

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

DÉBORA LEITE CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E BUSCA DO MECANISMO
DE AÇÃO DE HIDRAZONAS FRENTE AO *Mycobacterium
tuberculosis***

ARARAQUARA - SP
2018

Débora Leite Campos

“Avaliação da atividade e busca do mecanismo de ação de hidrazonas frente ao *Mycobacterium tuberculosis*”

Dissertação 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 Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Bacteriologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan.

Araraquara
2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C198a Campos, Débora Leite
Avaliação da atividade e busca do mecanismo de ação de hidrazonas frente ao
Mycobacterium tuberculosis / Débora Leite Campos. – Araraquara, 2018.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – 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: Rogério Fernando Pavan.

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

CAPES: 40300005

DÉBORA LEITE CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E BUSCA DO MECANISMO DE AÇÃO DE HIDRAZONAS FRENTE
AO *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre(a) em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA.

Araraquara, 29 de junho de 2018.

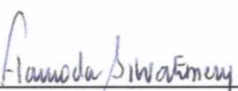
BANCA EXAMINADORA



FERNANDO ROGÉRIO PAVAN (Orientador)



JEAN LEANDRO DOS SANTOS



FLAVIO DA SILVA EMERY

Dedico este trabalho de Dissertação ao meu
filho Theo, por me mostrar que sou muito mais
forte do que poderia imaginar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser minha força e fortaleza e por nos deixar a seguinte mensagem: “Jesus olhou para os discípulos e disse: para os homens isso é impossível, mas para Deus tudo é possível. Eis que eu estou com vocês todos os dias, até o fim do mundo” (Mateus 19,26;28,20).

Agradeço à minha família, por ser minha base e inspiração; aos meus amigos de longa data, por tornarem a jornada mais leve e ao meu amor, por dividir cada momento comigo.

Agradeço aos amigos de laboratório que me auxiliaram na execução dos experimentos, na análise de resultados, na escrita do trabalho e que compartilharam comigo tantos momentos de alegria, dificuldade e sucesso.

Agradeço à CAPES, pela bolsa concedida para execução deste trabalho.

Capítulo I

RESUMO

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que possui como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis* e que levou ao óbito, em 2016, 1,3 milhões de pessoas ao redor do mundo. Seu tratamento, recomendado pela Organização Mundial da Saúde, constitui-se da utilização de quatro antimicrobianos por, no mínimo, seis meses. Este esquema de tratamento apresenta variados efeitos adversos que levam o paciente a abandonar a terapia logo no início do desaparecimento dos sintomas, levando ao surgimento de cepas resistentes. As infecções provocadas por cepas resistentes aos fármacos vêm aumentando com o passar dos anos, o que se tornou um dos maiores problemas para o controle da doença. Dessa forma, é essencial a busca por novos candidatos a fármacos, com o objetivo de diminuir o tempo de tratamento e a disseminação de cepas resistentes. Em um estudo prévio do grupo, foram sintetizados compostos da classe das hidrazonas que mostraram interessante atividade contra o *M. tuberculosis*. Nesse trabalho, aprofundamos o estudo de quatro dessas moléculas, numeradas como 14, 15, 16 e 18. Os resultados obtidos indicaram a molécula 14 (C₁₆H₁₅O₂N₃) como a mais promissora, apresentando o menor valor de concentração inibitória mínima (CIM₉₀) de 0,35 µg/mL frente a cepa padrão sensível aos antibióticos em estado ativo de replicação e 1,78 µg/mL quando em estado não-replicante. Além disso, apresentou um perfil bactericida e atividade intramacrofágica. Frente às células eucarióticas, a hidrazona 14 não apresentou toxicidade, com índices de citotoxicidade (IC₅₀) maiores que 100 µg/mL em quase todos os tempos de tratamento e altos índices de seletividade (IS), além de apresentar um estreito espectro de atividade. Assim, a hidrazona 14 foi selecionada como o composto líder, tendo sido levada para os experimentos de busca de mecanismo de ação. Nesse caminho, utilizamos técnicas que poderiam demonstrar inibição de síntese de ácidos micólicos, presentes na parede celular e/ou ação na inibição das bombas de efluxo presente no envelope celular bacteriano. Os resultados obtidos sugerem que nenhum desses mecanismos fenotípicos é o meio pelo qual o fármaco age no microrganismo. Dessa forma, novos ensaios serão necessários para desvendar o mecanismo de ação desempenhado por esta hidrazona.

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

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. In 2016, was the cause of death of 1.3 million people around the world. Its treatment, recommended by the World Health Organization, consists of the use of four antibiotics for at least six months. This treatment regimen has several adverse effects that lead the patient to abandon the therapy at the beginning of the disappearance of the symptoms, which leads to the emergence of resistant strains. Infections caused by drug-resistant strains have been increasing over the years, which has become one of the major problems in controlling the disease. Because of that, the search for new compounds occurs with the objective of reducing the time of treatment and inhibiting the growth of resistant strains. In a previous study of the group, compounds of the class of hydrazones that showed interesting activity against *M. tuberculosis* were synthesized. In this work, we investigated four of these molecules, numbered as 14, 15, 16 and 18. The results indicated that hydrazone 14 (C₁₆H₁₅O₂N₃) was the most promising molecule because it presented the lowest minimum inhibitory concentration (MIC₉₀) of 0.35 µg/mL against H₃₇Rv strain, in active replication state and 1.78 µg/mL when in non-replicating state. In addition, it presented a bactericidal and intramacrophagic activity. In the cytotoxicity assays, hydrazone 14 presented no cytotoxicity (IC₅₀) in all treatment times and high selectivity index (IS), as well as presenting a narrow spectrum of activity and, therefore, presents itself as the most promising molecule. Therefore, this hydrazone was investigated about its mechanism of action. Therefore, it was used techniques that could demonstrate the inhibition of the synthesis of mycolic acids presents in the cell wall and / or action in the inhibition of the efflux pumps presents in the bacterial cell envelope. The obtained results showed that this hydrazone act by none of this mechanisms. Thus, new experiments are necessary to discover the mechanism of action by this molecule.

Key-works: *Mycobacterium tuberculosis*, hydrazones, tuberculosis.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Número de novos casos estimados em 2016.....	13
Figura 2. Imagem esquemática representando a estrutura da membrana e parede celular micobacteriana.....	14
Figura 3. Estrutura química dos ácidos micólicos presentes na parede celular do <i>M. tuberculosis</i>	15
Figura 4. Representação esquemática da transmissão e patogenia da TB.....	16
Figura 5. Estrutura e massa molecular dos quatro antibióticos utilizados no tratamento da TB.....	17
Figura 6. Etapas de análise das hidrazonas.....	23
Figura 7. Curvas de crescimento bacteriano em condições de oxigenação (A) e de hipóxia (B). As flechas indicam a mudança de metabolismo para NPR-1 e NPR-2 (estados não-replicantes 1 e 2).....	26
Figura 8. Placa de cultivo exemplificando as placas de lise formadas por fagos em seu ciclo lítico.....	31
Figura 9. Mecanismo de ação da isoniazida. Metabolização por KatG e inibição enzimática de InhA.....	34
Gráfico 1. Índice de citotoxicidade (IC ₅₀) das moléculas hidrazonas e isoniazida (INH) frente linhagem celular macrofágica, J774A.1. Concentração máxima testada de 100 µg/mL. Análise estatística por Prisma 5.0: Two-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. *= diferença estatística significativa com relação ao tratamento com INH no mesmo tempo de tratamento.....	36
Gráfico 2. Índice de citotoxicidade (IC ₅₀) das moléculas hidrazonas e isoniazida (INH) frente linhagem celular de fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5). Concentração máxima testada de 100 µg/mL. Análise estatística por Prisma 5.0: Two-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. *= diferença estatística significativa com relação ao tratamento com INH no mesmo tempo de tratamento.....	37
Gráfico 3. Cinética bacteriana da hidrazona 14 e controles de crescimento bacteriano, e de fármacos RFP (rifampicina) e INH (isoniazida). a= contagem bacteriana estatisticamente diferente do controle no mesmo dia (p<0,05). Análise estatística: Prisma 5.0, one-way ANOVA com pós-teste <i>Newman-keuls</i> . Os resultados são apresentados como média e erro padrão de três ensaios independentes.....	40
Gráfico 4. Cinética bacteriana da hidrazona 15 e controles de crescimento bacteriano e de fármacos RFP (rifampicina) e INH (isoniazida). a= contagem bacteriana estatisticamente	

