em seus valores de 1x, 5x e 10x o valor da CIM<sub>90</sub>.



**Figura 8.** Gráfico de população para apresentação da concentração inibitória mínima (CIM<sub>90</sub>) em  $\mu\text{M}$  dos compostos benzofuroxanos frente 8 cepas clínicas com diferentes perfis de resistência. O ponto de corte no gráfico indica um *cut-off* de  $10\mu\text{M}$ .



**Figura 9.** Resultado do crescimento das unidades formadoras de colônias (UFC/ml) em log<sub>10</sub> 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. Análise estatística: *One-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, \* = p < 0,05 e indica diferença estatística significativa com relação ao grupo não-tratado.

Avaliar a atividade intramacrofágica dos compostos é um fator bastante importante na busca de um novo medicamento para o tratamento da TB visto que o macrófago é a primeira célula imunológica que encontra e fagocita o bacilo *in vivo* e é dentro dele que os principais mecanismos de virulência e replicação inicialmente acontecem (CHANWONG *et al.*, 2007; FERLUGA *et al.*, 2020; KORNFELD; MANCINO; COLIZZI, 1999).

Considerando assim *M. tuberculosis* como um “parasita intramacrofágico” é bastante válida a busca por um novo composto que apresente a capacidade de permear a membrana eucariótica do macrófago e atingir o bacilo ou ainda que promova a ativação do macrófago pois, dessa forma, uma maior efetividade contra a infecção seria alcançada (KORNFELD; MANCINO; COLIZZI, 1999).

Assim, os benzofuroxanos mais potentes entre os 11 avaliados foram os TBs 14 e 19 que inibiram, em todas as concentrações, mais de 50% do crescimento dos bacilos intramacrofágicos, indicando uma redução do crescimento bacteriano intracelular de mais de  $2 \log_{10}$  UFC/mL após 72h de exposição.

Os TBs 13, 16, 18 e 29 apresentaram um efeito inibitório dose-dependente, aumentando o potencial inibitório conforme houve aumento de dose. Em suas concentrações de 10x CIM os TBs 13 e 18 inibiram 50% do crescimento bacteriano ( $2 \log_{10}$  UFC/mL) enquanto os TBs 16 e 29 inibiram, pelo menos, 25% da concentração bacteriana intracelular, uma diminuição média de  $1,05 \log_{10}$  UFC/mL.

Os TBs 04, 05 e 20 apresentaram inibição de  $1,05 \log_{10}$  em seus valores de CIM enquanto o TB 10 apresentou este valor de inibição do crescimento intracelular apenas em 10x CIM<sub>90</sub>. Vale salientar que a CIM para o TB 10 é de  $0,04 \mu\text{g/mL}$  e que 10x a CIM ainda equivale a uma baixíssima concentração de  $0,4 \mu\text{g/mL}$ .

A RFP apresentou uma menor inibição da atividade intramacrofágica, diminuindo o crescimento bacteriano em até  $0,7 \log_{10}$  UFC/mL em 10x CIM<sub>90</sub>. Esse resultado, em

comparação com os benzofuroxanos, já indica o forte potencial dos novos compostos visto que, o fármaco padrão da terapia foi o menos eficaz na inibição de bactérias intracelulares nas mesmas condições avaliadas.

Esse resultado obtido para a RFP já era esperado visto que, de acordo com outros autores que apresentam seus dados em porcentagem de inibição e considerando que 90% de inibição do crescimento corresponde a diminuição de  $1 \log_{10}$  UFC/mL, a RFP apresentou uma atividade similar àquela apresentada por Solcia *et al.* (2021) e Dos Santos Fernandes *et al.* (2017) (FERNANDES *et al.*, 2021).

Esse perfil de diminuição da atividade inibitória da RFP frente bactérias intramacrofágicas já foi descrito anteriormente frente macrófagos humanos e se justifica pelo desenvolvimento de tolerância obtido por ativação de bombas de efluxo logo após a infecção dos macrófagos (ADAMS *et al.*, 2019).

