

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

LETÍCIA CRISTINA FURLAN

**Investigação da atividade intramacrofágica dos fármacos anti-
tuberculose de primeira e segunda escolha antes e após a
metabolização**

**Araraquara - SP
2017**

Letícia Cristina Furlan

Investigação da atividade intramacrofágica dos fármacos anti-tuberculose de primeira e segunda escolha antes e após a metabolização.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

**Araraquara, SP
2017**

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, Arnaliete Fernandes da Silva Furlan e Paulo José Furlan, os principais responsáveis por toda minha história e formação.

Agradecimentos

Aos meus pais que nunca mediram esforços pra me proporcionar a melhor educação e sempre me incentivaram, apoiaram e acreditaram em mim em todos os momentos e me inspiram a ser uma pessoa cada vez melhor. Vocês são a base de tudo, sem vocês nada disso seria possível.

As meus familiares e amigos que mesmo apesar da distância física sempre buscaram palavras de apoio e incentivo.

A todos os amigos e colegas que estiveram comigo e plantaram um pouquinho de cada um em mim. Em especial aquelas que sempre estiveram comigo: Ana Lígia, Dani, Isabela, Raíssa. Vocês tornaram essa jornada muito mais fácil e única. Obrigada por cada momento que dividimos, pelos apoios e por terem um bom “ouvido” para reclamações e desabafos.

À minha companheira de casa, quarto, tristezas e alegrias, Tainá. Obrigada pela amizade, conselhos e ajuda em todos os momentos que passamos e pela alegria contagiante nas coisas mais simples.

Ao meu namorado, Bryan, por toda paciência, força e compreensão sem medida e por me apoiar em todas as minhas ideias e decisões. Obrigada por toda amizade e amor e sempre me lembrar de que há um lado positivo em todas as situações.

Ao professor Fernando que me aceitou em seu laboratório e a todos do grupo que me acolheram e dividiram comigo todo conhecimento e experiência e sempre me ajudaram em quaisquer circunstâncias.

Agradeço a CNPQ pela bolsa concedida para a realização de todo o trabalho.

RESUMO

A tuberculose (TB) continua sendo uma das doenças transmissíveis com maior índice de mortes mundialmente e é considerada um grave problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que em 2016 havia 10,3 milhões de casos de TB sendo que 1,4 milhões morreram em decorrência à doença. O tratamento atual dura cerca de 6 meses para os casos sensíveis e no mínimo 2 anos quando há resistência. O longo período de tratamento e a quantidade de antibióticos utilizados levam a um aumento na desistência e imprudência no tratamento assim como graves efeitos adversos e complicações no paciente. Considerando a busca por fármacos que possibilitem melhorar o tratamento, esse trabalho avaliou o perfil de citotoxicidade e atividade antes e após a metabolização de três fármacos do tratamento para a tuberculose, sendo um de primeira escolha (rifampicina) e em seguida, dois de segunda escolha (amicacina e moxifloxacino) utilizando a fração S9 como indutor da metabolização *in vitro*. Com a fração S9, observou-se uma menor citotoxicidade dos fármacos moxifloxacino e amicacina porém uma maior citotoxicidade da rifampicina. O perfil de atividade intramacrofágica com a fração S9 foi maior para a moxifloxacino e rifampicina demonstrando que a fração S9 pode ser considerada uma possível ferramenta de estudo do processo de metabolização de fármacos *in vitro*.

Palavras-chave: antibióticos, metabolização, tuberculose.

Lista de Ilustrações

Figura 1- Taxa estimada de incidência de tuberculose em 2016.....	9
Figura 2 - Estrutura molecular da rifampicina.....	12
Figura 3 - Estrutura molecular do moxifloxacino e seus metabólitos.....	14
Figura 4 - Estrutura molecular da amicacina.....	16
Gráfico 1 - Dose-resposta de macrófagos J774A.1 frente ao fármaco amicacina pelos períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação.....	24
Gráfico 2 - Dose-resposta de macrófagos J774A.1 frente ao fármaco rifampicina pelos períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação.....	26
Gráfico 3 - Dose-resposta de macrófagos J774A.1 frente ao fármaco moxifloxacino pelos períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação.....	27
Gráfico 4 - Concentração inibitória mínima dos fármacos amicacina, moxifloxacino e rifampicina antes e após a metabolização.....	30
Gráfico 5 - Atividade intracelular dos fármacos amicacina, moxifloxacino e rifampicina antes e após metabolização.....	33

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Valores de IC50 antes e após metabolização.....	23
Tabela 2 - Valores de CIM com e sem metabolização.....	30