diferente do controle no mesmo dia ($p < 0,05$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de três ensaios independentes.....41

Gráfico 5. Cinética bacteriana da hidrazona 16 e controles de crescimento bacteriano, e de fármacos RFP (rifampicina) e INH (isoniazida). a= contagem bacteriana estatisticamente diferente do controle no mesmo dia ($p < 0,05$); b= contagem bacteriana estatisticamente diferente da INH no mesmo dia ($p < 0,05$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de três ensaios independente.....42

Gráfico 6. Cinética bacteriana da hidrazona 18 e controles de crescimento bacteriano, e de fármacos RFP (rifampicina) e INH (isoniazida). a= contagem bacteriana estatisticamente diferente do controle no mesmo dia ($p < 0,05$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de três ensaios independentes.....43

Gráfico 7. Atividade intramacrofágica da hidrazona 14 ($CIM_{90} = 0,35 \mu\text{g/mL}$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os valores de inibição são apresentados como média e erro padrão de dois ensaios independentes.....44

Gráfico 8. Atividade intramacrofágica da hidrazona 14 em maiores concentrações ($CIM_{90} = 0,35 \mu\text{g/mL}$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os valores de inibição são apresentados como média e erro padrão de dois ensaios independentes.....45

Gráfico 9. Atividade intramacrofágica da hidrazona 16 ($CIM_{90} = 1,82 \mu\text{g/mL}$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os valores de inibição são apresentados como média e erro padrão de dois ensaios independentes.....46

Gráfico 10. Atividade intramacrofágica da hidrazona 18 ($CIM_{90} = 5,30 \mu\text{g/mL}$). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os valores de inibição são apresentados como média e erro padrão de dois ensaios independentes.....47

Figura 10. CCD dos ácidos micólicos extraídos após tratamento. Da esquerda para di padrão, RFP, INH, ETA, ETH, controle não tratado e hidrazona 14.....48

Gráfico 11. Gráfico da fluorescência relativa do brometo de etídio com relação ao tempo para avaliação da atividade com relação a inibição de bombas de efluxo. *= momento em que se inicia a diferença estatística significativa do controle e da hidrazona 14 com relação ao verapamil (18min). Análise estatística: Prima 5.0, one-way ANOVA com pós-teste *Newman-keuls*. Os resultados são apresentados como média e erro padrão de triplicata técnica.....50

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Hidrazonas derivadas da molécula de INH: nome, estrutura e massa molecular (MM), valores de LogP, concentração inibitória mínima (CIM₉₀) frente *M. tuberculosis* H₃₇Rv, índice de citotoxicidade (IC) frente células macrofágicas J774A.1 e índice de seletividade (IS).....21
- Tabela 2.** Resultados da concentração inibitória mínima (CIM₉₀) frente cepa sensível de *M. tuberculosis* H₃₇Rv em estado metabólico ativo (REMA) e não-replicante (LORA). Valores apresentados como média e desvio padrão (M ± DP) de três ensaios independentes em µg/mL e µM.....32
- Tabela 3.** Resultados de índice de seletividade (IS) obtidos para as hidrazonas e isoniazida nos testes de citotoxicidade em 24h, 48h e 72h frente as linhagens celulares de macrófagos murinos (J774A.1) e fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5).....38
- Tabela 4.** Resultados da atividade frente diferentes cepas bacterianas Gram positivas e negativas, cálculo da concentração inibitória de 90% (CIM₉₀). Valores apresentados como média (M) e desvio padrão (DP) de três ensaios independentes em µg/mL.....39
- Tabela 5.** Resumo geral da atividade das hidrazonas em todos testes executados.....47
- Tabela 6.** Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente a cepas de *M. smegmatis* mc²155 (ATCC 700084). Valores apresentados como média (M) ± desvio padrão (DP) de três ensaios independentes.....51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. TUBERCULOSE.....	13
1.2. <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	14
1.3. TRANSMISSÃO E PATOGENIA.....	15
1.4. TRATAMENTO.....	17
1.5. NOVOS FÁRMACOS.....	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVO GERAL.....	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. SÍNTESE DAS HIDRAZONAS.....	23
3.2. CEPAS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	24
3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM ₉₀) FRENTE AO <i>M. TUBERCULOSIS</i> EM ESTADO METABÓLICO ATIVO.....	24
3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM ₉₀) FRENTE AO <i>M. TUBERCULOSIS</i> EM ESTADO NÃO-REPLICANTE, EM HIPÓXIA.....	25
3.5. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CITOTOXICIDADE (IC ₅₀) FRENTE CÉLULAS MACRÓFÁGICAS (J774A.1) E FIBROBLASTOS PULMONARES (MRC-5).....	27
3.6. CINÉTICA BACTERIANA.....	27
3.7. ATIVIDADE INTRAMACROFÁGICA.....	28
3.8. ESPECTRO DE ATIVIDADE.....	28
3.9. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÁCIDOS MICÓLICOS - CCD.....	29
3.10. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO.....	30
3.11. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE SÍNTESE DE PROTEÍNAS.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM ₉₀) FRENTE AO <i>M. TUBERCULOSIS</i> EM ESTADO METABÓLICO ATIVO E NÃO-REPLICANTE.....	32
4.2. RESULTADOS DE ÍNDICE DE CITOTOXICIDADE (IC ₅₀) FRENTE CÉLULAS MACROFÁGICAS E FIBROBLASTOS PULMONARES EM 24, 48 E 72 HORAS.....	35
4.3. ESPECTRO DE ATIVIDADE.....	38
4.4. CINÉTICA BACTERIANA.....	39
4.5. ATIVIDADE INTRAMACROFÁGICA.....	44
4.6. DETERMINAÇÃO DO COMPOSTO LÍDER.....	47
4.7. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE ÁCIDOS MICÓLICOS – CCD.....	48
4.8. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO.....	49
4.9. RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE PROTEÍNAS.....	50
5. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença crônica, provocada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), que possui como foco principal de infecção o tecido pulmonar, mas que pode se disseminar pelo organismo e se apresentar em outros órgãos, na chamada tuberculose extrapulmonar. Seu diagnóstico pode ser obtido por meio de cultura oriunda de amostra obtida do paciente além de testes imunológicos e genéticos (LEE, 2015).