Os valores de inibição intramacrofágica para RFP frente a *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv intracelulares às células THP-1 também foi bastante similar numa concentração de 3 µg/mL, inibindo aproximadamente 0,45  $\log_{10}$  UFC após 4h de exposição (MATSUMOTO *et al.*, 2006).

É importante, neste momento, comparar os valores de inibição da atividade intramacrofágica *in vitro* dos nossos compostos benzofuroxanos com outros fármacos já utilizados e, mais recentemente, aprovados para o tratamento da TB: a delamanida (OPC-67683) e a pretomanida (PA-824) (MOTAMEN; QUINN, 2020).

De acordo com Matsumoto e colaboradores, a atividade intramacrofágica da delamanida frente bactérias H<sub>37</sub>Rv intracelulares em células THP-1 diferenciadas foi bastante relevante e dose-dependente após 4h de exposição (MATSUMOTO *et al.*, 2006). Porém, essa inibição mencionada pelo autor diz respeito a uma diminuição de menos de 0,7  $\log_{10}$  UFC/mL

para delamanida numa concentração de 1,0 µg/mL, uma diminuição do crescimento intracelular inferior ao potencial apresentado pelos compostos benzofuroxanos.

Neste trabalho ainda é apresentada a avaliação da atividade intramacrofágica do PA-824 (pretomanida) que, nas mesmas condições e concentração de 1,0 µg/mL, inibiu apenas 0,2 log<sub>10</sub> UFC (MATSUMOTO *et al.*, 2006).

Assim, ao observar os dados obtidos para os benzofuroxanos podemos destacar que mesmo os compostos com menor inibição, dentre os 11 avaliados, foram mais ativos do que os fármacos recentemente aprovados para o tratamento da TB.

Esse resultado nos incentiva a pesquisar ainda mais profundamente o potencial e mecanismo de ação dessas novas moléculas visto que compostos que apresentem a capacidade de inibir a proliferação bacteriana dentro dos macrófagos devem ser valorizados já que essa é a principal célula imunológica a funcionar como um “reservatório” ideal para a multiplicação micobacteriana, desde o primeiro contato, dentro dos alvéolos pulmonares (SIA; GEORGIEVA; RENGARAJAN, 2015).

Ao final da segunda etapa de avaliação dos compostos, ponderamos a escolha dos mais promissores considerando a maior problemática relacionada com o tratamento da TB que são as infecções provocadas por bactérias resistentes ao tratamento, selecionando para a próxima etapa os compostos com o maior potencial frente aos isolados clínicos.

Somado a isso, consideramos também os baixos valores de CIM<sub>90</sub> apresentados frente à cepa padrão e os compostos escolhidos foram os TBs 10 e 13.

#### 4.3 Resultados da avaliação da combinação de fármacos com a RFP e atividade inibitória *in vivo*.

Na tabela 6 a seguir são apresentados os resultados da combinação da ação inibitória dos compostos TB 10 e TB 13 em associação com a RFP, numa exposição frente ao *M. tuberculosis* por 7 dias.

**Tabela 6.** Resultado do efeito da combinação dos compostos TB 10 e TB 13 com rifampicina frente *M. tuberculosis*.

| Compostos | CIM <sub>90</sub> isolado (µg/mL) | CIM <sub>90</sub> combinado com RFP (µg/mL) | FICI | Classificação do efeito |
|-----------|-----------------------------------|---|------|-------------------------|
| TB 10     | 0,04                              | 0,00578/0,00098                             | 0,16 | Sinérgico               |
| TB 13     | 0,26                              | 0,0625/0,00098                              | 0,26 | Sinérgico               |
| RFP       | 0,04                              |   |      |                         |

CIM<sub>90</sub>= concentração inibitória mínima para 90% do inóculo bacteriano. FICI = índice de concentração inibitória fracionada. RFP = rifampicina.