Lista de Abreviaturas

AMK	Amicacina
CIM	Concentração inibitória mínima
CYP	Citocromo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMB	Etambutol
IC ₅₀	Índice de citotoxicidade
MDR	Multi-droga resistente
MOX	Moxifloxacino
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PZA	Pirazinamida
RIF	Rifampicina
REMA	<i>Resazurin Microtiter Assay</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TB	Tuberculose
UFC	Unidade formadora de colônia

Sumário

1. Introdução	9
1.1. Tuberculose	9
1.2. Tratamento.....	10
1.2.1 Rifampicina	11
1.2.2. Moxifloxacino	13
1.2.3. Amicacina	14
1.3 Metabolização	16
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. Material e métodos	19
3.1 Cepa bacteriana.....	19
3.2 Linhagem celular.....	19
3.3 Fármacos	19
3.4 Solução S9.....	19
3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos anti-TB frente à cepa <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv – ATCC 27294.....	20
3.6 Determinação do índice de citotoxicidade (IC ₅₀) dos antibióticos anti-TB frente a J774A.1 em 24, 48 e 72 horas.	21
3.7 Determinação da atividade intracelular dos antibióticos anti-TB frente a J774A.1 – ATCC TIB – 67 e as cepas de <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ RV – ATCC 27294..	21
3.8 Análise Estatística.....	23
4. Resultados	233
4.1 Ensaio de Citotoxicidade.....	23
4.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	29
4.3. Atividade intracelular	31
5. Conclusão	35
6. Referências Bibliográficas	36

1. Introdução

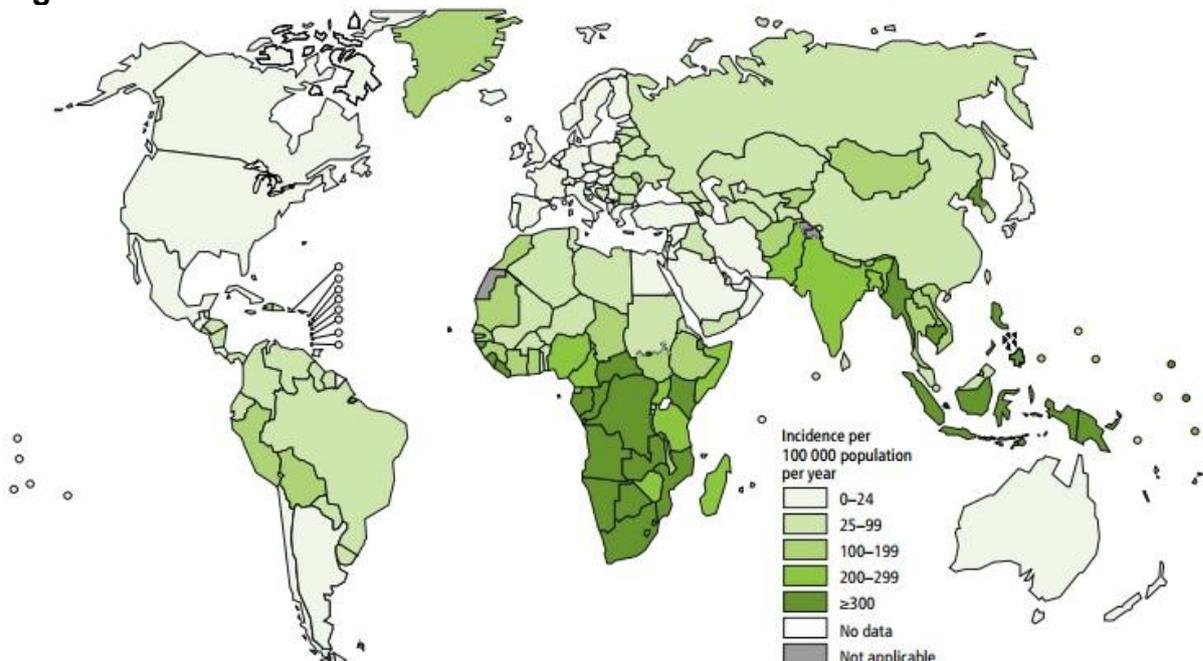
1.1. Tuberculose

A tuberculose (TB) é popularmente conhecida como uma doença milenar, porém atualmente é classificada como a nona principal causa de mortes mundialmente e considerada um grave problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que em 2016 houve 10,4 milhões de casos de TB (**Figura 1**) sendo que 1,3 milhão morreram em decorrência da doença e as regiões mais afetadas são com países subdesenvolvidos como a África e a Ásia (WHO,2017).

Uma das grandes complicações da doença é a co-infecção TB-HIV, dentre as 1,3 milhão de morte, mais de 374.000 mortes eram HIV-positivos.