Essa infecção, causada por um único agente infeccioso, é hoje a doença que mais mata no mundo, superando a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Em números, excluindo-se os casos de morte de pacientes co-infectados, foram relatados 1,3 milhões de mortes em 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Na Figura 2, é possível observar a incidência de novos casos de TB ao redor do mundo em 2016. Podemos notar que as maiores taxas aparecem em países do continente africano e asiático, sendo que Índia, Indonésia, China, Filipinas e Paquistão estão entre os países que representam 53% do total de novos casos de TB em 2016, sendo que ao redor de todo mundo foram contabilizados 6,3 milhões de novos casos dos quais, estatisticamente, 16% irão a óbito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

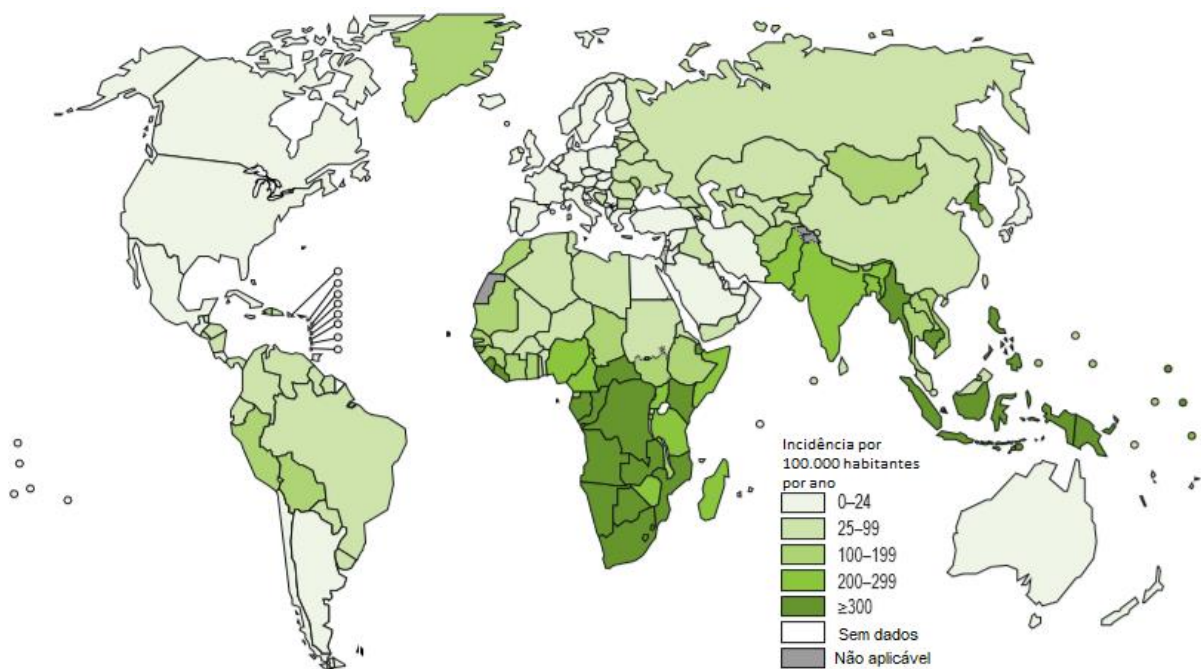


Figura 1. Número de novos casos estimados em 2016. Fonte: WHO, 2017.

1.2. *Mycobacterium tuberculosis*

Identificado por Robert Koch em 1882, o bacilo *M. tuberculosis* é o principal agente causador da TB. É um patógeno intracelular facultativo que possui a capacidade de sobreviver e se multiplicar dentro das células macrofágicas, podendo assim evadir da ação imunológica (DAFFÉ; ETIENNE, 1999; MIGLIORI et al., 2007).

De crescimento lento, com tempo de geração de aproximadamente 20 horas *in vitro* e *in vivo*, não apresenta características de membrana que a classifique como uma bactéria Gram-positiva ou negativa e é corada pela técnica de *Ziehl-Neelsen* por ser um bacilo álcool-ácido resistente (VASAVA et al., 2009; KOCH; MIZRAHI, 2018).

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

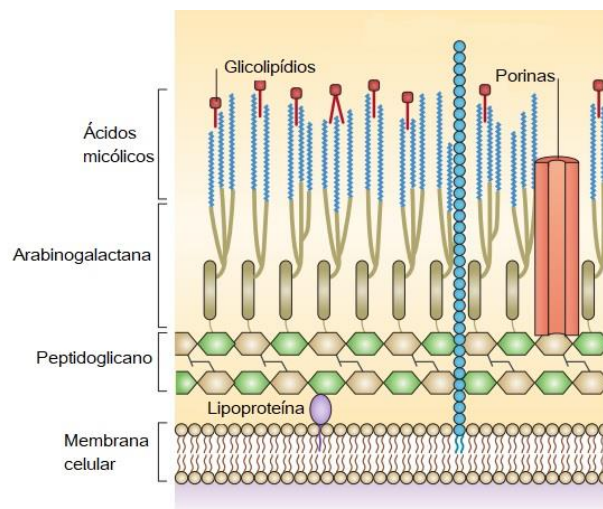


Figura 2. Imagem esquemática representando a estrutura da membrana e parede celular micobacteriana. (BROWN et al., 2015).

Como pôde-se observar na Figura 2, sua membrana e parede celular se apresentam em estrutura diferente das demais bactérias, principalmente pela presença dos ácidos micólicos e glicolipídeos na região externa (QUIGLEY et al., 2017).

Esses ácidos micólicos se ligam à camada de arabinogalactano e esta ao peptidoglicano, que é associado à membrana por meio das lipoproteínas. No *M. tuberculosis*, são encontrados três diferentes tipos de ácidos micólicos, os alfa, ceto e metoxi-ácidos micólicos, apresentados na Figura 3 (BROWN et al., 2015; JANKUTE et al., 2015).

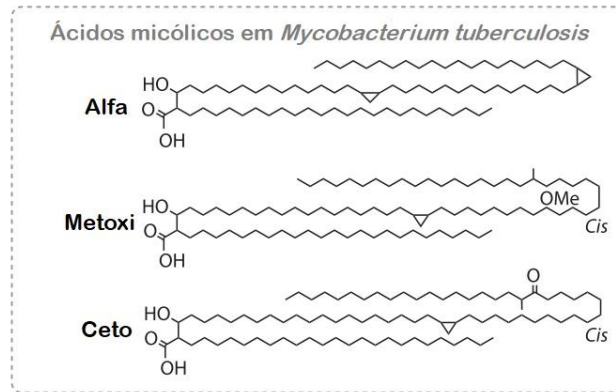


Figura 3. Estrutura química dos ácidos micólicos presentes na parede celular do *M. tuberculosis* (JANKUTE et al., 2015).

Vários antimicrobianos utilizados na terapia possuem como mecanismo de ação a inibição da síntese de alguma porção da membrana ou parede celular micobacteriana, o que demonstra sua grande importância. Dentre os mais utilizados estão a isoniazida (INH), o etambutol (ETH) e a etionamida (ETA) (BELISLE et al., 1997; JANKUTE et al., 2015).

Intrínseco ao bacilo é a resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, por apresentar em sua parede as enzimas β -lactamases, responsáveis pela inativação dessas estruturas. Não apresenta mecanismos de transferência genética horizontal e nenhum plasmídeo é conhecido (DAFFÉ; ETIENNE, 1999; KOCH; MIZRAHI, 2018).