Avaliamos a combinação dos compostos com a intenção de promover um entendimento de qual seria o possível efeito desses fármacos *in vivo*.

O resultado obtido demonstra que ambos benzofuroxanos apresentam efeito sinérgico quando em associação com a RFP, diminuindo fortemente o valor da CIM de ambos os fármacos para a inibição de 90% do inóculo bacteriano *in vitro*.

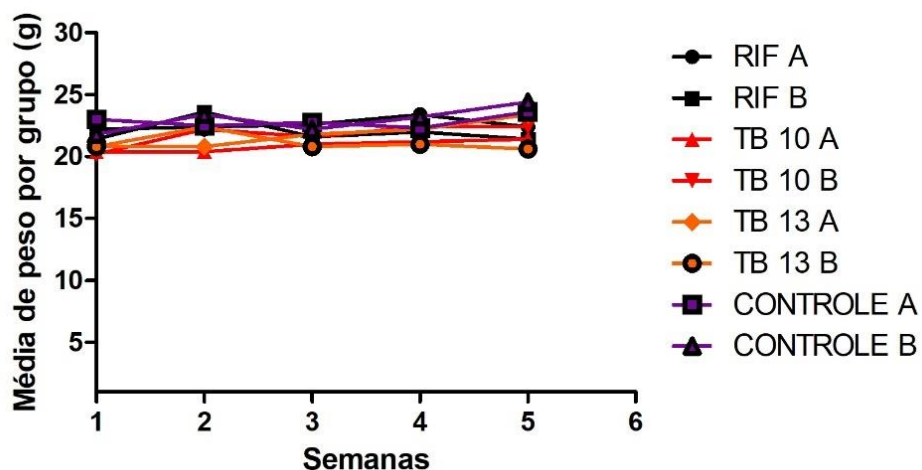
Esse resultado é bastante importante considerando que o tratamento preconizado para a TB é composto de uma combinação de fármacos com diferentes mecanismos de ação que promovem uma melhor atividade contra o bacilo no menor intervalo de tempo possível e, por isso, os novos compostos benzofuroxanos podem ser considerados ainda mais promissores por seu efeito sinérgico em associação com um dos principais fármacos utilizados no tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Além disso, uma futura avaliação desse efeito sinérgico frente a isolados clínicos resistentes pode levar à uma diminuição do perfil de resistência dos mesmos como apresentado por Maltempe e colaboradores quando avaliaram a associação de linezolida e RFP frente isolados clínicos resistentes (MALTEMPE *et al.*, 2017).

Seguimos com a análise dos TBs 10 e 13 *in vivo*. Para tal, promovemos a infecção de camundongos Balb/C e o tratamento, seguido de eutanásia dos animais de acordo com a descrição apresentada na metodologia.

Avaliamos ainda como os animais reagiram após o término do tratamento, mantendo-os por 3 meses para observar um possível e real efeito de esterilização dos pulmões.

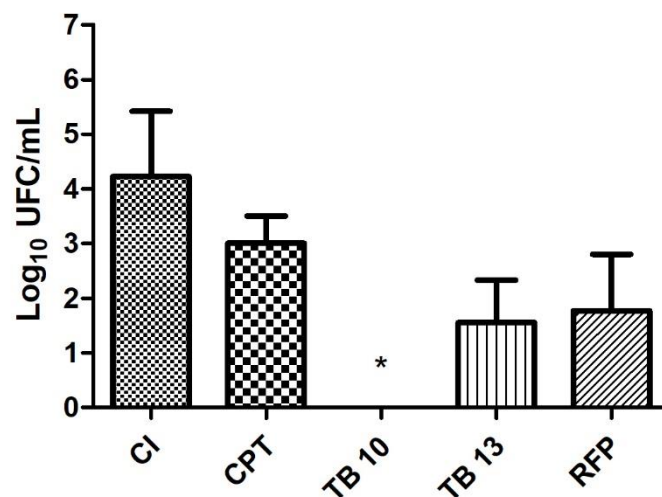
Durante as 4 semanas de tratamento os animais foram observados quanto aos parâmetros comportamentais e, mesmo recebendo doses diárias de compostos e veículo, nenhum grupo apresentou variações de comportamento durante todo o período além de não haver perdas animais. O acompanhamento do peso dos animais (Figura 10) foi realizado semanalmente para ajuste de dose e o gráfico a seguir apresenta o ganho de peso semanal por grupo ao longo do tratamento.



