

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

FERNANDA MANAIA DEMARQUI

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

ARARAQUARA – SP
Fevereiro/2024

FERNANDA MANAIA DEMARQUI

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

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

Área de concentração: Bacteriologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan.

ARARAQUARA – SP

Fevereiro/2024

-
- D372m** Demarqui, Fernanda Manaia.
Mecanismo de ação e atividade *in vitro* e *in vivo* do complexo tris(1,10-fenantrolina)ferro(II) frente a *Mycobacterium tuberculosis* / Fernanda Manaia Demarqui. – Araraquara, 2024.
84 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Bacteriologia.
- Orientador: Fernando Rogério Pavan.
1. *Mycobacterium tuberculosis*. 2. Complexo ([Fe(fen)₃]²⁺). 3. Tuberculose. I. Pavan, Fernando Rogério, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: FERNANDA MANAIA DEMARQUI

ORIENTADOR: FERNANDO ROGERIO PAVAN

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

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

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

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

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

Araraquara, 26 de fevereiro de 2024

Dedicatória

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Marcel Proust

Resumo

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

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

Abstract

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

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

Sumário

Capítulo 1	11
1. Introdução.....	12
1.1 A parede celular micobacteriana	12
1.2 Tuberculose, um problema de saúde global	14
1.2.1 Epidemiologia	14
1.2.2 A história da tuberculose	15
1.2.3 A patogênese	15
1.3 Diagnóstico e tratamento	18
1.4 Resistência	20
Fonte: adaptado de (DECROO et al., 2020).	21
1.5 Pesquisa de novos fármacos - Complexos metálicos	22
1.5 Modelos animais na pesquisa de novos fármacos contra a tuberculose	24
2 Objetivos gerais	27
2.1 Objetivos específicos	27
3 Material e Métodos	27
3.1 Cultivo das cepas bacterianas	27
3.2 Ensaio de Concentração Inibitória Mínima de BCG <i>lux</i>	28
3.3 Avaliação da suscetibilidade bacteriana frente a concentrações fisiológicas de NaCl	28
3.4 Avaliação do Efeito Combinado do Complexo ([Fe(fen) ₃] ²⁺)	29
3.5 Estudo da Cinética de Liberação <i>in vitro</i>	30
3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	30
3.7 Sequenciamento Completo do Genoma de mutantes espontaneamente resistentes ao Complexo ([Fe(fen) ₃] ²⁺)	31
3.7.1 Isolamento de Mutante Espontâneo	31
3.7.2 Extração do DNA dos mutantes espontaneamente resistentes	31
3.7.3 Sequenciamento Completo do Genoma	32
3.7.4 Chamada de Variantes	33
3.8 Modelagem molecular	33
3.8.1 Identificação de bolsos farmacologicamente ativos	34
3.8.2 Acoplamento molecular	34
3.8.3 Visualização e análise de interações	34
3.8.4 Infecção e Tratamento de larvas de <i>G. mellonella</i>	34
3.9 Ensaio de sobrevivência larval	34

3.10 Processamento das larvas de <i>G. mellonella</i> para contagem de UFC	35
3.11 Infecção e tratamento de camundongos BALB/c	35
4 Resultados e Discussão	36
4.1 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ é ativo contra BCG <i>lux</i>	36
4.2 Concentrações fisiológicas de NaCl melhoram a sensibilidade bacteriana frente ao complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$	37
4.3 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ possui efeito sinérgico em associação com antibióticos controle	38
4.4 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ livre possui elevada taxa de liberação <i>in vitro</i>	40
4.5 Alvo molecular do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ encontra-se diretamente relacionado à regulação da parede bacteriana em <i>M. tuberculosis</i>	42
4.6 Modelagem estrutural e <i>Docking</i> molecular	43
4.7 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ promove desregulação na parede bacteriana em <i>M. tuberculosis</i>	46
4.8 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ não possui atividade contra BCG <i>lux in vivo</i> em <i>G. mellonella</i>	49
4.9 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ possui atividade contra <i>M. tuberculosis in vivo</i> em camundongos	51
Conclusão	52
Capítulo 2	54
1. Micobactérias não tuberculosas	55
1.2 MNT como patógenos oportunistas.....	56
1.3 Doenças pulmonares	56
1.4 Infecções de pele e de tecidos moles	57
2. Objetivos.....	58
2.1 Objetivos específicos	59
3. Material e métodos.....	60
3.1 Avaliação da atividade do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ frente a espécies de micobactérias não tuberculosas.....	60
3.2 Avaliação do efeito sinérgico do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ a amicacina.....	60
3.3 Avaliação do efeito do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ sobre a cinética bacteriana	61
3.4 Avaliação do efeito do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ sobre a formação e o rompimento de biofilmes de MNT	61
4. Resultados e Discussão.....	62
4.1 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ é ativo contra espécies de micobactérias não tuberculosas.....	62
4.2 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ age sinergicamente a amicacina contra isolados clínicos de <i>M. abscessus</i> e <i>M. abscessus</i> subs. <i>bolletii</i>	63

4.3 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ é bactericida contra a cepa padrão e isolados clínicos de MNT	65
4.4 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ não tem atividade contra biofilmes de MNT	66
5. Conclusão	66
Referências	68

Capítulo 1

1. Introdução

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

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

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

1.1 A parede celular micobacteriana

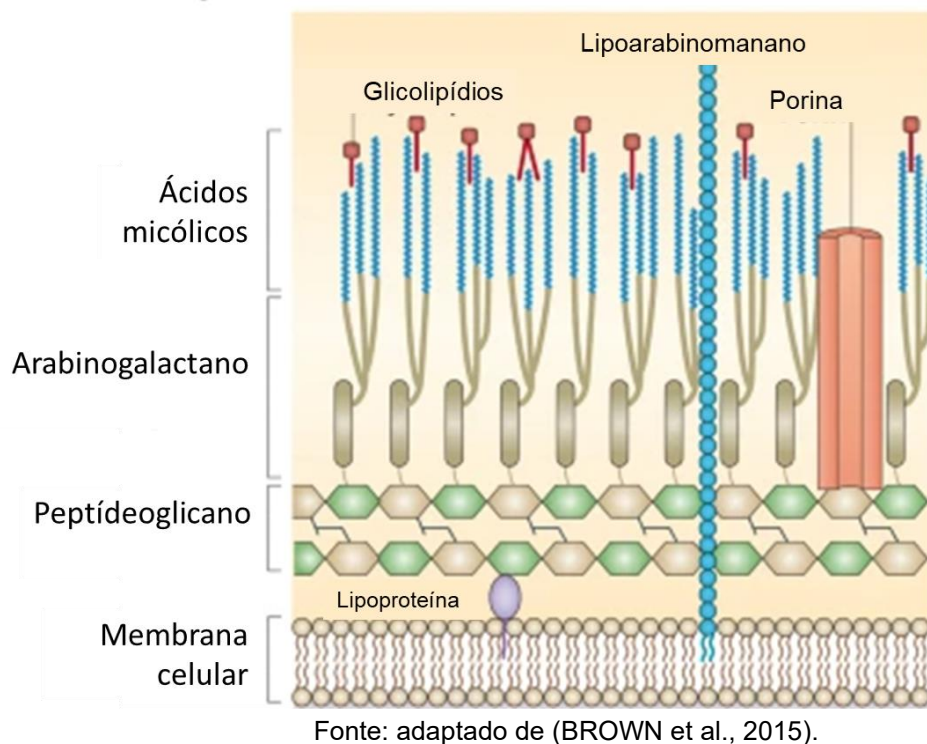
A parede celular das micobactérias é uma das mais complexas de todas as paredes celulares bacterianas e confere muitas de suas características distintivas, incluindo a característica de resistência ao álcool-ácido e a resistência natural a muitos antibióticos, ao gênero *Mycobacterium* (CHATTERJEE, 1997;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

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

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

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

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



1.2 Tuberculose, um problema de saúde global

1.2.1 Epidemiologia

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

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

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

1.2.2 A história da tuberculose

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

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

1.2.3 A patogênese

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

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

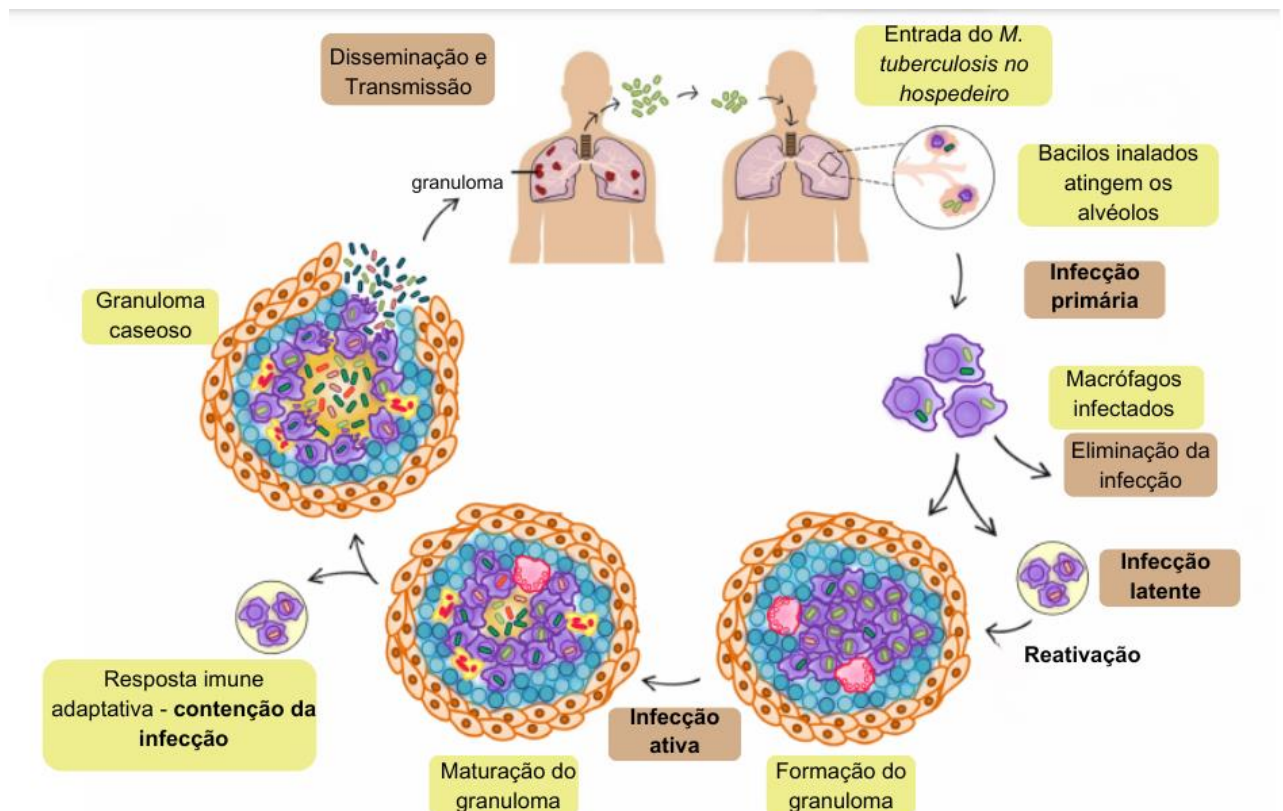
A transmissão da tuberculose ocorre quando uma pessoa com a doença ativa expulsa bacilos de *M. tuberculosis* em gotículas microscópicas (1-5 µm de diâmetro) de saliva ou pela tosse, por exemplo. Essas gotículas são suficientemente pequenas para permanecerem no ar por várias horas, o que também permite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