Outro mecanismo de resistência dessas bactérias e presente em sua parede são as bombas de efluxo. Nos últimos anos foram identificadas bombas de efluxo em *M. tuberculosis* pertencentes às superfamílias ABC (*ATP binding cassette superfamily*), MFS (*major facilitator superfamily*) e SMR (*small multidrug resistance*). Essas bombas acabam por exocitar de maneira aleatória os antimicrobianos de seu citoplasma e, dessa maneira, inibem sua ação (VAN BAMBEKE, 2003; BALGANESH et al., 2012).

1.3. Transmissão e Patogenia

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

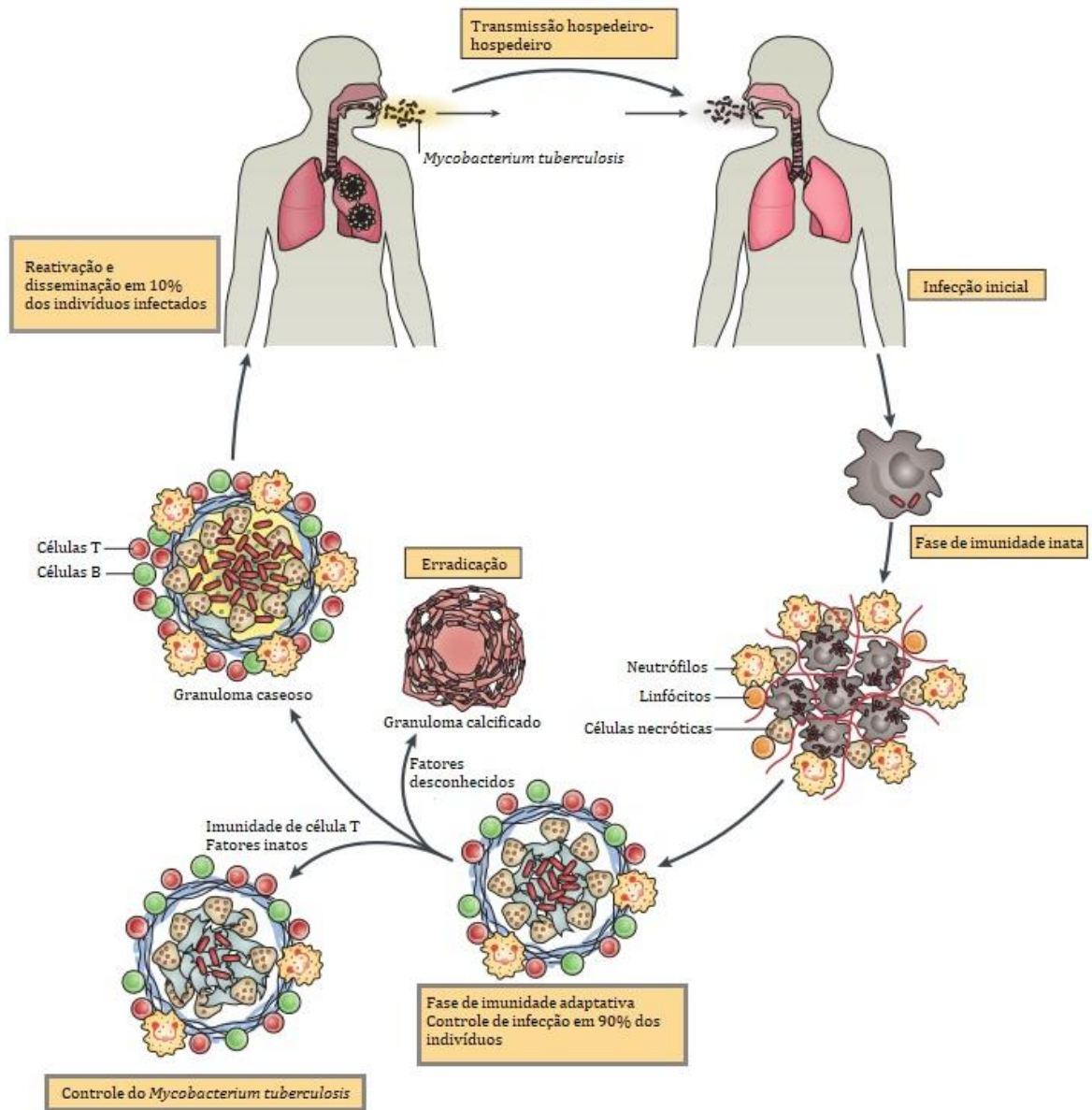


Figura 4. Representação esquemática da transmissão e patogênese da TB. Fonte: Nature Reviews (NUNES-ALVES et al., 2014).

Neste momento, as células imunológicas presentes no tecido, principalmente os macrófagos alveolares, promoverão a fagocitose do bacilo e, dependendo da capacidade imunológica do indivíduo, a infecção poderá ser limitada ou não (NUNES-ALVES et al., 2014).

Em indivíduos imunocompetentes, o sistema imunológico promoverá um controle da infecção, que permanecerá em um estado dormente e assintomático, chamada nesses casos de tuberculose latente (TBL), que ocorre em aproximadamente 90-95% dos casos de infecção e

acomete um terço da população mundial (SCHOREY; SCHLESINGER, 2016; NILLER et al., 2017; TANG; JOHNSTON, 2017; TURNER et al., 2017).

Essa situação se dá devido a formação de granulomas - constituídos por células imunológicas que isolam e buscam esterilizar o tecido – que mantém a bactéria em estado de hipóxia, impossibilitando-a de se multiplicar (VOSKUIL et al., 2003; SCHOREY; SCHLESINGER, 2016; NILLER et al., 2017; PEDDIREDDY; DODDAM; AHMED, 2017; TANG; JOHNSTON, 2017).

Porém, em aproximadamente 10% dos casos, em indivíduos imunocomprometidos ou por declínio da imunidade, a doença se manifesta. Os granulomas, que anteriormente continham a disseminação do bacilo, agora se tornam locais com alta concentração micobacteriana e que, na maioria das vezes, não sofre com a ação dos medicamentos. Além disso, o *M. tuberculosis* é capaz de burlar o sistema imunológico, sobrevivendo e se multiplicando dentro das células macrofágicas (VOSKUIL et al., 2003; SCHOREY; SCHLESINGER, 2016).

1.4. Tratamento

Hoje, o tratamento padrão preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) constitui-se da utilização concomitante de quatro antimicrobianos: rifampicina (RFP), etambutol (ETH), pirazinamida (PZA) e isoniazida (INH), administrados em única dose, uma vez ao dia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Na Figura 5 a seguir, são apresentados estes antimicrobianos utilizados na terapia.

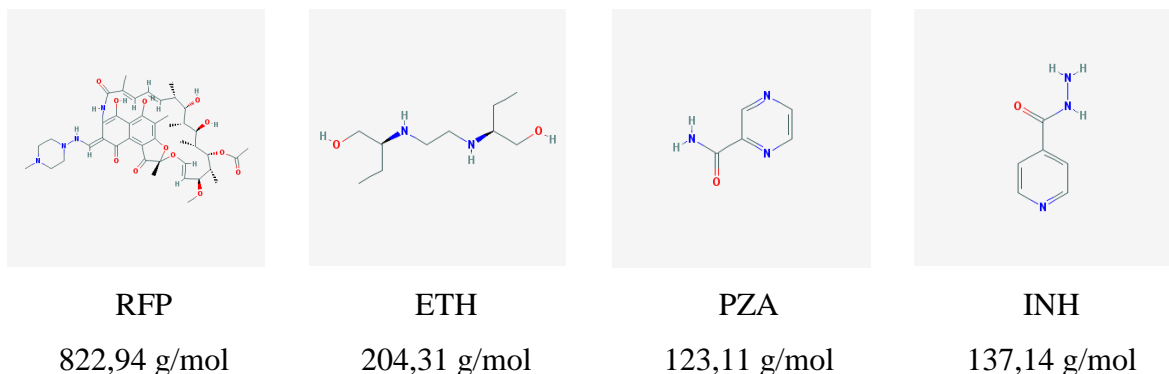


Figura 5. Estrutura e massa molecular dos quatro antibióticos utilizados no tratamento da TB. Fonte: Pubchem.