Essa imunodeficiência leva a um grande comprometimento do sistema imune do indivíduo tornando-o mais susceptível a contrair o bacilo e desenvolver a doença, visto que o organismo não é capaz de combater totalmente o patógeno. (WHO, 2017).

Figura 1- Taxa estimada de incidência de tuberculose em 2016.



Fonte: WHO, World Health Organization, 2017.

A TB é uma doença contagiosa transmitida pelo ar afetando principalmente os pulmões sendo causada principalmente pela bactéria patogênica *Mycobacterium*

tuberculosis (MTB). Porém, outras espécies de *Mycobacterium* também podem causar a TB como: *Mycobacterium bovis*, *M. africanum* e *M. smegmatis* além de infectar outros órgãos como os linfonodos, sendo esta chamada de tuberculose extrapulmonar (PORCEL, 2009). O MTB é um bacilo que foi descrito em 1882 pelo alemão Robert Koch (KESHAVJEE S, 2012).

A infecção pelo bacilo decorre a partir da inalação de partículas de aerossóis contaminadas (CRUZ-KNIGHT e BLAKE-GUMBS, 2013; MASON *et al*, 2010) eliminadas principalmente pela tosse, um dos principais sintomas da TB assim como febre e dores no peito (WHO, 2014; COMAS e GAGNEUX, 2009). Logo que o bacilo é inalado, os macrófagos, primeiras células de defesa do organismo, são sinalizados e conseguem fagocitar o micro-organismo (DE MARTINO *et al*, 2014).

Ao longo do tempo o MTB desenvolveu diversas maneiras de evitar os mecanismos de ação dos macrófagos conseguindo sobreviver intracelularmente (VERGNE *et al*, 2004; RUSSEL, 2011) e assim acabando por gerar uma resposta pró-inflamatória no organismo (DE MARTINO *et al*, 2014).

O MTB permanece preferencialmente no interior dessas células de defesa podendo permanecer em estado de latência durante anos e nesse estado os bacilos não são transmitidos não causando a infecção (MOLINA-TORRES *et al*, 2014). Um caso típico da doença é a formação de granulomas, uma barreira formada por células de defesa em torno das células infectadas (LIMA M R D'I, 2014).

Essa capacidade do bacilo de sobreviver e se proliferar no hospedeiro são cruciais para a sua patogenicidade (HMAMA *et al*, 2015; WEISS AND SCHAIBLE, 2015). Estudos mostram que cepas não virulentas de MTB induzem os macrófagos a apoptose em uma baixa multiplicidade de infecção enquanto as cepas virulentas em uma baixa multiplicidade de infecção impedem a apoptose (KEANE *et al*, 1997).

1.2. Tratamento

Atualmente são utilizados quatro antibióticos anti-TB de primeira linha para o tratamento de cepa sensível, sendo eles: rifampicina (RIF), isoniazida (INH), pirazinamida (PZA) e etambutol (ETB), são realizadas terapias de combinação entre esses antibióticos durante 6 meses sendo que nos 2 primeiros meses o paciente, na chamada fase intensiva, recebe doses variadas dos quatro antibióticos e nos últimos 4 meses, na fase de manutenção, o paciente recebe doses variadas apenas de INH e RIF (Ministério da Saúde, 2017).

Em casos de resistência ao tratamento de primeira linha, é feita uma nova combinação com diferentes antibióticos anti-TB de segunda linha levando a um tratamento mínimo de 2 anos. Os casos de resistência podem ser devido a diversos fatores, entre eles, surgimento natural durante a multiplicação do bacilo, má adesão ao tratamento inicial, falhas no tratamento, falta de medicamentos necessários (Ministério da Saúde, 2017).

Estima-se que cerca de 490.000 dos novos casos são decorrentes da infecção por bactérias multi-fármaco resistentes (MDR), quando resistentes pelo menos à isoniazida e RFP (WHO, 2017).

Normalmente, são utilizados antibióticos que não tenham sido utilizados anteriormente para tratar as cepas MDR-TB. A nova combinação compreende antibióticos orais de segunda linha e injetáveis (Ministério da Saúde, 2017).

1.2.1 Rifampicina

A RIF (**figura 2**) foi sintetizada em 1957 e é utilizada no tratamento da tuberculose desde o início dos anos 70 (WHO, 2010). É um dos fármacos de primeira linha, considerado um fármaco bactericida seu mecanismo de ação se dá pela inibição da transcrição gênica do MTB, ligando-se a RNA polimerase dependente de DNA consequentemente impedindo a síntese de RNA mensageiro e de proteínas causando morte celular. Essa atividade é exclusiva em células procariontes não interferindo em células eucariontes (RAMASWAMY AND MUSSER, 1998). As micobactérias ainda podem desenvolver resistência ao fármaco pela mutação no gene que codifica a cadeia beta da RNA polimerase, o gene *rpoB* (GOODMAN & GILMAN, 2012; RANGE & DALE, 2010).