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

No gráfico da Figura 11 podemos observar as respostas iniciais obtidas logo após o término do tratamento com os compostos TB 10 e TB 13, comparados ao controle experimental e à RFP.

Inicialmente, foram inoculadas  $1,5 \times 10^5$  UFC por animal no dia da infecção. Após 14 dias, o grupo controle da infecção (CI) foi eutanasiado e pudemos observar que a quantidade de bactérias presentes nos pulmões no início do tratamento era de  $1,4 \times 10^5$  UFC ( $4,2 \log_{10}$ ). Partindo desta concentração, realizamos o tratamento dos animais conforme descrito anteriormente e, após 4 semanas, realizamos a primeira eutanásia dos Grupos A.



**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. Análise estatística: *One-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, \* =  $p < 0,05$  e indica diferença estatística significativa com relação ao grupo CI.

Neste momento obtivemos as concentrações bacterianas dos pulmões dos grupos controle pós-tratamento (CPT), TB 10, TB 13 e controle de fármaco (RFP).

A concentração média de bactérias nos pulmões dos camundongos para o CPT foi de  $1,5 \times 10^3$  UFC ( $3,0 \log_{10}$ ), uma diminuição de concentração bacteriana de quase 100x, ou  $1,22 \log_{10}$ .

Essa resposta do controle sem tratamento já era esperada visto que o camundongo apresenta um sistema imune competente que, após ativado, é capaz de diminuir a concentração das bactérias presentes no tecido pulmonar.

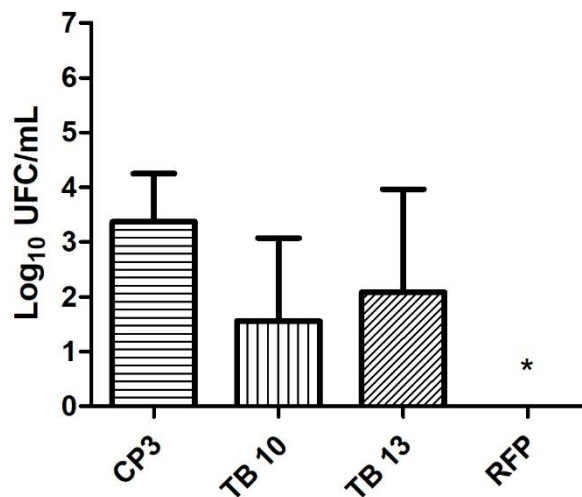
Comparando o CPT com os tratamentos administrados podemos observar uma diminuição de 1,23, 1,45 e 3,0  $\log_{10}$  para RFP, TB 13 e TB 10, respectivamente. O potencial inibitório do TB 10 foi surpreendentemente superior à inibição apresentada pela RFP, enquanto o TB 13 apresentou uma inibição bastante semelhante ao fármaco padrão da terapia.

Comparando os dados obtidos do experimento *in vivo* com o composto benzofuroxano de partida, BZ8, podemos dizer que algumas melhorias já foram alcançadas: os TBs 10 e 13 foram altamente biodisponíveis, promovendo inibição bacteriana mesmo após administração via oral e sem a necessidade de proteção de uma nanopartícula e, por isso, são compostos mais estáveis e possivelmente mais acessíveis do que o BZ8 em sua forma de administração.