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

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

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

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



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

1.3 Diagnóstico e tratamento

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

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

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

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

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

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

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

1.4 Resistência

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

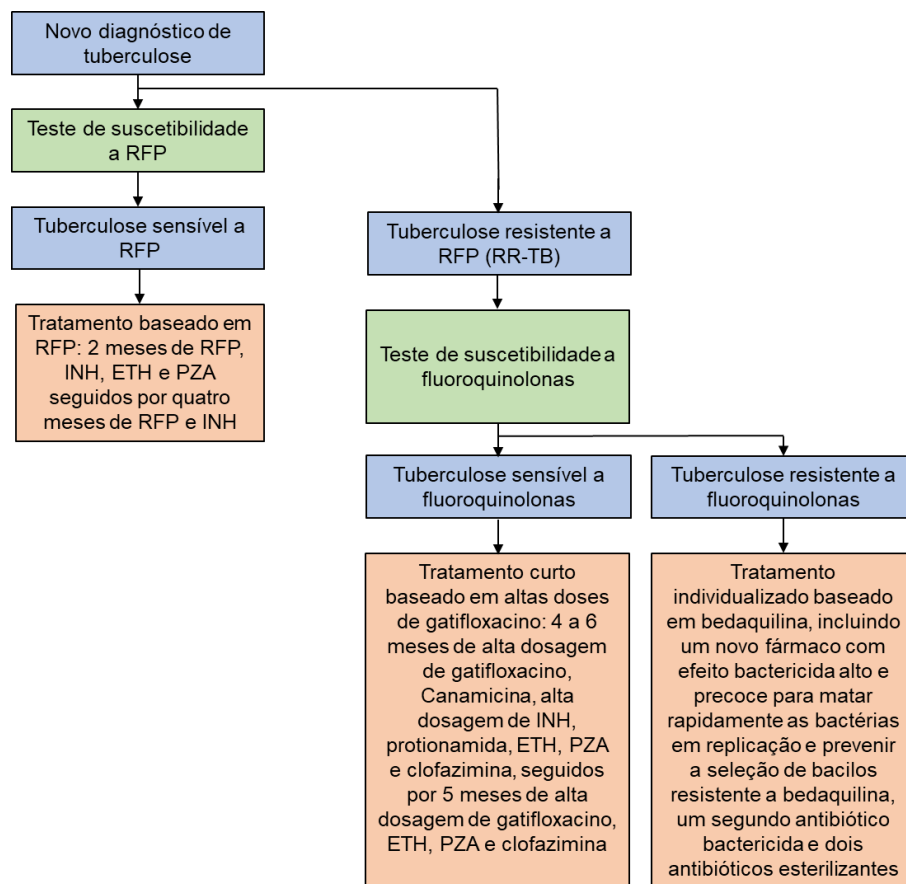
Esses mecanismos de resistência podem ocorrer isoladamente ou em combinação, levando a cepas multirresistentes de *M. tuberculosis*. O aumento dessas cepas é uma preocupação crescente de saúde pública. Outro fator interessante é que *M. tuberculosis* não carrega elementos móveis, sendo suas mutações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

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

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

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

Figura 3. Cascata de tratamento contra a tuberculose



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

1.5 Pesquisa de novos fármacos - Complexos metálicos

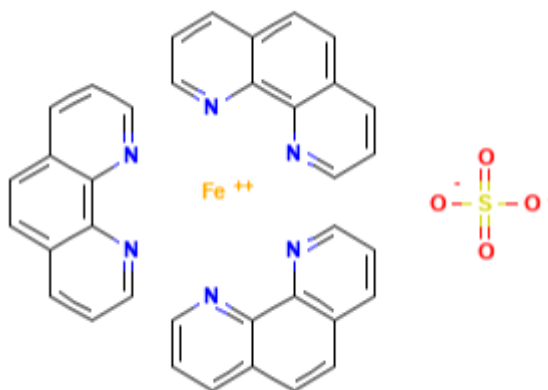
No âmbito da busca por novos medicamentos, diversas abordagens são empregadas, incluindo o desenvolvimento de novas classes de fármacos, a síntese de análogos de medicamentos e o reposicionamento de fármacos, que envolve atribuir um novo uso a compostos já conhecidos e comercializados (PAVAN et al.,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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

1.5 Modelos animais na pesquisa de novos fármacos contra a tuberculose

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 Objetivos gerais

A presente Tese teve como objetivo aprofundar estudos *in vitro* sobre os efeitos do complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), descrever seu mecanismo de ação frente a *M. tuberculosis* e avaliar sua eficácia *in vivo*.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilidade bacteriana ao Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) frente a diferentes concentrações fisiológicas de NaCl;
- Avaliar o efeito do complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) combinado a fármacos da terapêutica;
- Avaliar a cinética de liberação *in vitro*;
- Determinar o mecanismo de ação do complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) pelo sequenciamento completo do genoma de mutantes espontaneamente resistentes;
- Avaliar a morfologia celular após exposição ao Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$);
- Avaliar a eficácia *in vivo* do Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) em modelo de experimentação tradicional e alternativo.

3 Material e Métodos

Todos os experimentos envolvendo *M. tuberculosis* foram realizados dentro de um laboratório de contenção nível 3 (NB-3) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp.

3.1 Cultivo das cepas bacterianas

A cepa micobacteriana padrão de *M. tuberculosis* utilizada para a grande parte dos experimentos foi a cepa H37Rv, ATCC 27294, sensível aos fármacos da terapia padrão de tuberculose. A linhagem é mantida em freezer -80 °C e, para utilização, foi cultivada 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 até que atingisse turbidez igual a 1 MacFarland.

Culturas em fase logarítmica de BCG lux (SNEWIN et al., 1999) foram preparadas em caldo Middlebrook 7H9 (Difco, EUA), suplementado com 0,2% de glicerol (Sigma-Aldrich, Reino Unido), 0,05% de polissorbato 80 (Sigma-Aldrich, Reino Unido) e 10% de albumina dextrose catalase (ADC). Inóculos de BCG lux foram preparados a 1×10^8 ou 1×10^9 UFC/mL em solução salina tamponada com Tween 80 (PBS-T, 0,05%) (LI et al., 2018a).

3.2 Ensaio de Concentração Inibitória Mínima de BCG lux

O complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ em solução comercial aquosa foi filtrado para esterilidade em filtros de 0,22 μM . Soluções estoque de Rifampicina foram preparadas na concentração de 10.000 $\mu\text{g/mL}$ em DMSO. A concentração inibitória mínima *in vitro* (CIM), é definida como a concentração mínima do composto necessária para inibir o crescimento do inóculo. Um volume de 100 μL dos compostos previamente preparados foi diluído em caldo Middlebrook 7H9 suplementado com ADC de forma que fosse atingida uma concentração inicial de 25 $\mu\text{g/mL}$, e semeado em triplicata em uma placa de 96 poços. Alíquotas adicionais de 100 μL de BCG lux em fase mid-log em uma diluição de 1×10^6 UFC/mL foram semeados em cada poço da placa de 96 poços.

O controle positivo consiste apenas em cultura bacteriana; e o controle negativo apenas caldo. As placas foram incubadas a 37°C em estufa por 1 semana. Após a incubação, a densidade óptica de cada poço foi medida em um leitor de placas espectrofotométrico (Molecular Device, Reino Unido) a 520 nm. A CIM foi determinada por meio de três experimentos independentes.

3.3 Avaliação da suscetibilidade bacteriana frente a concentrações fisiológicas de NaCl

O experimento foi realizado de acordo com o trabalho de Laurroy-Maumus. A atividade anti-*M. tuberculosis* do complexo metálico em diferentes concentrações de NaCl (14,5mM, 125 mM e 250 mM) foi determinada pelo REMA (ensaio de microtitulação de resazurina). Soluções estoque (10.000 $\mu\text{g/mL}$) dos compostos testados como controle foram preparadas em água para isoniazida, dimetilsulfóxido para rifampicina e solução comercial do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$. Os compostos foram diluídos em meio Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado com 10% de OADC, e na

presença de NaCl para produzir as concentrações acima mencionadas. A microdiluição dos fármacos foi realizada em placas de 96 poços para obter intervalos de concentração final do fármaco de 0,09-25,00 µg/mL.

A suspensão de *M. tuberculosis* foi preparada de forma que sua turbidez coincida com a densidade óptica de Padrão Mcfarland nº1. Após diluição adicional de 1:100 no respectivo em meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, 100 µL do inóculo foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 orifícios juntamente com os compostos. As placas foram incubadas por 7 dias a 37°C. No sétimo dia, adicionou-se 30 µL de resazurina a 0,01%.

A fluorescência dos poços foi lida após 24h utilizando-se o leitor de placas Cytation 3 (Biotek®). A CIM₉₀ é definida como a menor concentração na qual houve 90% de inibição do crescimento das bactérias. Os resultados são demonstrados como a média obtida de três ensaios independentes (PALOMINO et al., 2002).

3.4 Avaliação do Efeito Combinado do Complexo ([Fe(fen)₃]²⁺)

A partir da solução estoque previamente preparada, os antibióticos foram diluídos em meio 7H9 em concentrações previamente determinadas. Em seguida foi transferido 50 µL de cada uma das suspensões diluídas ao longo de uma placa de microtitulação estéril da seguinte forma: na vertical a concentração diluída de um dos fármacos controle (Rifampicina, Pretomanida, Moxifloxacino e Delamanida) e na horizontal o complexo ([Fe(fen)₃]²⁺), do qual será realizada a diluição seriada da esquerda para direita.

A suspensão de *M. tuberculosis* foi preparada de forma que sua turbidez coincida com a densidade óptica de Padrão Mcfarland nº1. Após diluição adicional de 1:100 em meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC, 100 µL do inóculo foi adicionado a cada poço de um poço de 96 placa de microtitulação, com exceção da coluna 12, que é designada como controle de esterilidade do meio de cultura. As culturas foram incubadas por 7 dias em 37°C. No sétimo dia, 30 µL de resazurina a 0,01% foi adicionado.

A fluorescência dos poços foi lida após 24h utilizando-se o leitor de placas Cytation 3 (Biotek®). Os resultados representam a média obtida de três ensaios independentes (CALEFFI-FERRACIOLI et al., 2016).

3.5 Estudo da Cinética de Liberação *in vitro*

Para a investigação da liberação *in vitro*, 20 mL de tampão PBS pH 1,2 contendo 1% de polissorbatato 80 foram empregados a uma temperatura de 37 °C, com agitação a 150 rpm. Foram examinadas condições nas quais o complexo metálico ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) estava na forma livre e em microemulsão ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) (KIM et al., 2014). As amostras foram colocadas em sacos de diálise com peso molecular entre 12-14 kDa (DE SOUZA et al., 2015). Em seguida, ao longo de um período de até 24 horas, retiraram-se amostras do meio receptor em intervalos distintos (com reposição do meio de dissolução) e foram quantificadas por Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) da Thermo Scientific, modelo 6300, nos Estados Unidos.

3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada para avaliação de possíveis danos a parede celular causados pela ação do Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$).

Para isso, cultivos de *M. tuberculosis* H37Rv foram expostos, separadamente, ao valor equivalente a 1 e 2x o valor de CIM do Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) pelos períodos de 24, 48 e 72 horas. Os antibióticos isoniazida e etambutol foram utilizados como controle, em concentrações equivalentes, assim como um grupo não exposto a nenhum tratamento.

Após o período determinado para cada cultivo, foram realizadas 3 lavagens com PBS para retirada do meio de cultura, as amostras foram cobertas com fixador Karnovisk e armazenadas na geladeira *overnight*. No dia seguinte, o fixador foi retirado e a amostra foi coberta com tampão cacodilato e armazenada em geladeira até a análise.