- **Absorção**

É um dos fármacos administrado oralmente por apresentar uma taxa de biodisponibilidade oral de 90%. O pico sérico plasmático de 5-10µg/mL é atingido entre 2 a 4 horas após a administração oral de 600mg do fármaco e sua meia-vida é de 1 a 5 horas diminuindo durante o tratamento devido à auto-indução de enzimas hepáticas aumentando o metabolismo da RIF (WALLACE AND GRIFFITH, 2009; RANGE & DALE; 2010).

- **Distribuição**

Apresenta uma ampla distribuição pelo organismo podendo ser observada pela coloração alaranjada em lágrimas, fezes e urina, suor. O volume de distribuição no organismo é de 1,6 L/Kg e apresenta uma ligação às proteínas plasmáticas de 89% (RANGE & DALE, 2010; BRUNTON, 2012).

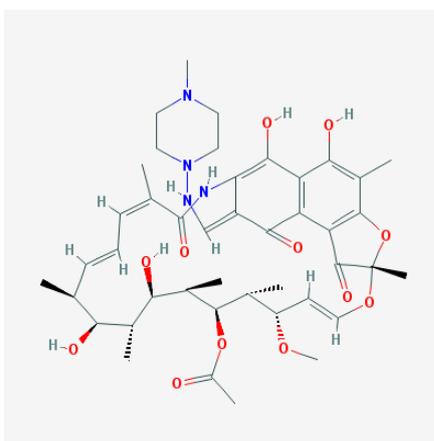
- **Metabolização**

Sabe-se que aproximadamente 85% da rifampicina é metabolizada por enzimas hepáticas integrantes do sistema CYP450 na chamada reação de fase I do metabolismo (WALLACE e GRIFFITH, 2009). A rifampicina é um potente indutor do complexo do citocromo e induz particularmente as isoenzimas CYP 3A4 e CYP 2C9, ambas importantes no metabolismo de diversos fármacos (LEMOS, 2014). As reações de fase I são responsáveis pelo aumento da polaridade dos fármacos podendo elevar ou diminuir sua atividade e toxicidade. A rifampicina pode sofrer desacetilação hepática formando o metabólito desacetilrifampicina apresentando atividade contra *MTB* (SOUZA, 2005) ou sofrer hidrólise gerando o metabólito formilrifampicina sem atividade anti-TB (RANGE & DALE, 2010)

- **Excreção**

Sua excreção é majoritariamente (60-65%) por via biliar e cerca de 6-15% não sofre metabolização sendo reabsorvida e elevando o nível sérico desse fármaco (WALLACE AND GRIFFITH, 2009).

Figura 2 - Estrutura molecular da rifampicina.



Fonte: PubChem.

- **Efeitos adversos**

Pelo fato do tratamento ser realizado em combinação com os outros três fármacos o efeito adverso mais intenso é a hepatotoxicidade. Na grande parte dos pacientes a quantidade sérica de bilirrubinas e enzimas hepáticas aumenta durante o tratamento e há uma maior indução de enzimas hepáticas pela RIF sendo necessário o aumento da dosagem de medicamentos metabolizados pelo fígado. Além desse efeito, alguns pacientes podem apresentar exantema, reações imunológicas e gastrointestinais (RANGE & DALE, 2010; BRUNTON, 2012, WALLACE AND GRIFFITH, 2009).

1.2.2. Moxifloxacino

Sintetizada em 1999, a MOX (**figura 3**) é um dos novos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose, principalmente em casos de resistência aos fármacos iniciais. Pertence à classe das fluoroquinolonas e sua atividade se dá pela inibição da DNA girase, essencial na replicação, transcrição e reparação do DNA bacteriano. Assim como a rifampicina, também possui atividade intracelular (RANGE & DALE, 2010; CARRYN, 2003).

- **Absorção**

Apresenta uma rápida absorção oral com biodisponibilidade acima de 90% atingindo nível sérico entre 1-3 horas após uma administração de 400mg e sua meia-vida é de aproximadamente 12 horas (RANGE & DALE, 2010; BRUNTON, 2012; GILLESPIE, 2015).