Além disso o efeito inibitório exibido pelo composto BZ8 foi mantido para o TB 10, ambos apresentando níveis de crescimento bacteriano indetectáveis, demonstrando que as melhorias foram obtidas sem perda no potencial farmacológico/inibitório do composto.

Assim, após 3 meses do final do tratamento, os animais do Grupo B foram eutanasiados. Nosso objetivo era avaliar de forma real o potencial de esterilização dos compostos *in vivo*, ou seja, avaliar biologicamente o comportamento bacteriano após o encerramento da administração dos compostos.

Os dados obtidos são apresentados na Figura 12 a partir da contagem das UFC/mL após 60 dias de crescimento em estufa. São apresentados dados do grupo controle após 3 meses (CP3), TB 10, TB 13 e RFP.



**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). Análise estatística: *One-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett, \* =  $p < 0,05$  e indica diferença estatística significativa com relação ao grupo CP3.

Avaliando o crescimento bacteriano do grupo controle, observamos um aumento de 0,3  $\log_{10}$  UFC após os 90 dias. Esse aumento da concentração bacteriana também foi observado para os camundongos tratados com ambos os compostos benzofuroxanos.

Para o TB 10 houve o aparecimento das UFCs, o que indica que o fármaco deve possuir um potencial efeito bacteriostático, visto que após retirada do tratamento, as bactérias voltaram a se reproduzir em concentrações agora detectáveis. Partindo de 0, o aumento foi significativo, de 1,55  $\log_{10}$  UFC.

Para o TB 13 observamos o mesmo efeito, com um aumento de 0,53  $\log_{10}$  UFC após 90 dias do término do tratamento. Esse efeito de aumento na concentração bacteriana pode ser justificado pela capacidade das bactérias em desenvolver mecanismos de tolerância aos compostos e até mesmo ao sistema imunológico (caso dos controles sem tratamento).

É sabido que a *M. tuberculosis* possui a capacidade de tornar-se mais resistente, sem a necessidade de alterações genotípicas, quando na presença de compostos antimicrobianos. Neste caso, vários mecanismos de tolerância podem ser ativados sendo, um deles, a

diminuição da taxa de replicação bacteriana para compensar sua sobrevivência (GOOSSENS; SAMPSON; RIE, 2021).

Por isso, a queda na contagem de UFC observada na figura 11 para os TBs 10 e 13 (após os primeiros 30 dias de tratamento) pode ser justificada pela morte dos bacilos mais sensíveis aos compostos enquanto, os mais tolerantes, pararam de se replicar durante o tratamento e reativaram seu crescimento após a retirada dos compostos quando em um ambiente mais propício, como pode ser observado no gráfico 12. Esse efeito se justifica pela heterogeneidade das populações micobacterianas (GOOSSENS; SAMPSON; RIE, 2021).

Já para a RFP a contagem foi zerada, uma resposta surpreendente visto que durante o tratamento de 4 semanas as bactérias mantiveram-se presentes nos pulmões. Esse efeito não era esperado visto que não se realizou em conformidade com os outros dados obtidos.

Podemos suspeitar que a concentração bacteriana coletada dos pulmões e apresentada no gráfico 12 seja uma remanescente de bactérias que decaiu consideravelmente poucos dias após o término do tratamento. E, associado ao potencial imunológico do animal, essas bactérias foram eliminadas até níveis indetectáveis do crescimento em meio sólido, mesmo após a interrupção das doses.

Por fim, podemos concluir que a avaliação *in vivo* foi de extrema importância para um maior entendimento do funcionamento dos compostos e que, provavelmente, para um esquema de tratamento em humanos, o prolongamento do tratamento por mais de 30 dias e a associação de outros fármacos será crucial para superar os mecanismos de tolerância e garantir uma rápida diminuição da concentração bacilar no tecido pulmonar.

Além disso podemos acreditar que uma associação dos compostos *in vivo*, somando os efeitos do TB 10 - com um forte efeito inibitório após 4 semanas de tratamento – com a RFP – com uma concentração bacteriana indetectável após o término do tratamento – seria uma

poderosa alternativa, já comprovada *in vitro* anteriormente por meio do experimento de *checkboxoarder*.