As amostras foram enviadas e analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL JSM 7001F) sob responsabilidade da Prof. Dra. Sonia Nair Baó, do

Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

3.7 Sequenciamento Completo do Genoma de mutantes espontaneamente resistentes ao Complexo ([Fe(fen)₃]²⁺)

3.7.1 Isolamento de Mutante Espontâneo

Esta etapa levou ao isolamento de cepa mutante com perfil de resistência ao complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) que pode, através do Sequenciamento Completo do Genoma (SGC), possibilitar a compreensão de seu mecanismo de ação. O isolamento foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Gao e colaboradores (GAO et al., 2015), duas vezes de maneira independente, partindo de cultivos diferentes da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv.

Foram preparadas placas de ágar 7H11 contendo o composto em 1x, 2x, 4x e 8x o valor de CIM₉₉ obtido em meio sólido. Essas placas foram preparadas por adição dos compostos nas determinadas quantidades para fundir com o ágar 7H11. A partir de um cultivo de *M. tuberculosis* um total de 10⁹ UFC/mL foi semeado em placas de ágar 7H11 na concentração de 1x CIM₉₉ em meio sólido e então incubadas a 37 °C por 3 a 4 semanas. As colônias formadas nas placas foram caracterizadas fenotipicamente e então semeados para isolamento em placas de 7H11 contendo concentrações sucessivamente maiores do complexo. O processo foi repetido até não aparecerem mais colônias nas placas de seleção. As colônias que cresceram em placas de 7H11 com concentração mais elevada do complexo foram utilizadas para inocular o meio líquido 7H9.

Visando manter a pressão seletiva e confirmar a resistência do mutante em outra condição de cultivo o complexo também esteve presente no meio líquido 7H9 na concentração de 1x CIM₉₀ para meio líquido, e então esse cultivo foi incubado a 37°C durante 1 a 2 semanas. Após lavagem com PBS, as micobactérias foram ressuspensas em meio de congelamento e armazenadas a - 80°C.

3.7.2 Extração do DNA dos mutantes espontaneamente resistentes

Com o objetivo de avaliar possíveis mutações gênicas que possam estar associadas à resistência do mutante espontaneamente isolado e através da determinação da localização e função do gene mutado, pudemos, juntamente com os testes complementares realizados anteriormente por Solcia e colaboradores (SOLCIA et al., 2021), sugerir o possível mecanismo de ação desempenhado pelo complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$). Foram sequenciados os mutantes obtidos no trabalho de Machado (FAPESP 19/10326-7).

Para extração do DNA, os mutantes foram descongelados em meio 7H9 suplementado com OADC e na presença de pressão seletiva correspondente a metade da concentração utilizada para seu isolamento do Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$). Após crescimento em meio líquido, o cultivo foi semeado em placas de meio 7H9 com pressão seletiva equivalente em meio sólido para que fosse realizada a extração do DNA de colônias isoladas.

Para extração do DNA, uma colônia isolada foi ressuspensa em um tubo *ependorf* contendo tampão TE e *beads* de vidro e vortexado em agitação máxima. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde adicionou-se acetato de sódio 3M e etanol 96% gelado. Uma nova etapa de agitação foi realizada. Após incubação de 1 hora, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido com auxílio de uma pipeta. Álcool 70% foi adicionado e um novo período de incubação foi realizado. O sobrenadante foi removido cuidadosamente para não causar danos ao *pellet* e a amostra foi deixada secando em temperatura ambiente. O *pellet* foi então ressuspensa em água MilliQ e aquecido a 55°C por 10 minutos, com 3 ciclos de agitação dentro desse período.

A quantificação do gDNA foi realizada no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA).

3.7.3 Sequenciamento Completo do Genoma

O SCG proposto foi realizado no Centro de Sequenciamento do Genoma Microbiano (Pittsburgh, PA). O centro faz uso da plataforma HiSeq (Illumina Genome Analyzer, Califórnia, EUA) que aproveita a tecnologia de sequenciamento por síntese (SBS) Illumina. O sequenciamento foi realizado com uma cobertura mínima de 100 vezes, com tamanho das *reads* igual a 300 bases *paired end* (150x150).

3.7.4 Chamada de Variantes

A análise de chamada de variantes foi também realizada no Centro de Sequenciamento do Genoma Microbiano (Pittsburgh, PA). Depois que o DNA genômico foi sequenciado, os dados gerados consistem em dois arquivos de leitura de sequenciamento: R1 e R2. Esses arquivos são as leituras diretas e reversas de cada amostra e ambos são usados no processo de chamada de variantes. Essas leituras já foram cortadas para remover os adaptadores das sequências e não contém nenhuma leitura de índice.

O genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_000195955.2/) foi utilizado como referência. O chamador de variante breseq (DEATHERAGE; BARRICK, 2014) (versão 0.36.1) foi empregado para alinhar e comparar os dados de sequenciamento gerados com o arquivo de referência usando os seguintes comandos:

```
breseq -r [arquivo de referência] [nome do exemplo]_fastq.gz [nome do exemplo]_fastq.gz -o [nome do arquivo de saída].
```

Os resultados obtidos foram organizados em forma de tabela e filtrados para seleção de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP, do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) presentes exclusivamente nos genomas dos mutantes e ausentes no genoma de H37Rv.

3.8 Modelagem molecular

A ferramenta ChemDraw Professional 17.0 foi utilizada para desenhar a estrutura 2D do composto. Em seguida, o software Chem3D foi empregado para converter esta estrutura em sua forma 3D correspondente (ANZA et al., 2021). Tratamentos de mecânica molecular, otimização energética e geométrica foram aplicados para simular a evolução temporal das estruturas moleculares e seu comportamento em resposta a diferentes condições ambientais, utilizando o software Avogadro.

3.8.1 Identificação de bolsos farmacologicamente ativos

O modelo estatístico PockDrug foi utilizado para prever os bolsos da proteína receptora capazes de se ligarem ao composto, considerando valores de probabilidade acima de 0,7 e proximidade de 5,5 Å (SILVA et al., 2023). A estrutura cristalina da molécula receptora PonA1 (5CRF) foi baixada do Protein Data Bank ([//www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)).

3.8.2 Acoplamento molecular

O cálculo da energia de ligação permite estabelecer a afinidade entre sítios alvo e grupos funcionais de ligantes, considerando diversas interações como ligações de hidrogênio, interações iônicas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals. As previsões de ligação entre a estrutura otimizada do ligante e os bolsos do receptor foram feitas usando a ferramenta computacional AutoDock Vina, com base em um campo de força empírico e no algoritmo genético Lamarckiano (KUMAR et al., 2021).

3.8.3 Visualização e análise de interações

O software *Discovery Studio Visualizer* foi utilizado para analisar e gerar diagramas 2D das interações do composto com os locais alvo da proteína receptora e, da mesma forma, o Pymol foi utilizado para obter imagens 3D dessas interações.

3.9 Infecção e Tratamento de larvas de *G. mellonella*

As larvas de *G. mellonella* foram adquiridas da Livefoods Direct Ltd. (Sheffield, Reino Unido). Larvas saudáveis foram definidas como aquelas que possuíam cor creme uniforme, alta motilidade e a capacidade de se endireitar quando viradas, 250 mg de peso e 2 a 3 cm de comprimento (LI et al., 2018a). As superfícies larvais foram descontaminadas com etanol 70% e 10 µl de BCG lux foram injetados na hemocele através da última *proleg* esquerda usando uma microseringa. As larvas infectadas foram mantidas em placas de Petri de 25 cm forradas com papel filtro e incubadas no escuro a 37°C. Para o tratamento, uma dose de 10 µl de um único tipo de droga foi injetada diretamente na hemocele através da última *proleg* esquerda 1 hora após a infecção.

3.10 Ensaio de sobrevivência larval

A sobrevivência de larvas infectadas ($n = 20$ por grupo) após o tratamento foi registrada a cada 24 horas por 96 horas. As larvas foram consideradas mortas quando não responderam ao toque. Os grupos controle eram formados por larvas infectadas tratadas com 10 μ L de PBS. As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier foram plotadas usando dados agrupados de um mínimo de três experimentos independentes.

3.11 Processamento das larvas de *G. mellonella* para contagem de UFC

As alterações na carga bacteriana durante a infecção ou após o tratamento foram determinadas por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Em cada ponto de tempo, quatro larvas foram selecionadas aleatoriamente e homogeneizadas individualmente em um tubo de matriz lisante contendo seis esferas metálicas de 1/8 de polegada em 800 μ L de PBS-T, utilizando um homogeneizador FastPrep F120 (MP Biomedicals, EUA) a 6,0 m/s por 1 minuto. Para a contagem de UFC, foram feitas diluições seriadas de seis vezes e semeadas em ágar Middlebrook 7H11, suplementado com 20 μ g/mL de piperacilina (PIP, Sigma-Aldrich, Reino Unido) para inibir o crescimento da flora nativa da *G. mellonella* (LI et al., 2018). A PIP não possui atividade inibitória sobre o H37Rv (MIC = 320 μ g/mL) (ASAI et al., 2020).

3.12 Infecção e tratamento de camundongos BALB/c

O estudo foi desenvolvido de acordo com (FALZARI et al., 2005; RULLAS et al., 2010; MOURIK et al., 2018). Os grupos de tratamento estabelecidos foram: Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), SLN + Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), Isoniazida e SLN vazio, cada um sendo composto por 5 animais.

No dia 0, todos os animais receberam via intranasal, com auxílio de uma pipeta, 10 μ L em cada narina uma dose de concentração total de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL de *M. tuberculosis* H37Rv. No 14º dia, 5 animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia com uma mistura de cetamina/xilazina/Diazepam e atropina (127; 10; 1,9 e 0,2 mg/kg de peso corpóreo respectivamente), e os pulmões retirados, macerados com tampão PBS e plaqueados em meio middlebrook® 7H11 suplementado com 10% OADC para contagem de colônias, como controle da infecção. A partir desse dia, iniciou-se a terapêutica com doses de segunda a sexta-feira, via gavagem, de 200 mg/kg

de peso corpóreo dos compostos testados, assim como do SLN vazio. O tratamento durou 4 semanas.

No terceiro dia após o fim do tratamento, todos os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia, como descrito anteriormente, tiveram os pulmões retirados, macerados com tampão PBS e plaqueados em meio middlebrook® 7H11 suplementado com 10% OADC para contagem de colônias.

O crescimento de colônias foi observado aproximadamente cinquenta dias após a finalização do experimento, quando a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada.

4 Resultados e Discussão

4.1 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ é ativo contra BCG *lux*

As estimativas da OMS são que, em 2017, houveram 10 milhões de novos casos de tuberculose, resultando em 1,6 milhão de mortes. Dessas, a grande maioria foi causada por *M. tuberculosis*, mas aproximadamente 142 mil novos casos e 12,5 mil mortes foram causadas por *M. bovis*. Os casos de *M. bovis* em humanos são provavelmente subestimados devido à falta de notificação em países endêmicos e à capacidade laboratorial limitada (KANIPE; PALMER, 2020).

A atividade do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ foi analisada frente a cepa BCG *lux* e os resultados obtidos demonstram sua atividade, apresentando uma CIM igual a 2,87 µg/mL, como pode ser observado na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima contra BCG *lux*.

Composto	CIM ₉₀ (µg/ml)	D.P.
BCG <i>lux</i>	2,87	0,33

Fonte: autora.