- **Distribuição**

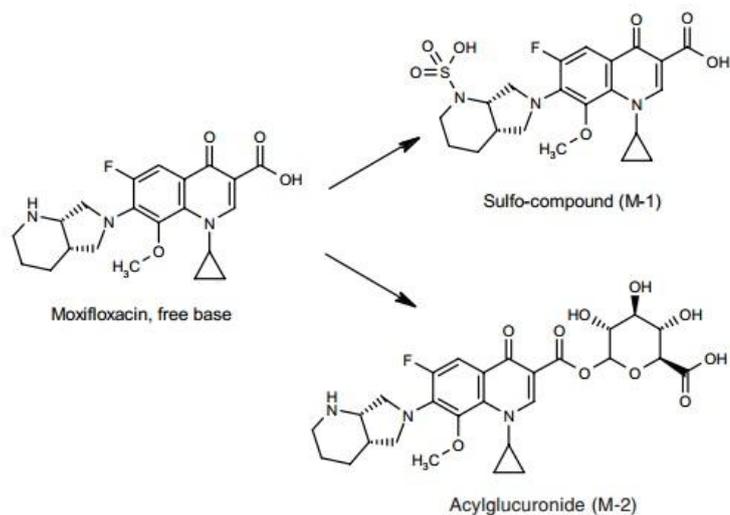
Distribui-se amplamente pelos tecidos do corpo, porém, não atravessa a barreira hemato-encefálica. Possui um volume de distribuição entre 1,8-2,0 L/Kg e uma ligação às proteínas plasmáticas de 50% considerada relativamente baixa (RANGE & DALE, 2010; BRUNTON, 2012, CULLEY, 2001; MOISE, 2000).

- **Metabolização**

Não é um substrato do complexo enzimático do citocromo P450, porém, pode sofrer conjugação com sulfato ou ácido glicurônico presentes nas reações hepáticas de fase II, reações normalmente de desintoxicação tornando o fármaco

menos lipossolúvel, formando os metabólitos acilglucorônico e sulfo-composto ambos inativos (**Figura 3**) (MOISE, 2000; ARBEX, 2010; CULLEY, 2001).

Figura 3 - Estrutura molecular do moxifloxacino e seus metabólitos.



Fonte: MOISE, 2000.

- **Excreção**

A moxifloxacino é eliminada preferencialmente pelos rins e cerca de 45% é excretada de forma inalterada pela urina e fezes (THEE, 2014; MOISE, 2000).

- **Efeitos adversos**

Os efeitos adversos causados pelas fluoroquinolonas são relativamente raros. No geral, são bem tolerados e os efeitos mais comuns são irritações no trato gastrointestinal, náuseas e a moxifloxacino pode estar relacionada com interferências na frequência cardíaca (BRUNTON, 2012).

1.2.3. Amicacina

Da classe dos aminoglicosídeos, a AMK é um fármaco semissintético (**figura 4**) derivado da canamicina e assim como a MOX também é utilizada no tratamento de segunda linha. Seu mecanismo de ação é a inibição da síntese de proteínas por meio da inibição irreversível na subunidade ribossomal 30S. É

bactericida e seu perfil de atividade varia de acordo com a concentração, quanto maior a concentração, maior a atividade frente às micobacterias (BRUNTON, 2012).

Atualmente, a resistência aos aminoglicosídeos tem aumentado e ocorre por diversos mecanismos sendo o mais importante, a mutação no gene *rrs* que codifica o RNA ribossomal, local onde a AMK apresenta atividade (RANGE & DALE, 2010).

- **Absorção**

Por ser altamente polar possui baixa absorção oral e devido a isso sua administração durante o tratamento é feita pela via parenteral. Por ser administrada pela via parenteral, sua absorção é completa e atinge o pico sérico em até 90 minutos. A sua meia-vida é entre 2 a 4 horas (GUIMARÃES, 2010; RANGE & DALE, 2010; BRUNTON, 2012)

- **Distribuição**

Devido à característica polar desse fármaco, não possui a capacidade de penetrar na maioria das células, olhos e barreira hemato-encefálica. Porém, podem cruzar a barreira placentária. A amicacina apresenta uma baixa ligação às proteínas plasmática sendo esta de aproximadamente 10% (RANGE & DALE, 2010; GUIMARÃES, 2010).

- **Metabolização**

Sabendo-se que a AMK é administrada pela via parenteral, não sofre metabolismo de primeira passagem e as informações acerca da influência do metabolismo hepático nesse fármaco são escassas (ARBEX, 2010).