Poderíamos observar ainda um efeito superior com diminuição das doses visto que a associação do TB 10 e RFP *in vitro* apresentou um efeito sinérgico e uma diminuição bastante significativa na CIM dos fármacos em associação.

Para o TB 13 a associação com a RFP também apresentou efeito sinérgico e uma grande diminuição da CIM quando em combinação, o que promove ainda mais o potencial da administração concomitante dos compostos *in vivo*.

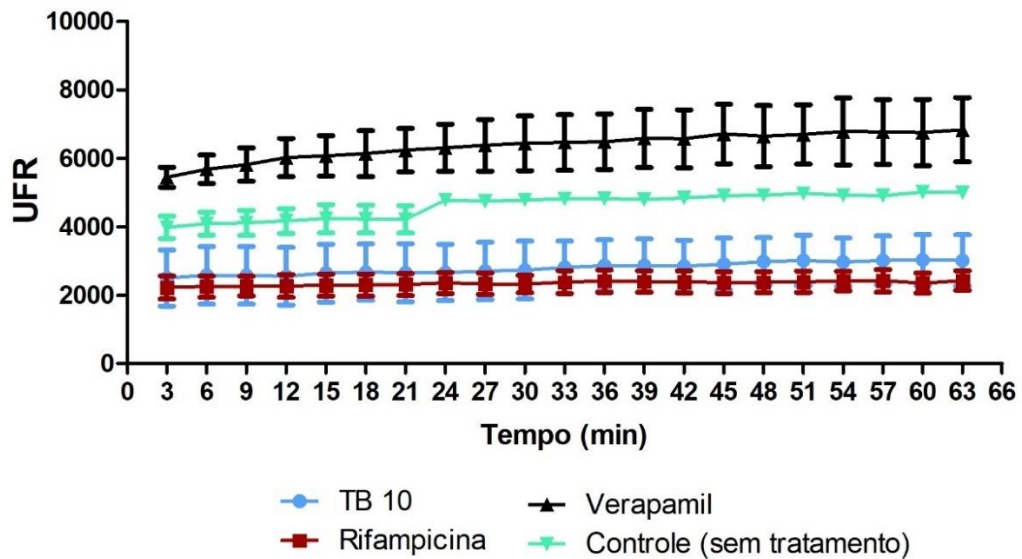
#### 4.4 Resultados da busca do mecanismo de ação: avaliação de inibição de bombas de efluxo, de alterações em parede e seleção de mutante resistente

A fim de investigar o mecanismo de ação apresentado pelo benzofuroxano TB 10 realizamos o experimento de acúmulo de brometo de etídio (EtBr) para avaliar algum possível efeito inibitório das bombas de efluxo presentes na parede micobacteriana.

O gráfico apresentado na Figura 13 a seguir apresenta a fluorescência relativa em função do tempo para as amostras controle (sem tratamento), TB 10, RFP e Verapamil.

O EtBr possui a capacidade de se intercalar à cadeia de DNA, emitindo alta fluorescência intracelular. Esse composto penetra a célula por difusão passiva e é excitado pelas bombas de efluxo da membrana. Quando as bombas são inibidas ocorre acúmulo de brometo intracelular, e uma maior fluorescência é observada (RODRIGUES *et al.*, 2011; VARDEVANYAN *et al.*, 2003).

Neste experimento o verapamil foi utilizado como controle de inibição das bombas por apresentar atividade inibitória para canais de cálcio em células eucarióticas (MACHADO *et al.*, 2016).