M. bovis é quase universalmente resistente à pirazinamida, antibiótico de primeira linha no tratamento da tuberculose (DE LA RUA-DOMENECH, 2006; ESTEBAN; MUÑOZ-EGEA, 2016). Portanto, um esquema de antibióticos mais

apropriado para esses casos é rifampicina, isoniazida e etambutol, embora a exclusão do etambutol ainda resulte em taxas de sucesso de 93% (LAN; BASTOS; MENZIES, 2016). Além disso, a duração do tratamento para *M. bovis* é mais longa, de 9 meses em comparação com o protocolo de tratamento de 6 meses para *M. tuberculosis*, principalmente devido à omissão da pirazinamida, que é sinérgica com a rifampicina (DE LA RUA-DOMENECH, 2006; LAN; BASTOS; MENZIES, 2016). O Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) foi sinérgico a rifampicina quando avaliado contra a cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv, como será mostrado a seguir.

A cepa BCG *lux* foi utilizada por Asai e colaboradores como um modelo de infecção *in vivo* alternativo de larvas de *G. mellonella*, trazendo a vantagem de ser utilizada em laboratórios de nível de segurança 2. Dessa forma, como será demonstrado

4.2 Concentrações fisiológicas de NaCl melhoram a sensibilidade bacteriana frente ao complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$)

O ensaio de Microdiluição em placa foi realizado com a cepa H37Rv, com variação de concentrações de NaCl similares às fisiológicas (14,5, 125 e 250 mM). Os valores de CIM₉₀ encontrados para as concentrações de 14,5, 125 e 250 mM de NaCl (**Tabela 2**) foram iguais a 1,42, 0,36 e 0,89 μM , respectivamente, indicando um aumento de sensibilidade de *M. tuberculosis* frente ao complexo em ambientes com osmolaridades similares a encontrada na superfície de vias aéreas e no ambiente intramacrofágico.

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) em concentrações variadas de NaCl

Composto	CIM ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)	CIM ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)	CIM ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)	CIM ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)
		14,5 mM NaCl (meio de cultura)	125 mM NaCl (plasma)	250 mM NaCl (macrófagos)
Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$)	3,92	1,42	0,36	0,89
Rifampicina	0,098	0,098	0,098	0,19

Isoniazida	0,163	0,163	1,48	10,91
------------	-------	-------	------	-------

Dentre variáveis relevantes, a eficácia do tratamento da tuberculose pode ser comprometida pela presença de populações de *Mycobacterium tuberculosis* fenotipicamente tolerantes e pelo surgimento de populações resistentes aos fármacos utilizados. Neste estudo inicial, objetivou-se avaliar o desempenho do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ em face do *M. tuberculosis* em condições de estresse osmótico *in vitro*. No ano de 2013, Hatzios et al. identificaram que a interrupção da expressão da proteína PKnD, integrante da via de sinalização responsável pela adaptação ao estresse osmótico, resultou em um aumento de quatro vezes no valor da CIM para a vancomicina no *M. tuberculosis* (HATZIOS et al., 2013).

Em 2016, um estudo subsequente revelou que concentrações fisiológicas de NaCl podem induzir a tolerância fenotípica bacteriana. Notavelmente, no trabalho de Solcia et al., observou-se que os aminoglicosídeos, predominantemente, perdem eficácia quando a concentração de NaCl é ajustada para níveis fisiológicos (LARROUY-MAUMUS et al., 2016). Interessantemente, resultados distintos foram obtidos para o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, evidenciando uma atividade aprimorada quando o pH do meio de cultura é ajustado para valores análogos aos do granuloma, e quando são adicionadas concentrações de proteínas séricas equiparáveis às condições fisiológicas (Solcia et al., 2021). No âmbito de nosso estudo, rifampicina (RIF) e isoniazida (INH) foram novamente empregadas como controles, mantendo suas CIM estáveis, enquanto para o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, os valores indicam um aumento na sensibilidade do *M. tuberculosis* em ambientes com osmolaridades semelhantes às encontradas na superfície das vias aéreas e no ambiente intramacrofágico.

4.3 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ possui efeito sinérgico em associação com antibióticos controle

A **Tabela 3** apresenta os resultados da Concentração Inibitória Fracionada (CIF) da associação do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ a rifampicina, pretomanida e delamanida frente a cepa padrão H37Rv de *M. tuberculosis*. A interação entre os

antibióticos e o complexo metálico foi avaliada através do cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), obtido pela equação:

$$ICIF = \frac{(CIM \text{ composto controle na associação})}{(CIM \text{ composto controle sozinho})} + \frac{(CIM \text{ Complexo } [Fe(fen)_3]^{2+} \text{ na associação})}{(CIM \text{ Complexo } [Fe(fen)_3]^{2+} \text{ sozinho})}$$

A partir do ICIF a interação entre os antibióticos controle utilizados e o complexo pode ser classificada em sinérgica ($ICIF \leq 0,5$), aditiva ($ICIF > 0,5 \leq 1$), neutra ($ICIF > 1 \leq 2$) ou antagônica ($ICIF > 2$) (KUMAR et al., 2012).

Tabela 3 – Associação do Complexo $[Fe(fen)_3]^{2+}$ a antibióticos empregados no tratamento preconizado

Composto	CIM ₉₀ (µg/ml)		CIF	ICIF	Resultado
	Sozinho	Associado			
Complexo ($[Fe(fen)_3]^{2+}$)	3,92	0,07	0,017	0,26	Sinérgico
Rifampicina	0,004	0,001	0,25		
Complexo ($[Fe(fen)_3]^{2+}$)	3,92	0,07	0,017	0,10	Sinérgico
Pretomanida	0,35	0,03	0,08		
Complexo ($[Fe(fen)_3]^{2+}$)	3,92	0,07	0,017	0,67	Aditivo
Delamanida	0,06	0,04	0,66		

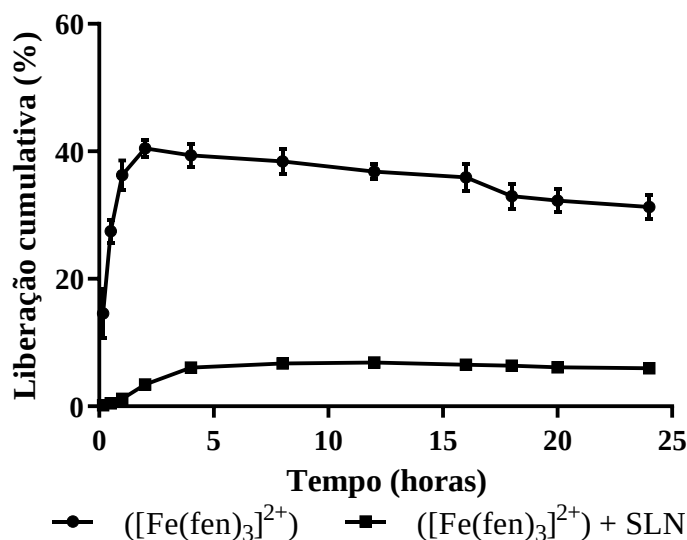
A poliquimioterapia é a estratégia utilizada há mais de 50 anos que visa combater o surgimento de cepas resistentes ao tratamento preconizado ao empregar antibióticos que possuem mecanismos de ação distintos, tornando possível o combate a mutantes naturalmente resistentes dentro de uma população (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Sendo assim, um candidato a novo fármaco deveria, idealmente, ter efeito sinérgico ou aditivo aos fármacos da terapia.

Os resultados encontrados apontam para um efeito sinérgico entre o Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ e antibióticos utilizados na terapia atual como a Rifampicina e a Pretomanida, além de uma interação aditiva entre o complexo e a delamanida, indicando que, se futuramente inserido na terapêutica, o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ poderia ser administrado em combinação com tratamento já disponível.

4.4 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ livre possui elevada taxa de liberação *in vitro*

O experimento de Cinética de liberação *in vitro* foi realizado em condição *sink*, o que implica na capacidade de o meio de dissolução de dissolver pelo menos 3 vezes a quantidade de composto utilizada. O **Gráfico 1** mostra o perfil de liberação *in vitro* do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ em sua forma livre (aquosa) e em emulsão (SLN + $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), a 37°C em tampão fosfato pH 1,2, simulando um ambiente estomacal em jejum.

Gráfico 1 – Perfil de liberação *in vitro* do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$. A linha com círculos representa sua forma livre e a linha cinza com quadrados a um Sistema Lipídico Nanoestruturado (SLN + $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) em condições de 37°C e em tampão fosfato pH 1,2.



Fonte: autora

É possível observar que a liberação do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ livre ocorreu de forma mais rápida, atingindo 40% de liberação cumulativa em aproximadamente 1 hora e se mantendo estável por aproximadamente 20 horas, onde ocorre uma ligeira

queda. Resultado semelhante foi observado por Chen e colaboradores em molécula de quitosana solúvel em água, desenvolvida para melhorar a entrega do fármaco (CHEN et al., 2012).

Já a liberação do Complexo metálico a partir do SLN foi lenta e menor, atingindo um pico de aproximadamente 10% após 12 horas. Esse resultado *in vitro* diverge do encontrado por Solcia e colaboradores (2021) *in vivo*, que demonstra que SLN+([Fe(fen)₃]²⁺) encontrava-se disponível no plasma sanguíneo 6 horas após o tratamento em concentrações capazes de inibir o crescimento micobacteriano (SOLCIA et al., 2021). O uso do pH ácido em 1,2 pode ter influenciado nesse momento já que a variação do pH reflete no perfil de liberação de sistemas lipídicos.

O perfil de liberação de antibióticos desejado pode depender do tipo de infecção a ser tratada e das características específicas do antibiótico em questão. Em infecções agudas, onde uma ação antibiótica rápida é essencial, a formulação do antibiótico pode ser projetada para uma liberação mais rápida. Para infecções crônicas ou de longa duração, uma liberação mais lenta pode ser preferida. Isso ajuda a manter níveis terapêuticos no organismo por um período prolongado, o que pode ser necessário para erradicar a infecção. A tuberculose pode assumir diferentes formas, desde uma infecção aguda inicial até uma infecção crônica latente ou ativa (ANDERSSON; HUGHES, 2010).

Em alguns casos, a liberação controlada pode ajudar a minimizar o risco de desenvolvimento de resistência antibiótica. A exposição prolongada a níveis subterapêuticos pode favorecer o surgimento de bactérias resistentes. Para como infecções localizadas pode ser benéfico ter uma liberação mais lenta para manter concentrações elevadas do antibiótico no local da infecção (MARTÍNEZ, 2008).

A frequência de administração e a conveniência para o paciente também são fatores importantes. Se uma formulação de liberação lenta permitir uma administração menos frequente, isso pode melhorar a adesão do paciente ao tratamento (BURKHART; SABATÉ, 2003).

É importante que a formulação do antibiótico seja projetada de maneira a otimizar a eficácia do tratamento, minimizar os efeitos colaterais e prevenir o desenvolvimento de resistência antibiótica sempre que possível.

4.5 Alvo molecular do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ encontra-se diretamente relacionado à regulação da parede bacteriana em *M. tuberculosis*

O SCG de dois mutantes espontaneamente resistentes e da cepa H37Rv, inicialmente utilizada para o isolamento de tais mutantes, possibilitou a identificação de um possível mecanismo de ação do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$. A partir da comparação dos genomas, 8 SNPs foram encontrados em ambos os mutantes e não no genoma selvagem (H37Rv).

Após serem desconsiderados SNPs em genes conhecidamente altamente polimórficos, uma mutação encontrada no gene *PonA1*, que codifica a proteína de ligação à penicilina bifuncional, e no gene *pks1*, codificador de enzimas policetídeo sintase se destacaram. Esses dois genes relacionam-se a formação e estrutura da parede bacteriana.

O gene *PonA1* atua na transglicosilação e transpeptidação do peptidoglicano (PG) da parede celular, tornando-se um importante regulador do crescimento polar enquanto o gene *pks1* está relacionado a formação de biofilme em micobactérias.