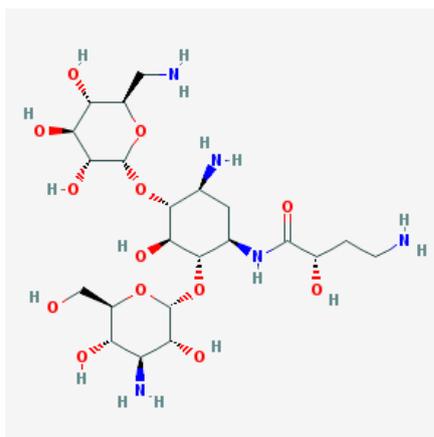
- **Excreção**

É excretada principalmente pelos rins através da filtração glomerular e cerca de 50-60% é eliminada de forma inalterada em até 24 horas. Apresenta um clearance de 100mL/min (BLUMBERG, 2003; RANGE & DALE, 2010).

- **Efeitos adversos**

Os aminoglicosídeos são amplamente conhecidos por causar ototoxicidade e nefrotoxicidade em pacientes em tratamento com elevadas doses do fármaco (RANGE & DALE, 2010; RYBAK 1999).

Figura 4 - Estrutura molecular da amicacina.



Fonte: PubChem.

1.3 Metabolização

In vivo, o processo de metabolização é complexo. Muitos fármacos podem passar pelo fígado e sofrer o metabolismo de primeira passagem, responsável pela bioativação ou não desses fármacos e conseqüentemente aumento ou diminuição da sua toxicidade. Nesse metabolismo, os fármacos podem ter influência das reações de fase I ou II.

Nas reações de fase I ocorre um aumento na polaridade do fármaco por meio de hidrólise, hidroxilação, dealquilação e normalmente gera produtos mais ativos que o original, processo descrito como bioativação. As principais enzimas responsáveis nessa fase são as do complexo do citocromo P450, formado por uma família de isoenzimas que se diferem pelas seqüências de aminoácidos e substratos (RANGE & DALE, 2010).

As reações de fase II são reações de conjugações por grupos glucoronil, acetil, metil, glutatona que diminuem a lipossolubilidade do fármaco levando e frequentemente relacionadas à formação produtos inativos e aumento no processo de excreção pela urina ou bile (RANGE & DALE, 2010).

As características exclusivas de cada fármaco levam a necessidade de pesquisas sobre a atividade e toxicidade *in vitro* quando metabolizados. Existem

diversos ensaios e modelos que induzem processos de metabolização. Um desses possíveis modelos é a fração S9, essa fração contém enzimas hepáticas microsossomais e citosólicas retiradas de fígados de ratos (GUENRICH, 2001; BARILE, 1994) que são responsáveis pelas reações de fase I e fase II que acontecem no organismo. Com o uso dessa fração S9, é possível investigar *in vitro* um possível processo de metabolização que determinados fármacos e substância possam sofrer no organismo humano (ASHA e VIDYAVATHI, 2010).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade intramacrofágica dos antibióticos anti-TB, rifampicina, amicacina e moxifloxacino utilizados no tratamento de primeira e segunda escolha, antes e após sua metabolização utilizando a fração S9.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o índice de citotoxicidade (IC_{50}) dos antibióticos frente às células J774A.1 (macrófagos de murino) antes e após a metabolização.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos frente à cepa H₃₇Rv (*Mycobacterium tuberculosis*) antes e após a metabolização.
- Determinar a atividade intramacrofágica dos antibióticos antes e após a metabolização.

3. Material e métodos

3.1 Cepa bacteriana

Para a realização dos experimentos da determinação da CIM e da atividade intramacrofágica foi utilizada a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv – ATCC 27294.

3.2 Linhagem celular

Nos ensaios de citotoxicidade e atividade intramacrofágica foi utilizada a linhagem celular J774A.1 (ATCC TIB -67), macrófagos de murino. As células foram mantidas à -80°C e descongeladas previamente aos experimentos em meio RPMI (VitroCell®) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (VitroCell®) e anfotericina B – 2mg/mL (Sigma®) e sulfato de gentamicina - 50mg/mL (Vitrocell®) para controle de esterilidade do meio.

3.3 Fármacos

Para a realização dos experimentos foram utilizados os seguintes fármacos:

- Rifampicina (Sigma®) preparada em uma solução estoque inicial a 50.000 e 10.000 µg/mL em DMSO.
- Amicacina e Moxifloxacino (Sigma®) preparadas em uma solução estoque iniciais a 10.000 µg/mL em água destilada e posteriormente filtrada.

3.4 Solução S9

Para induzir o processo de metabolização foi utilizada a fração S9 (Sigma®), um concentrado de enzimas hepáticas obtidas de fígados de ratos e a partir dessa fração foi preparada uma solução S9 contendo cloreto de magnésio 0,4M, cloreto de potássio 0,65M, glicose-6-fosfato, tampão fosfato pH 7,4 e β – nicotinamida adenina dinucleotidifosfato 0,1M. Toda a solução foi preparada e mantida em banho de gelo durante o experimento e utilizada por um período de até 3 horas (AMES, 1975).