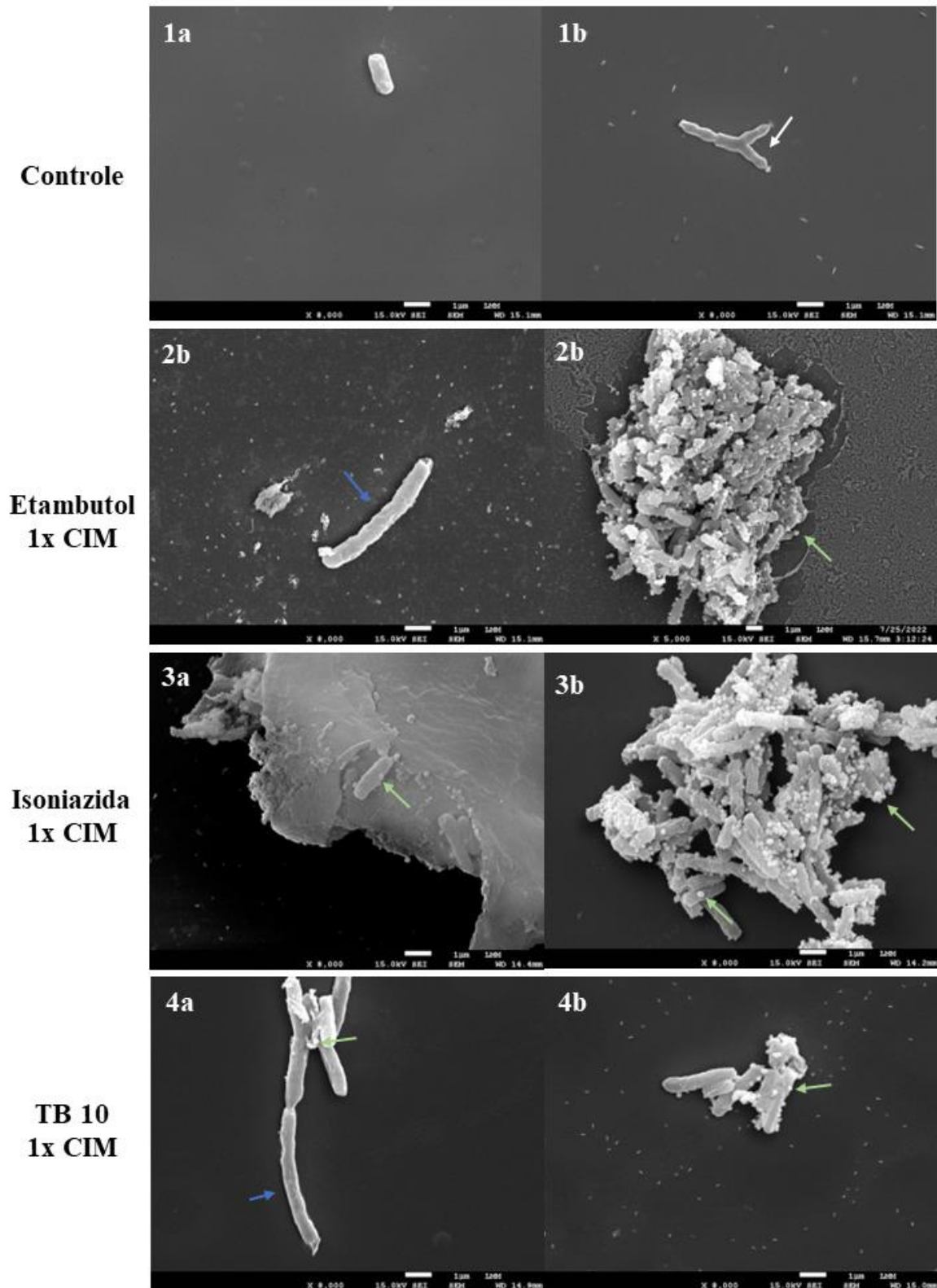
**Figura 13.** Gráfico da fluorescência relativa (UFR) do brometo de etídio com relação ao tempo de exposição (min).