A RFP atua inibindo a síntese de proteínas através da inibição da atividade da enzima RNA-polimerase, impedindo a transcrição do RNA mensageiro. Possui um amplo espectro de atividade contra cepas gram-positivas e negativas. Uma característica importante se relaciona com sua ação indutora sobre as isoenzimas do citocromo P450, principalmente de *CYP3A4*, provocando diversas interações medicamentosas (ALLIANCE et al., 2008).

O ETH é um inibidor de enzimas arabinosil transferases, envolvidas na biossíntese da parede celular. Devido ao seu mecanismo de ação, apresenta atividade bacteriostática frente bactérias não-replicantes, bactericida contra bacilos replicantes, além de atividade intramacrofágica. Seu espectro de ação é estreito e seus efeitos adversos mais comuns são hepatotoxicidade e neuropatia ótica (ALLIANCE et al., 2008; CHAMBERLAIN et al., 2017; DIAS-FREEDMAN et al., 2017; LARSEN et al., 2017).

A PZA é um pró-fármaco, que atravessa a membrana da micobactéria por difusão passiva e que, no citoplasma, é transformada em ácido pirazinóico (POA). O POA promove acidificação do meio intracelular, alterando as características de permeabilidade e transporte da membrana, provocando dano celular além de interagir com enzimas ligadas a fase de tradução da síntese de proteínas, inibindo sua síntese. O espectro de atividade da PZA é restrito, agindo apenas contra o gênero das micobactérias e seus efeitos adversos mais comuns são hepatotoxicidade e hiperuricemia (ALLIANCE et al., 2008; SHEEN et al., 2013; PICHHOLIYA et al., 2016; GUO et al., 2017).

A INH inibe a síntese dos ácidos micólicos presentes na parede celular das micobactérias através da inibição da enzima *InhA*. Para exercer sua função, precisa sofrer metabolização prévia de uma enzima catalase-peroxidase chamada *KatG*, sendo também um pró-fármaco. Assim como o ETH, também possui atividade bactericida contra micobactérias em estado ativo e ação bacteriostática para aquelas não-replicantes. Possui espectro de atividade restrito ao gênero *Mycobacterium* e apresenta efeitos adversos relacionados com xerostomia, reações alérgicas, hepatotoxicidade, metemoglobinemia, entre outros (ALLIANCE et al., 2008; PINHEIRO et al., 2014).

Apesar de funcional, este esquema atual de tratamento ainda é longo, totalizando 6 meses para sua conclusão, quando se obtém sucesso. Esse período extenso compromete a adesão do paciente que, por muitas vezes, acaba abandonando o tratamento devido ao tempo e aos efeitos adversos relacionados, principalmente a hepatotoxicidade provocada por todos os antimicrobianos (CHINTA et al., 2016).

Com o objetivo de melhorar a adesão ao tratamento, em 1993 a OMS elaborou e recomendou a metodologia do Tratamento Diretamente Observado (TDO), que visa promover

a adesão ao tratamento através da informação ao paciente sobre sua real situação e da visualização das administrações diárias, principalmente na primeira fase da terapia. No Brasil, onde a taxa de abandono chega a ser maior que 5% e que, em 2016, notificou mais de 82 mil novos casos de TB, a implementação da TDO tem funcionado como um meio para aumentar a taxa de sucesso do tratamento que, ainda em 2016, chegou apenas a 71% (BERALDO et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

O abandono do tratamento pode levar à seleção de cepas resistentes e assim, o mesmo se altera e prologa ainda mais, por no mínimo dois anos. Nos casos de resistência, as cepas podem ser classificadas como MDR-TB ou XDR-TB. As MDRs-TB ou cepas multidrogas-resistentes apresentam resistência à RFP e INH e, nestes casos, são utilizados para o tratamento os fármacos de segunda linha, que incluem as classes de antibióticos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. As XDRs-TB, cepas extensivamente resistentes, apresentam resistência à RFP, INH e algum medicamento das classes dos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas e seu tratamento é bastante complexo, não havendo ainda qualquer regime de tratamento padrão preconizado para estes casos (ALLIANCE et al., 2008; DA SILVA et al., 2011; PRASAD; SRIVASTAVA, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Durante a terapia de cepas XDR-TB são utilizados diferentes esquemas de tratamento, nos quais diversos antimicrobianos são associados sem que haja um modelo padrão a ser seguido. O que se preconiza é a utilização de seis antimicrobianos na fase intensiva de tratamento seguido pelo uso de quatro na fase de manutenção, além disso a utilização da bedaquilina e de fluoroquinolonas de última geração têm mostrado uma melhora nos resultados dos tratamentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

1.5. Novos fármacos

Os últimos fármacos implementados para a terapia de TB, após 60 anos, foram a bedaquilina e a delamanida, que são utilizadas apenas para o tratamento de cepas resistentes. A bedaquilina atua inibindo a ATP sintase micobacteriana, sendo o único fármaco que possui como alvo o metabolismo energético da micobactéria e a delamanida atua inibindo a síntese de ácidos micólicos (DA SILVA et al., 2017; MIGLIORI et al., 2017)

Um dos principais motivos para a busca de novos fármacos se dá por causa da resistência aos antibióticos manifestada pelos bacilos através de diversos mecanismos, sendo os principais mutações em genes relacionados com o alvo farmacológico como, por exemplo, mutações nos

genes *inhA* e *katG* que promovem resistência a INH; mutações em *rpoB* promovem resistência a RFP; em *pncA*, resistência a PZA entre tantos outros (MIOTTO et al., 2017).

Além dos mecanismos de resistência relacionados diretamente com mutações nos alvos farmacológicos destes antimicrobianos citados, o *M. tuberculosis* também consegue impedir a atividade dos fármacos através da ação das bombas de efluxo presentes em sua membrana. Essas bombas, como dito previamente, são capazes de expulsar os fármacos de seu citoplasma, de maneira específica ou não, inibindo sua ação. Para evitar esse mecanismo, novos fármacos ou associações de fármacos inibidores dessas bombas serão necessárias no combate à resistência bacilar (DA SILVA et al., 2011; DE KNEGT et al., 2017).

Um novo fármaco ideal para o tratamento da TB será um composto capaz de eliminar o bacilo em condições extra e intracelulares, em replicação ativa ou em estado não-replicante, que atue contra cepas resistentes, com alto potencial de penetração além de não apresentar toxicidade celular, exibir estreito espectro e que seja efetivo em um curto período de tempo (BHAT et al., 2017).