3.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antibióticos anti-TB frente à cepa *M. tuberculosis* H₃₇Rv – ATCC 27294.

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia de Palomino (Palomino *et al*, 2002). Primeiramente, adicionou-se a uma microplaca de 96 poços (Kasvi®) meio de cultura Middlebrook 7h9 enriquecido com OADC (ácido oleico, albumina, catalase e dextrose) a 10% nos seguintes volumes: 150µL nos poços da coluna 1 para controle dos fármacos; 100µL nas colunas 2 à 10 para posterior diluição seriada dos fármacos; 100µL na coluna 11 para o controle positivo contendo apenas meio e micobactérias e 200µL na coluna 12 para o controle negativo contendo apenas o meio de cultura.

Os fármacos são diluídos da coluna 2 a 10 visando obter concentrações entre 0,01 a 1,00 µg/mL. O inóculo foi previamente descongelado em meio 7h9 enriquecido com OADC e no dia do experimento a concentração bacteriana foi ajustada a partir do cultivo até atingir 1 na escala de McFarland (Utiliza-se o densitômetro DEN-1, Biosan, comprimento de onda = 565±15 nm) e em seguida fez-se duas diluições, 1:50 e 1:10, com meio 7h9 com 10% de OADC para obter a concentração de aproximadamente 10⁵UFC/mL.

Adicionou-se 100µL dessa suspensão do inóculo previamente preparado nas colunas 2 a 11. Ao final do procedimento as microplacas foram incubadas à 37°C e 5% de CO₂ por sete dias. Após esse período, aplicou-se 30µL do revelador resazurina (Sigma®) (solução de 0,01% em água estéril) em toda a placa e incubando-a novamente à 37°C por 24 horas. Depois da última incubação é feita a leitura visual e por fluorescência no Cytation(530-590nm). O revelador possui uma coloração azul e quando sofre redução, devido ao metabolismo celular, ocorre uma mudança de cor do azul (baixa fluorescência) para o rosa (alta fluorescência) indicando o crescimento bacteriano.

Com o resultado da fluorescência foi possível calcular a concentração inibitória mínima (CIM) de cada fármaco. A CIM é definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir 90% da multiplicação bacteriana. No ensaio com a fração S9, esta foi adicionada a 10% em todo o meio de cultura utilizado no experimento. Foram realizados três ensaios independentes.

3.6 Determinação do índice de citotoxicidade (IC₅₀) dos antibióticos anti-TB frente a J774A.1 em 24, 48 e 72 horas.

A linhagem celular J774A.1 foi previamente descongelada em meio RPMI suplementado à 10% de soro fetal bovino (SFB) e 5% CO₂ a 37°C até adquirirem aderência celular.

Assim que a confluência celular foi adquirida, as células J774A.1 foram raspadas utilizando-se um *scraper* e centrifugadas (1500 rpm por 5 minutos), em seguida o número de células foi contado em Câmara de Neubauer para ajuste da concentração, 1,92x10⁶ céls/mL por placa. Em seguida, semeadas em 3 microplacas de 96 orifícios com um volume final de 100 µL entre as colunas 2 a 10 e 200µL da coluna 11 apenas para controle positivo de viabilidade celular. Na coluna 1 foi adicionado 150µL de meio RPMI para controle dos fármacos e 200µL na coluna 12 para controle do meio. Estas foram incubadas à 37°C e 5% CO₂ por 24 horas a fim de se obter a aderência celular nas microplacas.

Após essas 24 horas de incubação, adicionaram-se os antibióticos com intervalo de 3,9 a 1000 µg/mL nas colunas 2 a 10. Em seguida são transferidos às placas de células e incubados por 24, 48 e 72 horas para a reação com os compostos.

Depois do período de tratamento, o meio foi retirado e aplicou-se 50µL do revelador resazurina em cada orifício e cerca de 3 horas depois foi realizada a leitura por fluorescência no Synergy H1 (530 E 590nm).

Foi considerado o IC₅₀ a maior concentração que permite até 50% das células viáveis nos três tempos. O ensaio também foi realizado com a fração S9 a 10% adicionada no segundo dia juntamente aos fármacos para metabolização (Pavan, 2010).

3.7 Determinação da atividade intracelular dos antibióticos anti-TB frente a J774A.1 – ATCC TIB – 67 e as cepas de *M. tuberculosis* H₃₇RV – ATCC 27294.