O TB 10 apresentou uma atividade muito similar à RFP quanto a fluorescência apresentada, ambos mantendo-se abaixo da curva de fluorescência apresentada pelo controle sem tratamento. Isso indica que o TB 10 não apresenta atividade inibitória frente ao *M. tuberculosis* por meio da inibição de bombas de efluxo da parede.

Como forma de avaliar outros possíveis efeitos do tratamento com TB 10 na parede celular, realizamos análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em cultivos expostos por 24 h ao composto benzofuroxano TB 10 além dos controles INH e ETH como forma de comparação, visto as propriedades desses fármacos em inibir a síntese de estruturas relacionadas com a parede celular. As imagens obtidas após o tratamento são apresentadas na Figura 14 a seguir.

As imagens 1A e 1B da figura 14 apresentam bacilos em meio de cultura sem tratamento, com uma superfície lisa e forma bacilar normal.

Indicado pela seta branca na figura 1b podemos observar o aparecimento de estruturas transitórias ramificadas, características do processo de divisão celular que, neste caso, ocorre sem maiores interferências (CALEFFI-FERRACIOLI *et al.*, 2016; DAHL, 2004).



**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 CIM<sub>90</sub>. Barras brancas indicam 1 µm.

Nas imagens posteriores de números 2, 3 e 4 dos tratamentos com ETH, INH e TB 10 respectivamente, não foram observadas essas estruturas características devido, provavelmente, a uma interrupção da multiplicação celular provocada pela perturbação da presença dos compostos anti-*M. tuberculosis* no meio extracelular (GOOSSENS; SAMPSON; RIE, 2021).

Corroborando com essa afirmação, observamos bacilos de tamanho aumentado nas figuras 2a (ETH) e 4a (TB 10), indicados pelas setas azuis, indicando uma provável interrupção do ciclo de divisão celular. Apesar do ambiente extracelular alterado pela presença dos compostos inibitórios, a morfologia bacilar da micobactéria não se perdeu dentro das 24 h de exposição.

Uma parede celular de característica mais rugosa foi observada na amostra tratada com ETH (2a) e ainda a presença de numerosas e pequenas bolhas sob a superfície da parede celular quando em tratamento com o ETH (2b) e a INH (3b) foram encontradas, indicadas pelas setas verdes.

Observando o tratamento com o TB 10 é possível reparar a presença de bacilos alongados e das bolhas sob a superfície da parede celular. Essas bolhas são evidências características de estresse celular provocado por exposição à substâncias tóxicas (DAHL, 2005).

Essas observações morfológicas obtidas demonstram apenas que o TB 10 promove estresse celular frente a *M. tuberculosis* assim como INH e ETH porém não aponta decisivamente um mecanismo de ação relativo à inibição de fatores relacionados com a parede celular.

Assim, como forma de avaliar o mecanismo de ação apresentado pelo TB 10, buscamos o isolamento de um mutante que apresentasse resistência ao benzofuroxano. Assim, placas de meio de cultura 7h11 foram preparadas contendo diferentes concentrações do composto e conseguimos isolar uma colônia capaz de crescer em uma concentração de 6,25 µg/mL.

Essa colônia apareceu no meio sólido após 40 dias do plaqueamento e foi coletada e novamente semeada em placa contendo 6,25 µg/mL do composto TB 10. Novas colônias foram obtidas e parte foi utilizada para extração de material genético para sequenciamento enquanto outras colônias foram cultivadas para armazenamento.

As amostras obtidas apresentaram quantidades suficientes para a análise, porém seguirão para processos de purificação visto que a qualidade do material ainda não está de acordo com as indicações.

Consideramos essas colônias como mutantes resistentes ao TB 10 devido seu crescimento em meio de cultura contendo mais de 150x a CIM previamente encontrado, de 0,04 µg/mL.

As amostras serão sequenciadas por empresa terceirizada e os dados obtidos serão analisados e publicados em conjunto com as informações apresentadas nesse trabalho.

## 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* H<sub>37</sub>Rv, 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, Tayebah; GANJPANVAR, 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-secreted 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.