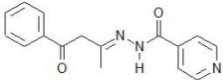
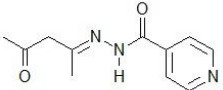
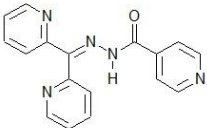
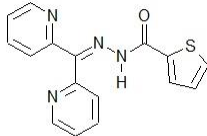
Com esse objetivo, o desenvolvimento de novos compostos que atuem contra o *M. tuberculosis* tem ocorrido de maneira planejada, utilizando-se estruturas químicas conhecidas e funcionais como precursoras para novas moléculas, sendo a INH uma das mais utilizadas (FERRARESI-CUROTTO et al., 2017; HU et al., 2017).

A química medicinal, portanto, vem de encontro às necessidades biológicas para o desenvolvimento de moléculas com potencial antimicrobiano. Na Tabela 1 abaixo, podemos observar as quatro hidrazonas em suas estruturas e nomes químicos, massa molecular e outras informações relevantes.

Essas hidrazonas foram previamente estudadas por Pavan e colaboradores e selecionadas por apresentarem grande capacidade de inibição do crescimento do bacilo em baixas concentrações, além de apresentarem um alto índice de seletividade quando testadas em células macrofágicas por 24h (PAVAN et al., 2010a).

Sendo a estrutura da INH uma hidrazida do ácido isonicotínico, podemos observar que as moléculas hidrazonas 14, 15 e 16 são estruturas baseadas na estrutura química de INH e apresentam diferenças após o grupamento hidrazida enquanto que a molécula 18 é uma modificação da estrutura da 16, que sofreu a substituição do anel piridínico, pertencente a estrutura da INH, pelo anel tiofeno.

Tabela 1. Hidrazonas derivadas da molécula de INH: nome, estrutura e massa molecular (MM), valores de cLogP, concentração inibitória mínima (CIM₉₀) frente *M. tuberculosis* H₃₇Rv, índice de citotoxicidade (IC₅₀) frente células macrofágicas J774A.1 e índice de seletividade (IS).

Estrutura molecular				
Nome	Monobenzoil cetona isonicotinoil hidrazona	Monoacetil cetona isonicotinoil hidrazona	N-(di(2-piridil) metileno) isonicotino hidrazida	N-(di(2-piridil) metileno) tiofeno-2-carbohidrazida
Referência	14	15	16	18
MM	281,31 g/mol	219,24 g/mol	303,32 g/mol	308,36 g/mol
cLogP*	1.65	0.10	2.58	3.17
MIC ₉₀	3,13 µg/mL	6,25 µg/mL	3,13 µg/mL	1,56 µg/mL
IC ₅₀	1250 µg/mL	1250 µg/mL	625 µg/mL	625 µg/mL
IS	399	200	200	401

Fonte: (PAVAN et al., 2010a); estruturas químicas: autor (BKchem) *=cLogP calculado em ChemBioDraw Ultra 14.0.

Portanto, compreendendo a situação da TB no mundo, o ciclo patogênico da doença e todas as formas nas quais o bacilo se encontra durante a infecção *in vivo* (ativo, latente e intramacrofágico) e com o objetivo de responder às necessidades para a descoberta de novos fármacos (toxicidade, espectro de atividade e mecanismo de ação), as hidrazonas foram testadas frente ao *M. tuberculosis* em diferentes condições experimentais afim de se avaliar seus possíveis potenciais como novos fármacos bem como estudar seus mecanismos de ação.

5. CONCLUSÃO

A Tuberculose continua, a cada dia, provocando mortes ao redor de todo o mundo. Seu tratamento, apesar de efetivo, apresenta-se obsoleto frente às cepas resistentes e pode ser melhorado através do estudo de novos compostos e neste trabalho avaliamos a atividade das hidrazonas, compostos inovadores, sintetizados com base na estrutura química da isoniazida.

Após as análises iniciais, conseguimos verificar que todas essas hidrazonas apresentam atividade inibitória frente o *Mycobacterium tuberculosis* em seus dois principais estados metabólicos: replicante e não-replicante. Essa característica absolutamente vantajosa já nos dava indícios do potencial desses compostos, que foram capazes de inibir o bacilo de forma mais satisfatória que a INH, incapaz de inibir a bactéria não-replicante.

Após a avaliação da citotoxicidade e cálculo do IS pudemos determinar que as hidrazonas de número 14 e 16 seriam as mais promissoras do grupo, por apresentarem valores de IS > 10 e, ainda, efeito bactericida frente à micobactéria e estreito espectro de atividade.

Já frente as bactérias intramacrofágicas, a hidrazona 14 despontou, apresentando atividade similar à RFP, o que foi decisivo para que esta hidrazona fosse escolhida como composto líder e, assim, foi avaliada em seu mecanismo de ação.

Dessa forma, avaliamos a capacidade da hidrazona 14 em inibir o funcionamento das bombas de efluxo e a síntese dos ácidos micólicos e, em ambas metodologias, não encontramos resultados positivos da inibição.

Também realizamos avaliação da atividade inibitória da hidrazona 14 frente à cepa de *Mycobacterium smegmatis* para, posteriormente, avaliar sua capacidade em inibir a síntese de proteínas. Entretanto, esse composto não foi ativo, e o ensaio não pôde ser realizado.

Dessa forma, concluimos que a hidrazona 14 é um composto inovador, de excelente atividade antimicobacteriana, que apresenta um novo mecanismo de ação, diferente do apresentado pela INH e que supostamente age em estrutura exclusiva apresentada pelo *M. tuberculosis*, isso porque seu espectro de ação é estreito, não atuando inclusive frente à *M. smegmatis*, sendo seu alvo molecular uma estrutura não conservada entre as espécies bacterianas.

REFERÊNCIAS

- ALLIANCE, G.; DEVELOPMENT, T. B. D.; STREET, B.; YORK, N. Handbook of anti-tuberculosis agents. Introduction. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 88, n. 2, p. 85–86, 2008.
- ANDRADE, C. H.; PASQUALOTO, K. F. M.; ZAIM, M. H.; FERREIRA, E. I. Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 167–179, 2008.
- BALGANESH, M.; DINESH, N.; SHARMA, S.; KURUPPATH, S.; NAIR, A. V.; SHARMA, U. Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2643–2651, 2012.
- BELISLE, J. T.; VISSA, V. D.; SIEVERT, T.; TAKAYAMA, K.; BRENNAN, P. J.; BESRA, G. S. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. **Science**, v. 276, n. 5317, p. 1420–1422, 1997.
- BERALDO, A. A.; ANDRADE, R. L. de P.; ORFÃO, N. H.; SILVA-SOBRINHO, R. A. da; PINTO, É. S. G.; WYSOCKI, A. D.; BRUNELLO, M. E. F.; MONROE, A. A.; SCATENA, L. M.; VILLA, T. C. S. Adherence to tuberculosis treatment in Primary Health Care: perception of patients and professionals in a large municipality. **Escola Anna Nery**, v. 21, n. 4, p. 1–8, 2017.
- BHAT, Z. S.; RATHER, M. A.; MAQBOOL, M.; LAH, H. U.; YOUSUF, S. K.; AHMAD, Z. Cell wall: A versatile fountain of drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. July, p. 1520–1534, 2017.
- BROWN, L.; WOLF, J. M.; PRADOS-ROSALES, R.; CASADEVALL, A. Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 620–630, 2015.
- CALEFFI-FERRACIOLI, K. R.; AMARAL, R. C. R.; DEMITTO, F. O.; MALTEMPE, F. G.; CANEZIN, P. H.; SCODRO, R. B. L.; NAKAMURA, C. V.; LEITE, C. Q. F.; SIQUEIRA, V. L. D.; CARDOSO, R. F. Morphological changes and differentially expressed efflux pump genes in *Mycobacterium tuberculosis* exposed to a rifampicin and verapamil combination. **Tuberculosis**, v. 97, p. 65–72, 2016.
- CHAMBERLAIN, P. D.; SADAKA, A.; BERRY, S.; LEE, A. G. Ethambutol optic neuropathy. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 28, n. 6, p. 545–551, 2017.
- CHINTA, K. C.; SAINI, V.; GLASGOW, J. N.; MAZORODZE, J. H.; RAHMAN, M. A.;

REDDY, D.; LANCASTER, J. R.; STEYN, A. J. C. The emerging role of gasotransmitters in the pathogenesis of tuberculosis. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 59, p. 28–41, 2016.