A família das proteínas de ligação à penicilina (PBP, do inglês *Penicillin-binding protein*), a qual pertence o gene *PonA1*, não é tradicionalmente escolhida como alvo para antibióticos contra a *M. tuberculosis* pois β -lactâmicos são altamente suscetíveis a degradação devido à presença endógena de β -lactamases em micobactérias. No entanto, estudos indicam atividade deste grupo de antibióticos contra cepas sensíveis e resistentes de *M. tuberculosis* (HUGONETT et al., 2009).

A fosforilação da proteína PonA1 controla a taxa de crescimento polar em micobactérias e alterações em seus níveis celulares resultam em uma forma estruturalmente anormal, sugerindo que PonA1 tem função crucial na manutenção da síntese fisiológica da parede celular e seu formato durante o crescimento (KIESER et al., 2015). Além disso, Farhat e colaboradores demonstraram através de análise genômica que a atividade de PonA1 afeta a tolerância a antibióticos, como a rifampicina, em *M. tuberculosis* (FARHAT et al., 2013). A alteração da atividade da transpeptidase ou fosforilação PonA1 afeta o crescimento bacteriano na presença do antibiótico teicoplanina, que tem como alvo a biossíntese do peptidoglicano (KIESER et al., 2015).

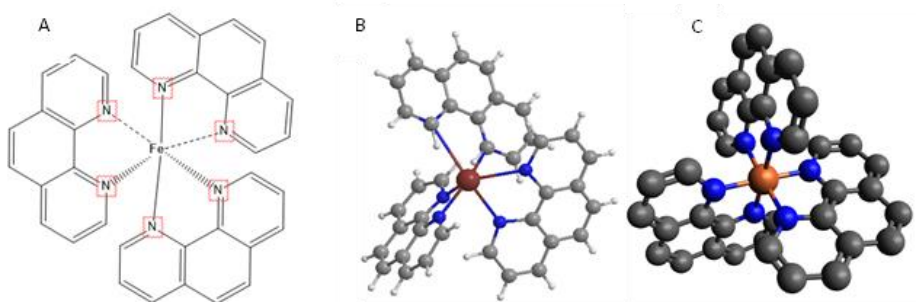
Fenotipicamente, uma característica marcante dos mutantes espontaneamente isolados caracterizados neste trabalho é o crescimento lento. Em meio líquido 7H9 suplementado com 10% de OADC sob pressão seletiva equivalente

a meio CIM do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, as culturas demoraram em torno de 50 dias para atingir turbidez equivalente a 1 na escala MC Farland e aproximadamente 60 dias para colônias serem observadas em meio sólido, sob igual pressão seletiva. Fato semelhante foi observado por Billman-Jacobe e colaboradores ao caracterizar um mutante de *Mycobacterium smegmatis* que teve a função do gene *PBP1*, correspondente ao *ponA1* em *M. tuberculosis*, interrompida (BILLMAN-JACOB; HAITE; COPPEL, 1999).

4.6 Modelagem estrutural e *Docking* molecular

A estrutura do complexo modelada em 2D foi convertida para 3D usando o software Chem3D, e Avogadro foi usado para relaxar e otimizar o ligante. As categorias, tipos e números de interações, bem como os gráficos 2D, foram obtidos utilizando o *software Discovery Studio Visualizer*. Já as imagens 3D foram geradas pelo Pymol. A **Figura 5** apresenta as estruturas 2D e 3D do complexo assim como sua molécula otimizada.

Figura 5 – Estruturas do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$. A) Estrutura 2D do complexo; B) estrutura 3D gerada com Chem3D; C) Molécula otimizada com Avogadro.



Fonte: autora.

O *PocketDrugg* previu 35 bolsos passíveis de interação dentro de PonA1, no entanto, para os propósitos desta pesquisa, apenas os bolsos com uma probabilidade superior a 70% foram considerados. Os resultados podem ser observados na **Tabela 4**.

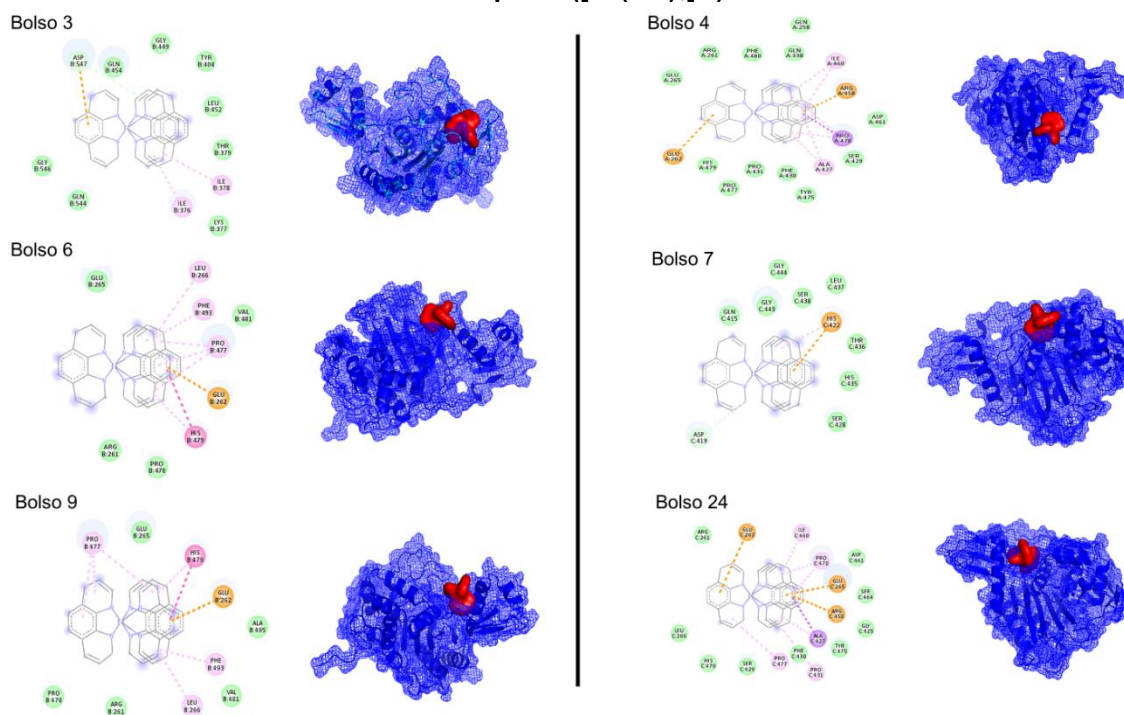
Tabela 4 – Bolsos na proteína PonA1 passíveis de interação com o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$. Dos 35 bolsos que foram previstos pelo *PocketDrugg*, nove apresentaram probabilidade superior a 70%.

Bolsos	Volume de Hull	Hidrofobicidade de Kyte	Resíduos Polares	Resíduos Aromáticos	Número de Resíduos	Probabilidade de Interação
P 17	455.24	1.5	0.25	0.17	12	0.99
P 7	470.07	1.5	0.25	0.17	12	0.99
P 22	337.6	1.17	0.38	0.15	13	0.99
P 6	417.71	0.77	0.47	0.27	15	0.98
P 24°	540.25	1.1	0.4	0	10	0.96
P 9	506.71	0.47	0.53	0.13	15	0.91
P 3	473.5	0.24	0.5	0.21	14	0.89
P 4	449.6	0.24	0.5	0.21	14	0.89
P 10	547.61	0.16	0.56	0.13	16	0.83

Fonte: autora.

As categorias, tipos e números de interações, assim como gráficos 2D, foram obtidos usando o Discovery Studio Visualizer. As imagens 3D foram geradas com o Pymol. Embora todos os bolsos passíveis de interação tenham formado interações com o complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), a maioria delas foi composta por ligações hidrofóbicas, caracterizadas como fracas. No entanto, os bolsos 4, 6, 9 e 24 apresentaram ligações eletrostáticas, que são mais fortes do que as ligações hidrofóbicas. Além disso, os bolsos 3 e 7 foram capazes de se ligar de forma estável ao complexo metálico por meio de ligações não clássicas de ponte de hidrogênio formadas pelos anéis aromáticos. A **Figura 6** mostra os bolsos que apresentaram ligações mais estáveis com o complexo e o *docking* molecular.

Figura 6 – Docking molecular da proteína PonA1 e seus bolsos passíveis de interação com o Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$.



Fonte: autora.

O Complexo Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) mostra uma afinidade excepcionalmente alta pelos bolsos do receptor PonA1, com valores de energia de ligação que oscilam entre -10.7 e -8.2 Kcal/mol. Esta afinidade supera notavelmente a reportada por Mundhe et al. (MUNDHE et al., 2023) para a interação entre a isoniazida e seu receptor InhA, que é de -5.1 Kcal/mol. Destacando particularmente, o bolso número 10 do receptor PonA1 demonstra a maior afinidade.

A marcada afinidade do Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), (-10.7 Kcal/mol) sugere uma alta probabilidade de que seu mecanismo de ação na erradicação de *M. tuberculosis* seja através da inibição dos processos de transglicosilação e transpeptidação do peptidoglicano da parede celular. Esta ação implica uma perturbação direta na síntese da parede celular, dado o acoplamento do composto à proteína de ligação à penicilina de classe A (PonA1) (KIESER et al., 2015).

No entanto, é crucial considerar se a elevada afinidade reportada pelo AutoDock Vina reflete interações químicas robustas, mais além das forças hidrofóbicas, que costumam ser mais fracas. Esta distinção é essencial para validar a relevância biológica e a potência terapêutica do ligando. A afinidade medida pode ser enganosamente alta se está predominantemente mediada por interações hidrofóbicas, que embora contribuam para a estabilidade do complexo ligando-receptor, nem sempre indicam um acoplamento específico e efetivo em termos de atividade biológica.

Ao analisar detalhadamente as interações mediante *Discovery Studio Visualizer*, observa-se que, embora a maioria dos bolsos de união formaram ligações hidrofóbicas, os bolsos 4, 6, 9 e 24 estabeleceram ligações eletrostáticas, que são intrinsecamente mais fortes. Além disso, identificaram-se ligações de pontes de hidrogênio não clássicos nos bolsos 3 e 7, mediados por anéis aromáticos. Especificamente, o bolso 7 interagiu com o ligante através de duas ligações hidrofóbicas, uma eletrostática e uma ponte de hidrogênio com o aspartato 419, além de três interações adicionais com a histidina 422. O bolso 3 formou uma ligação de carbono-hidrogênio com o aspartato 547 e uma interação eletrostática com o mesmo resíduo, o que sugere uma união estável, reforçada por duas interações hidrofóbicas adicionais. Este sítio é especialmente relevante porque coincide com a região de união da penicilina V em PonA1, como se evidencia em sua estrutura cocrystalina (PDB: 5CXW) (FILIPPOVA et al., 2016a).