CHO, S. H.; WARIT, S.; WAN, B.; HWANG, C. H.; PAULI, G. F.; FRANZBLAU, S. G. Low-oxygen-recovery assay for high-throughput screening of compounds against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1380–1385, 2007.

DA SILVA, P. B.; CAMPOS, D. L.; RIBEIRO, C. M.; DA SILVA, I. C.; PAVAN, F. R. New antimycobacterial agents in the pre-clinical phase or beyond: recent advances in patent literature (2001–2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 3, p. 269–282, 2017.

DA SILVA, P. E. A.; VON GROLL, A.; MARTIN, A.; PALOMINO, J. C. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1–9, 2011.

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

DE KNEGT, G. J.; VAN DER MEIJDEN, A.; DE VOGEL, C. P.; AARNOUTSE, R. E.; DE STEENWINKEL, J. E. M. Activity of moxifloxacin and linezolid against *Mycobacterium tuberculosis* in combination with potentiator drugs verapamil, timcodar, colistin and SQ109. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 3, p. 302–307, 2017.

DE STEENWINKEL, J. E. M.; DE KNEGT, G. J.; TEN KATE, M. T.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. A.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; BAKKER-WOUDENBERG, I. A. J. M. Time-kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2582–2589, 2010.

DEVASUNDARAM, S.; KHAN, I.; KUMAR, N.; DAS, S.; RAJA, A. The influence of reduced oxygen availability on gene expression in laboratory (H37Rv) and clinical strains (S7 and S10) of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Biotechnology**, v. 210, p. 70–80, 2015.

DIAS-FREEDMAN, I.; CHEN, C.; DIETZOLD, J.; DAUDELIN, I.; KAYA, F. crossm Ethambutol Partitioning in Tuberculous Efficacy. v. 61, n. 9, p. 1–12, 2017.

DOS SANTOS FERNANDES, G. F.; DE SOUZA, P. C.; MORENO-VIGURI, E.; SANTIVANEZ-VELIZ, M.; PAUCAR, R.; PÉREZ-SILANES, S.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; LAZZARATO, L.; FRUTTERO, R.; MAN CHIN, C.; DA SILVA, P. B.; CHORILLI, M.; SOLCIA, M. C.; RIBEIRO, C. M.; SILVA, C. S. P.; MARINO, L. B.; BOSQUESI, P. L.; HUNT, D. M.; DE CARVALHO, L. P. S.; DE SOUZA COSTA, C. A.; CHO, S. H.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; PAVAN, F. R.; DOS SANTOS, J. L. Design, Synthesis, and Characterization of N-Oxide-Containing Heterocycles with in Vivo Sterilizing

Antitubercular Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 8647–8660, 2017.
FERRARESI-CUROTTO, V.; ECHEVERRÍA, G. A.; PIRO, O. E.; PIS-DIEZ, R.; GONZÁLEZ-BARÓ, A. C. Synthesis and characterization of a series of isoniazid hydrazones. Spectroscopic and theoretical study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1133, p. 436–447, 2017.

FIELD, S. K. Bedaquiline for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Great promise or disappointment? **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 6, n. 4, p. 170–184, 2015.
GRAMEC, D.; MAŠI, L. P.; DOLENC, M. S. Bioactivation Potential of Thiophene Containing Drugs Bioactivation Potential of Thiophene Containing Drugs. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, p. 1344–1348, 2014.

GUO, H. li; HASSAN, H. M.; DING, P. ping; WANG, S. jie; CHEN, X.; WANG, T.; SUN, L. xin; ZHANG, L. yong; JIANG, Z. zhou. Pyrazinamide-induced hepatotoxicity is alleviated by 4-PBA via inhibition of the PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP pathway. **Toxicology**, v. 378, n. 17, p. 65–75, 2017.

HU, Y. Q.; ZHANG, S.; ZHAO, F.; GAO, C.; FENG, L. S.; LV, Z. S.; XU, Z.; WU, X. Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 133, p. 255–267, 2017.

JANKUTE, M.; COX, J. A. G.; HARRISON, J.; BESRA, G. S. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 405–423, 2015.

JOHANSEN, S. K.; MAUS, C. E.; PLIKAYTIS, B. B.; DOUTHWAITE, S. Capreomycin Binds across the Ribosomal Subunit Interface Using tlyA -Encoded 2'-O-Methylations in 16S and 23S rRNAs. p. 173–182, 2006.

JYOTI, M. A.; ZERIN, T.; KIM, T.-H.; HWANG, T.-S.; JANG, W. S.; NAM, K.-W.; SONG, H.-Y. In vitro effect of ursolic acid on the inhibition of Mycobacterium tuberculosis and its cell wall mycolic acid. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 33, p. 17–24, 2015.

KARTHIK, K.; MUNESWARAN, N. S.; MANJUNATHACHAR, H. V. Bacteriophages : Effective Alternative to Antibiotics. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 3, p. 1–7, 2014.

KOCH, A.; MIZRAHI, V. Mycobacterium tuberculosis. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 555–556, 2018.

LARSEN, E. M.; STEPHENS, D. C.; CLARKE, N. H.; JOHNSON, R. J. Ester-prodrugs of ethambutol control its antibacterial activity and provide rapid screening for mycobacterial hydrolase activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 19, p. 4544–4547, 2017.

LEE, J. Y. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 78, n. 2, p. 47–55, 2015.

LIANG, Y.; ZHU, L.; GAO, M.; ZHENG, Z.; WU, J.; ZHAN, X. Influence of Tween-80 on the production and structure of water-insoluble curdlan from *Agrobacterium* sp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 611–619, 2018.

MACHADO, D.; PIRES, D.; PERDIGÃO, J.; COUTO, I.; PORTUGAL, I.; MARTINS, M.; AMARAL, L.; ANES, E.; VIVEIROS, M. Ion channel blockers as antimicrobial agents, efflux inhibitors, and enhancers of macrophage killing activity against drug resistant mycobacterium tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–28, 2016.

MASAKI, S.; SUGIMORI, G.; OKAMOTO, A.; IMOSE, J.; HAYASHI, Y. Effect of Tween 80 on the Growth Mycobacterium avium Complex. **Journal of Microbiology and Immunology**, v. 34, n. 8, p. 653–663, 1990.

MC, S.; STRAINS, I. R. M. Complete Genome Sequences of a Mycobacterium smegmatis Laboratory. **Genome Announcements**, v. 3, n. 1, p. 1–2, 2015.

MIGLIORI, G. B.; LODDENKEMPER, R.; BLASI, F.; RAVIGLIONE, M. C. 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: The new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic? **European Respiratory Journal**, v. 29, n. 3, p. 423–427, 2007.