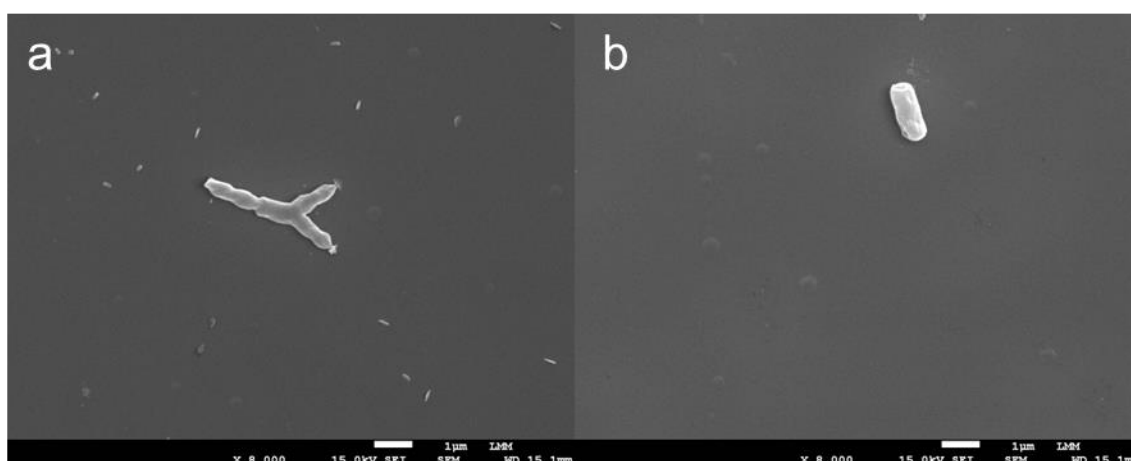
Este estudo revela uma notável afinidade do Complexo para com PonA1, superando interações previamente conhecidas, o que sugere um potencial terapêutico significativo no tratamento da tuberculose. As análises detalhadas mostram interações moleculares complexas e específicas, indicando que o Complexo não apenas se liga firmemente, mas também pode influenciar de forma efetiva em processos celulares críticos.

4.7 Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) promove desregulação na parede bacteriana em *M. tuberculosis*

Com o objetivo de investigar *in vitro* o possível mecanismo de ação identificado pelo SGC, foi desenvolvida a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Neste experimento, foi possível examinar as células micobacterianas após a exposição ao Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), assim como aos fármacos utilizados na terapia cujo mecanismo de ação está diretamente relacionado à síntese da parede celular, e na ausência de tratamento.

Nas imagens **A e B da Figura 7** observam-se bacilos que não foram submetidos a nenhum tratamento, nos quais é possível notar células com superfície lisa, além de formato e tamanho regulares.

Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de varredura. As imagens A e B apresentam bacilos de *M. tuberculosis* sem tratamento. Barras brancas indicam 1 mm.

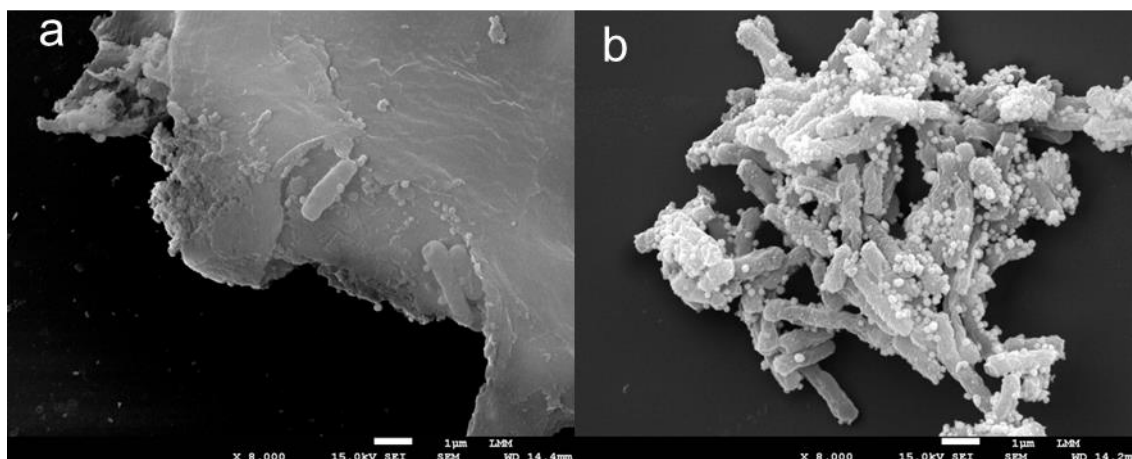


Fonte: autora

As imagens **A e B da Figura 8** correspondem a exposição a 1x o CIM de Isoniazida por 24 horas. Nesse momento, é possível observar rugosidade na

superfície micobacteriana, assim como a presença de tecidos celulares danificados, característico do tratamento com esse antibiótico.

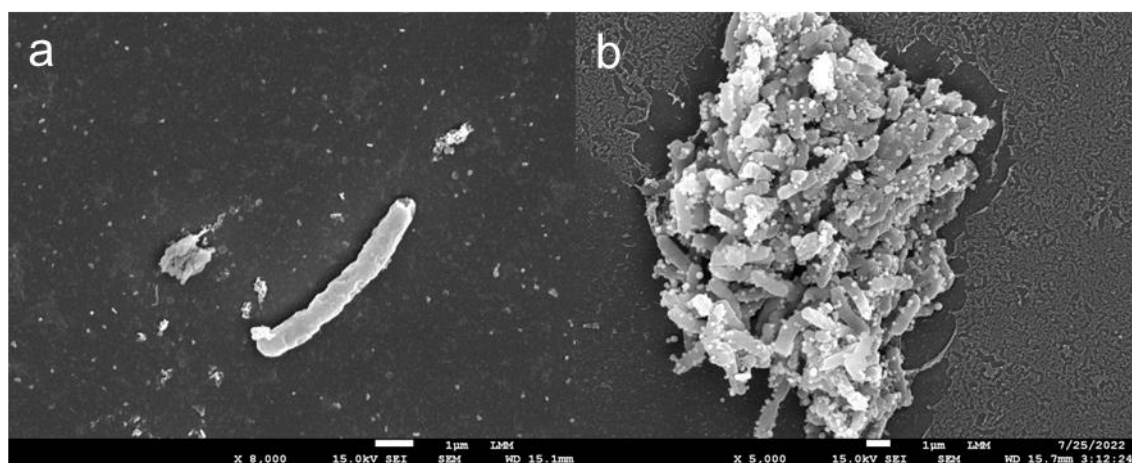
Figura 8. Imagens de microscopia eletrônica de varredura. As imagens A e B apresentam bacilos de *M. tuberculosis* após 24 horas de exposição a isoniazida nos valores da CIM₉₀. Barras brancas indicam 1 mm.



Fonte: autora

Os efeitos do tratamento com 1x o CIM de Etambutol podem ser identificados nas imagens **A e B** da **Figura 9**. Condizente com o mecanismo de ação descrito para esse fármaco, relacionado a síntese de parede bacteriana, observa-se, assim como no tratamento com Isoniazida, paredes celulares rugosas e a presença de *debris* celular.

Figura 9. Imagens de microscopia eletrônica de varredura. As imagens A e B apresentam bacilos de *M. tuberculosis* após 24 horas de exposição a etambutol nos valores da CIM₉₀. Barras brancas indicam 1 mm.

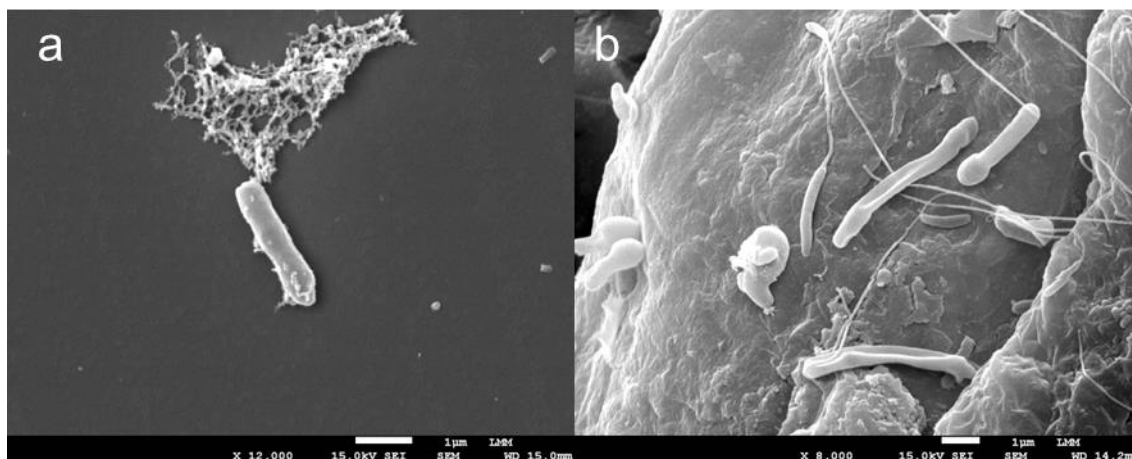


Fonte: autora

Finalmente, as imagens **A e B** **Figura 10** apresentam bacilos após o tratamento com o complexo metálico. Além de bactérias em processo de divisão celular não

serem encontradas, a superfície dos bacilos apresenta aspecto rugoso e grande quantidade de tecido celular morto. O tamanho dos bacilos é um ponto a se destacar visto que após o tratamento as células estão mais alongadas e perderam seu formato, estando mais achatadas do que o habitual.

Figura 10. Imagens de microscopia eletrônica de varredura. As imagens A e B apresentam bacilos de *M. tuberculosis* após 24 horas de exposição a Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ nos valores da CIM₉₀. Barras brancas indicam 1 mm.



Fonte: autora

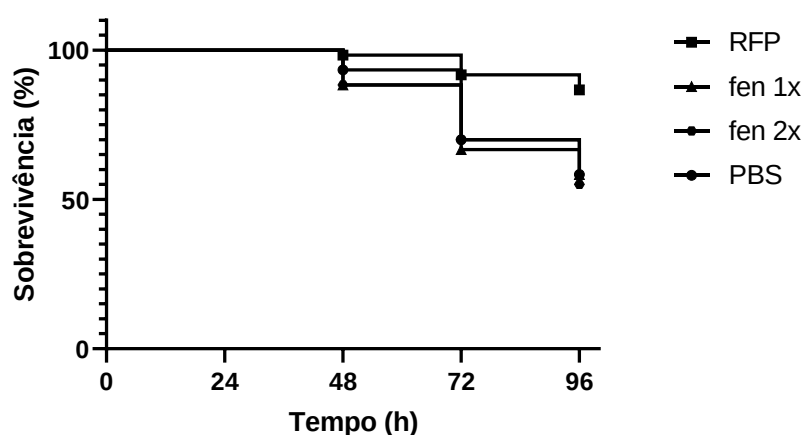
A relevância destas observações é reforçada pelos resultados encontrados com a realização do *docking* molecular visto que a afinidade do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ com a proteína PonA1 indica a possibilidade de que sua atuação na eliminação de *M. tuberculosis* ocorra por meio da inibição dos processos de transglicosilação e transpeptidação do peptidoglicano presente na parede celular. Esse efeito sugere uma interferência direta na síntese da parede celular, pois o composto se associa à proteína de ligação à penicilina de classe A (PonA1) (FILIPPOVA et al., 2016b).

4.8 Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) não possui atividade contra BCG *lux* *in vivo* em *G. mellonella*

A eficácia do Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) contra a cepa BCG *lux* foi testada em duas concentrações, 1x e 2x sua CIM, em dose única de tratamento. Anteriormente a esse experimento, foi realizado teste de toxicidade em *G. mellonella*, com resultados favoráveis, ou seja, o composto testado não se mostrou tóxico, não sendo observadas mortes na dose máxima testada que era equivalente a 300 µg/mL. O teste foi realizado em triplicata biológica e experimental.

Observada a segurança do Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) nas larvas, iniciou-se a análise da atividade do mesmo em larvas previamente infectadas. Os resultados do experimento de sobrevivência larval podem ser observados no **Gráfico 2**. Novamente, podemos observar a segurança do composto visto que até o período de 48 horas após o tratamento não foi observada nenhuma morte. No entanto, com a progressão da doença, há um aumento no número de larvas mortas, e a taxa de sobrevivência se assemelha a do grupo controle sem tratamento (PBS).

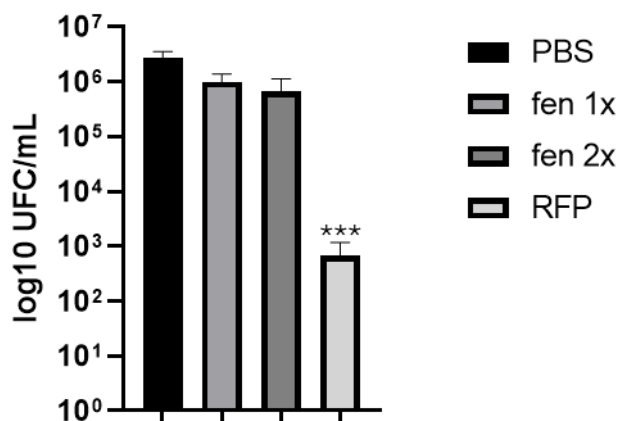
Gráfico 2 – Taxa de sobrevivência larval após infecção por BCG *lux* e tratamento.



Fonte: autora.

Em relação a carga bacteriana, os resultados podem ser observados na **Gráfico 3**. Apesar de haver uma ligeira queda no número de UFC, ela não é significativamente relevante quando comparada ao controle positivo de tratamento, a RFP, onde pode-se observar uma redução maior do que 3 logs no número de UFC.

Gráfico 3 – Gráfico em barras da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após tratamento com dose única. Material plaqueado: macerado das larvas de *G. mellonella* após infecção e tratamento. Tratamentos: fen = Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ em 1 ou 2x sua CIM_{90} ou RFP = rifampicina. *** indicam $p\text{-value} < 0,05$.



Fonte: autora.

Muitos fatores podem ter contribuído para o insucesso do tratamento nas larvas de *G. mellonella*, entre eles estão a dose única de tratamento, a metabolização do composto pelas larvas e a interação do organismo infectado com componentes de sua fórmula, principalmente o ferro.

O ferro é essencial para a sobrevivência de quase todos os organismos, pois desempenha um papel indispensável em inúmeros processos metabólicos, incluindo respiração, geração de energia, transporte de oxigênio, regulação genética, biossíntese de DNA e imunidade (DUNKOV; GEORGIEVA, 2006; ONG et al., 2006; MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009). Além disso, em insetos, o ferro está envolvido na formação da cutícula, bronzeamento, melanização e cicatrização de feridas (LOCKE; NICHOL, 1992). O ferro é um biocatalisador ou transportador de elétrons extremamente atraente porque pode facilmente alterar estados de oxidação e de coordenação. Apesar de sua necessidade e dessas características valiosas, o ferro em excesso ou fora do lugar é altamente destrutivo, pois pode gerar radicais de oxigênio pela reação de Fenton-Haber Weiss (HOWER et al., 2009; KELL, 2009).

Por esse motivo, a hipótese criada foi que, apesar de não ser tóxico em larvas saudáveis, a combinação da infecção com o excesso de ferro trazido pelo complexo objeto de estudo deste trabalho levou a diminuição na taxa de sobrevivência larval e ao insucesso do tratamento.

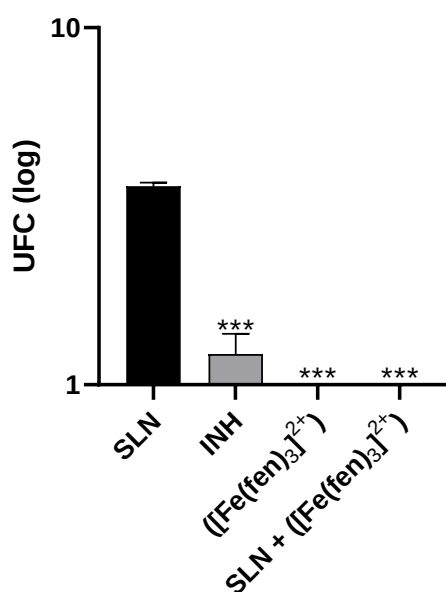
4.9 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ possui atividade contra *M. tuberculosis in vivo* em camundongos

Para analisar a atividade *in vivo* do Complexo objeto deste estudo, camundongos BALB/c foram infectados com a cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv e tratados pelo período de 4 semanas. Durante o tratamento, os animais foram pesados periodicamente e constantemente observados para identificação de alterações nos padrões ou danos neurológicos.

Os camundongos mantiveram seu ganho de peso dentro do esperado e não foram observadas mudanças comportamentais significativas. Durante a primeira semana de tratamento um animal do grupo Controle sem tratamento (SLN) veio a óbito sem causa aparente e essa representa a única perda animal de todo o período experimental.

Finalizado o tratamento, os animais foram eutanasiados e seus pulmões foram processados e plaqueados em meio de cultura. A atividade do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ foi constatada pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) gráfico 4.

Gráfico 4. Gráfico em barras da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após 4 semanas de tratamento. Material plaqueado: macerado dos pulmões dos camundongos após infecção e tratamento. SLN: controle de veículo; Tratamentos INH, Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ em solução aquosa e SLN + $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$. Dados obtidos após 28 dias de tratamento. *** indicam *p-value* < 0,05



Fonte: autora

Para a infecção dos camundongos, $1,5 \times 10^5$ UFC, ou $5,17 \log_{10}$ foram inoculadas em cada animal. Considerando essa a concentração bacteriana inicial, no

grupo SLN houve uma queda de $1,5 \log_{10}$ que pode ser justificada pela ação do sistema imune do animal que tenta combater a infecção.

Já entre o Grupo SLN, que recebeu apenas a SLN vazia e o grupo INH há uma queda de aproximadamente duas unidades de $\log_{10}$ enquanto em ambos os grupos tratados com o Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$), ou seja, em sua forma livre ou associado a SLN, nenhum crescimento micobacteriano foi observado.

O homogenato pulmonar resultante do tratamento com ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) foi congelado em freezer -80 após o plaqueamento inicial. Após a observação da ausência de crescimento nesses grupos, o material foi inoculado em meio líquido e colocado para crescimento sob agitação e novamente em meio sólido. Não houve crescimento.

Os resultados mostram que o Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) apresentou eficácia maior do que a INH, fármaco de primeira linha no tratamento contra a tuberculose, que por sua vez teve resultado bastante satisfatório, apresentando queda de aproximadamente $4 \log_{10}$ em relação ao inóculo inicial e $2 \log_{10}$ em relação ao controle de veículo.

Conclusão

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

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

Além disso, a análise do alvo molecular revelou uma possível interação do complexo com o gene PonA1, associado à síntese da parede bacteriana. A

modelagem estrutural e o *docking* molecular apontaram para interações estáveis entre o complexo e diferentes bolsos da proteína PonA1.

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

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

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

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

Capítulo 2

1. Micobactérias não tuberculosas

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

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

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

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

1.2 MNT como patógenos oportunistas

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

1.3 Doenças pulmonares

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

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

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

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

1.4 Infecções de pele e de tecidos moles

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

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

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



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

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

2. Objetivos

Avaliar o efeito do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ sobre Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) *in vitro*.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima do Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) frente a cepa padrão de *M. abscessus* e três isolados clínicos do mesmo complexo de micobactérias;
- Avaliar o efeito do Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) quando combinado a amicacina frente a cepa padrão de *M. abscessus*;
- Avaliar o efeito do Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) sobre a cinética bacteriana de *M. abscessus* e três isolados clínicos do mesmo complexo de micobactérias;
- Avaliar o efeito do Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) sobre a formação e o rompimento de biofilmes de MNT.

3. Material e métodos

3.1 Avaliação da atividade do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ frente a espécies de micobactérias não tuberculosas

A partir da solução estoque previamente preparada, amicacina e o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ foram diluídos em meio 7H9 em concentrações previamente determinadas. A CIM do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ frente a *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subespécie *massiliense*, *Mycobacterium abscessus* subespécie *bolletii* e *Mycobacterium fortuitum* foi obtida através de técnicas convencionais de microdiluição em caldo.

Os inóculos foram cultivados até atingirem Densidade Ótica (D.O) igual a 1. O inóculo final era formado por uma diluição 1:1000 da suspensão bacteriana em meio 7H9 suplementado com OADC. Foram transferidos 100µL do inóculo para cada poço da microplaca estéril que já continha a diluição dos compostos a serem testados. A leitura das placas foi realizada após incubação por 72 horas a 37°C pela observação de crescimento ou não das bactérias. O resultado foi observado pela menor concentração em que não se observa o crescimento bacteriano através da leitura da densidade ótica em leitor de microplaca. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental.

3.2 Avaliação do efeito sinérgico do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ a amicacina

A partir da solução estoque previamente preparada, os antibióticos foram diluídos em meio 7H9 em concentrações previamente determinadas. Em seguida foram transferidos 50 µl de cada uma das suspensões diluídas ao longo de uma placa de microtitulação estéril da seguinte forma: na vertical a concentração diluída de amicacina e na horizontal o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, do qual foi realizada a diluição seriada da esquerda para direita. Foram utilizadas concentrações maiores e menores do que a CIM₉₀ previamente estabelecida.

Os inóculos de *M. abscessus* (ATCC 19977) e de isolados clínicos de *M. abscessus*, *M. abscessus* subespécie *bolletii* e *M. abscessus* subespécie *massiliense* foram cultivados até atingirem D.O igual a 1. O inóculo final era formado por uma

diluição 1:1000 da suspensão bacteriana em meio 7H9 suplementado com OADC. Foram transferidos 100 µL do inóculo para cada poço da microplaca estéril que já continha a diluição dos compostos a serem testados. A leitura das placas foi realizada após incubação por 72 horas a 37°C pela observação de crescimento ou não das bactérias. Os resultados representam a média obtida de três ensaios independentes (CALEFFI-FERRACIOLI et al., 2016).

3.3 Avaliação do efeito do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ sobre a cinética bacteriana

Para o estudo da cinética bacteriana, foram preparadas soluções dos compostos em caldo Middlebrook 7H9, suplementado com OADC, de modo que suas concentrações finais, em contato com a micobactéria, corresponderem a 1x ou 2x a CIM₉₀ previamente estabelecida. Os inóculos de *M. abscessus* (ATCC) e de isolados clínicos de *M. abscessus*, incluindo *M. abscessus* subespécie *bolletti* e *M. abscessus* subespécie *massiliense*, foram cultivados até atingirem uma densidade óptica igual a 1, sendo a quantidade de bactérias inoculadas na solução de 1×10^5 unidades UFC/mL. Um grupo controle, sem tratamento, e outro tratado com amicacina em 1x ou 2x a CIM₉₀, foram incluídos no experimento.

As amostras foram incubadas em um agitador orbital a 37 °C e 121 rpm por um período de 7 dias. A cada 48 horas, alíquotas foram retiradas para diluição seriada e posterior plaqueamento em ágar Middlebrook 7H10 enriquecido com OADC. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂ por 3 dias para posterior contagem de UFC. O experimento foi conduzido em três repetições independentes, e os resultados foram expressos pela média aritmética e desvio padrão do número de UFC/mL.

3.4 Avaliação do efeito do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ sobre a formação e o rompimento de biofilmes de MNT

Para a avaliação do efeito do complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ e da amicacina sobre a formação de biofilmes, de fundo plano pré-tratada com poli-D-lisina. À suspensão bacteriana na placa, foram adicionados 50 µL do complexo ou de amicacina de forma

com que fosse atingida uma concentração igual a 1 até 5x a CIM de cada composto. A formação de biofilme foi avaliada após 4 dias de incubação a 37°C.