MIGLIORI, G. B.; PONTALI, E.; SOTGIU, G.; CENTIS, R.; D'AMBROSIO, L.; TIBERI, S.; TADOLINI, M.; ESPOSITO, S. Combined use of delamanid and bedaquiline to treat multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: A systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 341, 2017.

MIOTTO, P.; TESSEMA, B.; TAGLIANI, E CHINDELEVITCH, L.; STARKS, A.; EMERSON, C.; HANNA, D.; KIM, P.; LIWSKI, R.; ZIGNOL, M.; GILPIN, C.; NIEMANN, S.; DENKINGER, C.; FLEMING, J.; WARREN, R.; CROOK, D.; POSEY, J.; GAGNEUX, S.; HOFFNER, S.; RODRIGUES, C.; COMAS, I.; ENGELTHALER, D.; MURRAY, M.; ALLAND, D.; RIGOUTS, L.; LANGE, C.; DHEDA, K.; HASAN, R.; RANGANATHAN, UDK MCNERNEY, R.; EZEWUDO, M.; CIRILLO, D.; SCHITO, M.; KÖSER, C.; RODWELL, T. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug-resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Eur Respir J**, v. 50, 2017.

NARENDER, M.; JASWANTH, S. B.; UMASANKAR, K.; MALATHI, J.; RAGHURAM REDDY, A.; UMADEVI, K. R.; DUSTHACKEER, A. V. N.; VENKAT RAO, K.; RAGHURAM, R. A. Synthesis, in vitro antimycobacterial evaluation and docking studies of some new 5,6,7,8-tetrahydropyrido[4',3':4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one schiff bases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 3, p. 836–840, 2016.

NCCLS. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição**

para **Bactéria de Crescimento Aeróbico**. [s.l: s.n.]v. 23, 2005.

NEMETH, J.; OESCH, G.; KUSTER, S. P. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 382–395, 2015.

NILLER, H. H.; MASA, R.; VENKEI, A.; MÉSZÁROS, S.; MINAROVITS, J. Pathogenic mechanisms of intracellular bacteria. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 309–315, 2017.

NUNES-ALVES, C.; BOOTY, M. G.; CARPENTER, S. M.; JAYARAMAN, P.; ROTHCHILD, A. C.; BEHAR, S. M. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 289–299, 2014.

PALOMINO, J.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobail Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864–870, 2004.

PARISH, T.; ROBERTS, D. M. Mycobacteria protocols: Third edition. **Mycobacteria Protocols: Third Edition**, v. 1285, p. 1–416, 2015.

PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. d. S.; LEITE, S. R. A.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti - Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1898–1905, 2010a.

PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. Von; DO NASCIMENTO, F. B.; LEITE, S. R. A.; BATISTA, A. A.; DEFLON, V. M.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 598–601, 2010b.

PEDDIREDDY, V.; DODDAM, S. N.; AHMED, N. Mycobacterial dormancy systems and host responses in tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, p. 1–19, 2017.

PICHHOLIYA, M.; YADAV, A.; LUHADIA, S.; TAHASHILDAR, J.; ASERI, M. A comparative study of efficacy and safety of febuxostat and allopurinol in pyrazinamide-induced hyperuricemic tubercular patients. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 5, p. 522, 2016.

PINHEIRO, M.; SILVA, A. S.; PISCO, S.; REIS, S. Interactions of isoniazid with membrane models: Implications for drug mechanism of action. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 183, p. 184–190, 2014.

PRASAD, R.; SRIVASTAVA, D. K. Multi drug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) management: Current issues. **Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 1, n. 3, p. 124–128, 2013.

QUIGLEY, J.; HUGHITT, V. K.; VELIKOVSKY, C. A.; MARIUZZA, R. A.; EL-SAYED, N. M.; BRIKEN, V. The cell wall lipid PDIM contributes to phagosomal escape and host cell exit of *Mycobacterium tuberculosis*. **mBio**, v. 8, n. 2, p. 1–12, 2017.

RESCH, P.; SCHNEIDER, F. W.; FIELD, R. J.; BURGER, M. The reduction of methylene blue by sulfide ion in the absence and presence of oxygen: Simulation of the methylene blue-O₂-HS--CSTR oscillations. **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, v. 42, n. 2, p. 189–200, 1990.

RODRIGUES, L.; RAMOS, J.; COUTO, I.; AMARAL, L.; VIVEIROS, M. Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: Correlation with antibiotic resistance. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 35, 2011.

SCHOREY, J. S.; SCHLESINGER, L. S. Innate Immune Responses to Tuberculosis. p. 1–27, 2016.

SHEEN, P.; LOZANO, K.; GILMAN, R. H.; VALENCIA, H. J.; LOLI, S.; FUENTES, P.; GRANDJEAN, L.; ZIMIC, M. PncA gene expression and prediction factors on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 93, n. 5, p. 515–522, 2013.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 99–121, 2007.

SIRICILLA, S.; MITACHI, K.; WAN, B.; FRANZBLAU, S. G.; KUROSU, M. Discovery of a capuramycin analog that kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* and its synergistic effects with translocase i inhibitors. **Journal of Antibiotics**, v. 68, n. 4, p. 271–278, 2014.

TANG, P.; JOHNSTON, J. Treatment of Latent Tuberculosis Infection. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, p. 371–379, 2017.

TURNER, R. D.; CHIU, C.; CHURCHYARD, G. J.; ESMAIL, H.; LEWINSOHN, D. M.; GANDHI, N. R.; FENNELLY, K. P. Tuberculosis Infectiousness and Host Susceptibility. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. S6, p. S636–S643, 2017.

VAN BAMBEKE, F. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on

resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1055–1065, 2003.

VARDEVANYAN, P. O.; ANTONYAN, A. P.; PARSADANYAN, M. A.; DAVTYAN, H. G.; KARAPETYAN, A. T. The binding of ethidium bromide with DNA: Interaction with single- and double-stranded structures. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 35, n. 6, p. 527–533, 2003.

VASAVA, M. S.; BHOI, M. N.; RATHWA, S. K.; BORAD, M. A.; NAIR, S. G.; PATEL, H. D.; PARISH, T.; ROBERTS, D. M.; GILL, W. P.; HARIK, N. S.; WHIDDON, M. R.; LIAO, R. P.; MITTLER, J. E.; SHERMAN, D. R. A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Medicine**, v. 15, n. 2, p. 252–275, 2009.

VOSKUIL, M. I.; SCHNAPPINGER, D.; VISCONTI, K. C.; HARRELL, M. I.; DOLGANOV, G. M.; SHERMAN, D. R.; SCHOOLNIK, G. K. Inhibition of Respiration by Nitric Oxide Induces a *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy Program. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 5, p. 705–713, 2003.

WAYNE, L. G. In Vitro Model of Hypoxically Induced Nonreplicating Persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in molecular medicine**, v. 54, p. 247–269, 2001.

WAYNE, L. G.; SOHASKEY, C. D. NONREPLICATING PERSISTENCE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS *. 2001.

WINDER, F. G.; COLLINS, P. B. Inhibition by Isoniazid of Synthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of General Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 41–48, 1970.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis**. [s.l: s.n.], p. 1-464, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2017**. [s.l: s.n.], p.1-262, 2017.

ZUIGA, J.; TORRES-GARCÍA, D.; SANTOS-MENDOZA, T.; RODRIGUEZ-REYNA, T. S.; GRANADOS, J.; YUNIS, E. J. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.