Após o período de incubação, as células planctônicas foram removidas pela lavagem delicada dos poços com PBS. 100 µL de cristal violeta 0,05% foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Após, o cristal violeta foi removido e os poços foram novamente lavados com PBS e deixados para secar naturalmente. A extração do cristal violeta ocorreu pela adição de 300 µL de ácido acético 30% (v/v) em temperatura ambiente e nova incubação por 30 minutos. A leitura da placa foi realizada com auxílio de um leitor em absorvância de 562nm

Para a avaliação da capacidade de rompimento do biofilme maduro, *M. abscessus* ATCC foi cultivada por 3 dias em caldo 7H9 Middlebrook suplementado com OADC. O cultivo foi ajustado para uma D.O = 0,05 e 150 µL da suspensão bacteriana foram inoculados em placas de poliestireno de 96 poços, de fundo plano, e incubada por 4 dias a 37 °C. Após a este período, o meio foi retirado, os poços foram lavados cuidadosamente com PBS e os tratamentos foram adicionados (150 µL) em concentração equivalente a 5-1x a CIM de cada composto.

Após 24h de incubação, 100 µL de cristal violeta 0,05% foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Então, o cristal violeta foi removido e os poços foram novamente lavados com PBS e deixados para secar naturalmente. A extração do cristal violeta ocorreu pela adição de 300 µL de ácido acético 30% (v/v) em temperatura ambiente e nova incubação por 30 minutos. A leitura da placa foi realizada com auxílio de um leitor em absorvância de 562nm.

Ambos os experimentos foram realizados em triplicata experimental e biológica. Os resultados foram expressos como média da triplicata biológica.

4. Resultados e Discussão

4.1 Complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) é ativo contra espécies de micobactérias não tuberculosas

O complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) foi testado e mostrou-se ativo contra cepas de *M. abscessus*, *M. abscessus* subespécie *massiliense*, *M. abscessus* subespécie *bolletti* e *M. fortuitum*. Os resultados encontrados encontram-se na **Tabela 1**.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) do Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) frente a cepas de Micobactérias não Tuberculosas. Valores expressos em µg/ml.

	<i>M. abscessus abscessus (ATCC)</i>	<i>M. abscessus abscessus</i>	<i>M. abscessus bolletti</i>	<i>M. abscessus massiliense</i>	<i>M. fortuitum</i>
Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$)	31,25	31,25	31,25	7,81	7,81
Amicacina	7,81	7,81	7,81	0,98	N/D

4.2 Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) age sinergicamente a amicacina contra isolados clínicos de *M. abscessus* e *M. abscessus* subs. *bolletti*

O tratamento das doenças causadas por MNT é, por vezes, mais complicado do que o da tuberculose, já que existe um nível significativo de heterogeneidade da resposta dos pacientes, e pode se estender por mais de 18 meses (GRIFFITH et al., 2012a; GOPALASWAMY et al., 2020). O tratamento indicado pelo Ministério da Saúde para casos de infecção com *M. abscessus* *abscessus*, *M. abscessus* *massiliense* e *M. abscessus* *bolletti* é constituído por uma fase de ataque (1-3 meses) com a administração de amicacina injetável, tigeciclina, imipenem ou ertapenem, claritromicina e clofazimina, seguida por uma fase de manutenção (12-18 meses) com amicacina inalatória, claritromicina, clofazimina e moxifloxacino. Para infecção com *M. fortuitum* a indicação é de uma fase de ataque (3 meses) com amicacina injetável, claritromicina e moxifloxacino, seguida por uma fase de manutenção (12-18 meses) com claritromicina e moxifloxacino (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Uma cepa é considerada sensível a amicacina quando sua CIM é menor ou igual a 16 µg/mL e resistente quando CIM é maior ou igual a 64 µg/mL (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Buscando avaliar a sinergia entre o Complexo ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) e amicacina ambos compostos foram testados em conjunto no ensaio de *checkerboard*. Os resultados descritos na **Tabela 2** apontam que os compostos agiram em sinergia contra o isolado

clínico de *M. M. abscessus* subs. *bolletii* enquanto foi observada neutralidade na interação com a cepa padrão de *M. abscessus* (ATCC), o isolado clínico de *M. abscessus* e de *M. abscessus* subs. *massiliense*.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) do Complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) frente a cepas de Micobactérias não Tuberculosas. Valores expressos em µg/ml.

	CIM ₉₀ (µg/ml)		CIM quando combinados			
	[[Fe(phen) ₃] ²⁺]	Amicacina	[[Fe(phen) ₃] ²⁺]	Amicacina	ICIF	Resultado
<i>M. abscessus</i> (ATCC)	31,25	7,81	31,25	1,00	1,13	Neutro
<i>M. abscessus</i>	31,25	7,81	8,00	2,00	0,51	Neutro
<i>M. abscessus bolletii</i>	31,25	16,00	4,00	1,00	0,19	Sinérgico
<i>M. abscessus massiliense</i>	7,81	0,98	1,00	0,50	0,64	Neutro

Fonte: autora.

O ensaio de *checkerboard*, é uma abordagem que permite avaliar a interação entre diferentes agentes antimicrobianos. A sinergia indica que a combinação dos dois compostos resultou em uma atividade antimicrobiana mais eficaz do que o esperado se considerássemos apenas os efeitos individuais de cada composto. Por outro lado, a neutralidade sugere que a combinação não teve efeito sinérgico ou antagonista notável contra as cepas específicas mencionadas.

Pela análise dos dados, podemos observar que para a cepa padrão de *M. abscessus*, não há diminuição na CIM do Complexo ([Fe(fen)₃]²⁺) enquanto a CIM da amicacina é reduzida em mais de 6x enquanto para os isolados clínicos houve redução em ambas as concentrações, mesmo que a sinergia tenha ocorrido apenas para o isolado de *M. abscessus* subs. *bollettii*.

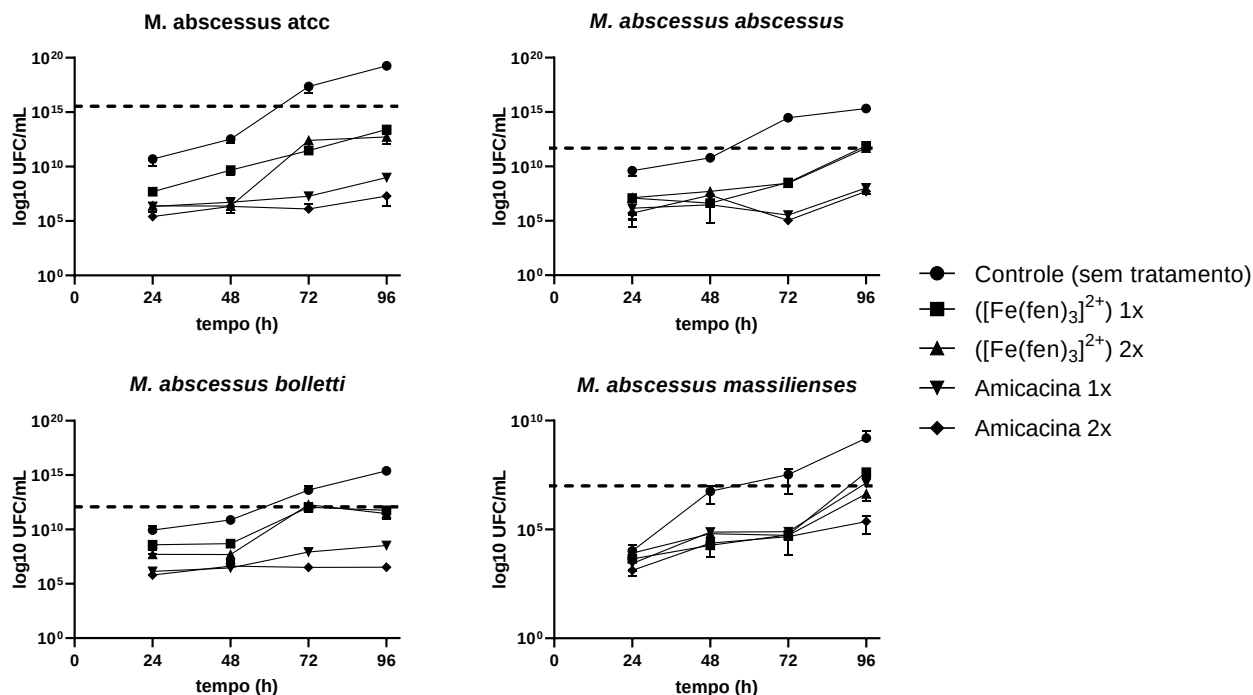
O tratamento de infecções por bactérias do complexo *M. abscessus* pode envolver uma combinação de antibióticos, frequentemente por longos períodos. No entanto, a resistência intrínseca a muitos antibióticos e a capacidade de formar biofilmes podem tornar o tratamento desafiador, e a abordagem terapêutica pode variar com base na subespécie e na suscetibilidade aos medicamentos. *M. abscessus* subespécie *massiliense* é notável por sua maior suscetibilidade a alguns antibióticos em comparação com outras subespécies enquanto assim como outras subespécies, *M. abscessus* subespécie *bollettii* pode apresentar resistência a antibióticos, tornando o tratamento mais complexo (GRIFFITH et al., 2012a, 2012b; BRYANT et al., 2016)

4.3 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ é bactericida contra a cepa padrão e isolados clínicos de MNT

Os ensaios de cinética bacteriana permitem o estudo da farmacodinâmica de antibióticos, examinando as taxas nas quais diferentes concentrações de um antibiótico matam bactérias; a atividade concentração e tempo-dependentes do tempo de agentes antimicrobianos como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas ou β -lactâmicos e macrolídeos podem ser estudados usando esta metodologia. O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ nesse contexto utilizando duas concentrações distintas e amicacina como antibiótico de controle.

Os resultados obtidos encontram-se representados na escala logarítmica em valores de UFC/mL e podem ser observados nos gráficos da **Figura 2**. Não há diferença significativa na curva de crescimento bacteriana quando as concentrações de ambos compostos testados são aumentadas. A amicacina mostrou-se um antibiótico potente contra a cepa padrão e os isolados clínicos testados. Tratando-se do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, frente a cepa padrão ATCC de *M. abscessus*, há uma diminuição superior a 5 logs em relação ao grupo sem tratamento, o que aponta para um comportamento bactericida nessa condição. A diminuição da carga bacteriana frente aos isolados clínicos de *M. abscessus* e *M. abscessus* subs. *bolletti* é menor mas se mantém superior a 3 logs, caracterizando o perfil bactericida do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ frente a essas cepas. Já frente a *M. abscessus* subs. *massiliense*, a redução é de aproximadamente 2 logs, caracterizando um perfil bacteriostático.

Figura 2 – Efeito do Complexo Cinética ($[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$) sobre a cinética bacteriana *in vitro*



Fonte: autora.

4.4 Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ não tem atividade contra biofilmes de MNT

O Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ foi testado frente a biofilmes de MNT em duas situações: em sua formação e quando já maduros e não foi capaz de reduzir ou romper suas estruturas em nenhuma delas. A formação de biofilmes é uma característica importante de MNT, sendo *M. abscessus* muitas vezes utilizada como modelo bacteriano para estudos dessa categoria. No entanto, nas condições e concentrações testadas, não foi observada atividade do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$.

5. Conclusão

Os resultados desta pesquisa destacam o potencial do Complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ como um agente antimicrobiano ativo contra micobactérias não tuberculosas (MNT). Inicialmente, o complexo mostrou atividade contra diferentes cepas de MNT, incluindo *M. abscessus*, *M. abscessus* subespécie *massiliense*, *M. abscessus* subespécie *bolletii* e *M. fortuitum*.

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

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

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

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

Referências

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

em: 14 set. 2022.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HUSSAIN, T. Leprosy and tuberculosis: an insight-review. **Critical reviews in microbiology**, v. 33, n. 1, p. 15–66, jan. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17453929>. Acesso em: 7 mar. 2024.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<https://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2458-10-612>.

Acesso em: 12 jan. 2024.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

p. 21–54, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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