A avaliação da atividade intracelular foi realizada com base na proposta de Snewin utilizando a contagem das UFC (SNEWIN et al, 1999).

Os macrófagos J774A.1 foram coletados por raspagem, centrifugados (1500 rpm por 5 minutos) e o número de células quantificado em câmara de Neubauer e sua concentração ajustada para 5x10⁵cel/mL. Em uma placa de 24 orifícios foram depositados 1000µL dessas células em cada orifício mantendo a concentração

celular. A placa foi então incubada a 37°C e 5% de CO₂ *overnight* para aderência celular. Após esse período o meio foi removido e os orifícios foram lavados com solução tamponada de Hank's (Sigma® pH 7,0) para posterior adição da suspensão de micobactérias.

A suspensão de micobactérias foi preparada em uma concentração de 1x10⁶ ufc/mL em meio RPMI visando obter entre 1 a 5 micobactérias/célula e em seguida a foi adicionado 1000µL dessa suspensão em cada orifício e incubadas por cerca de 2 horas à 37°C com 5% de CO₂ para que ocorra o processo fagocitose. Após a fagocitose, todo o sobrenadante foi retirado e os orifícios lavados com solução tamponada de Hank's e foi adicionado 1000µL uma solução de amicacina 200µg/mL por 2h para eliminação das micobactérias extracelulares. Em seguida os orifícios foram novamente lavados com a solução tamponada e lisados com solução Triton a 0,1% dois orifícios (T0) para controle de fagocitose e realizou-se a diluição (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) em uma placa com meio sólido 7h9 e incubadas por no mínimo 10 dias, após esses dias foi realizada a contagem de UFC.

Na mesma microplaca, adicionou-se 1000µL de cada antibiótico anti-TB a ser estudado nas concentrações do valor de CIM, 5x superior e 10x superior ao CIM, em duplicata metodologica, em três orifícios da microplaca. As microplacas foram então incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 72 horas.

Após as 72 horas, lavou-se novamente o tapete de células com a solução tamponada de Hank's e as células infectadas foram lisadas com 1000 µL de Triton 0,1%. Após a lise foram plaqueadas 100µL da suspensão de cada orifício em placas de meio sólido nas seguintes diluições: 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³.

Essas placas foram incubadas à 37°C com 5% CO₂ por aproximadamente 20 dias e em seguida feita a contagem das UFC/mL. O ensaio também foi realizado com a adição da fração S9 a 10% com os fármacos e triplicatas independentes.

A porcentagem de inibição é determinada pelo seguinte cálculo:

$$100 \times [1 - b/a] = \% \text{ de inibição da multiplicação micobacteriana.}$$

Sendo, **a** igual à contagem de colônias do controle-positivo (T3) que são as células sem tratamento e **b** o resultado da contagem nos orifícios referentes às concentrações de cada fármaco.

3.8 Análise Estatística.

Os resultados obtidos foram analisados e pelo programa GraphPad Prism 5 e a análise estatística pelo Test *t* de Student.

4. Resultados e discussão

4.1 Ensaio de Citotoxicidade

Primeiramente foi realizada a determinação do índice de citotoxicidade (IC_{50}) com e sem indução da metabolização. Os resultados obtidos estão demonstrados na **tabela 1**.

Tabela 1- Valores de IC_{50} de macrófagos antes e após metabolização.

IC_{50}		24h	48h	72h
Amicacina	sem metabolização	> 500 $\mu\text{g/mL}$	> 500 $\mu\text{g/mL}$	> 500 $\mu\text{g/mL}$
	após metabolização	> 500 $\mu\text{g/mL}$	> 500 $\mu\text{g/mL}$	> 500 $\mu\text{g/mL}$
Moxifloxacino	sem metabolização	318 $\mu\text{g/mL}$	248 $\mu\text{g/mL}$	95 $\mu\text{g/mL}$
	após metabolização	> 500 $\mu\text{g/mL}$	> 500 $\mu\text{g/mL}$	> 500 $\mu\text{g/mL}$
Rifampicina	sem metabolização	911 $\mu\text{g/mL}$	> 1000 $\mu\text{g/mL}$	961 $\mu\text{g/mL}$
	após metabolização	> 1000 $\mu\text{g/mL}$	550 $\mu\text{g/mL}$	365 $\mu\text{g/mL}$

Fonte: Dados do autor.

Sendo o IC_{50} a maior concentração que permite pelo menos 50% da viabilidade celular, o fármaco moxifloxacino apresentou uma diminuição significativa do IC_{50} , logo, um aumento na toxicidade frente às células J774A.1, macrófagos de murinos, após a utilização da fração s9.

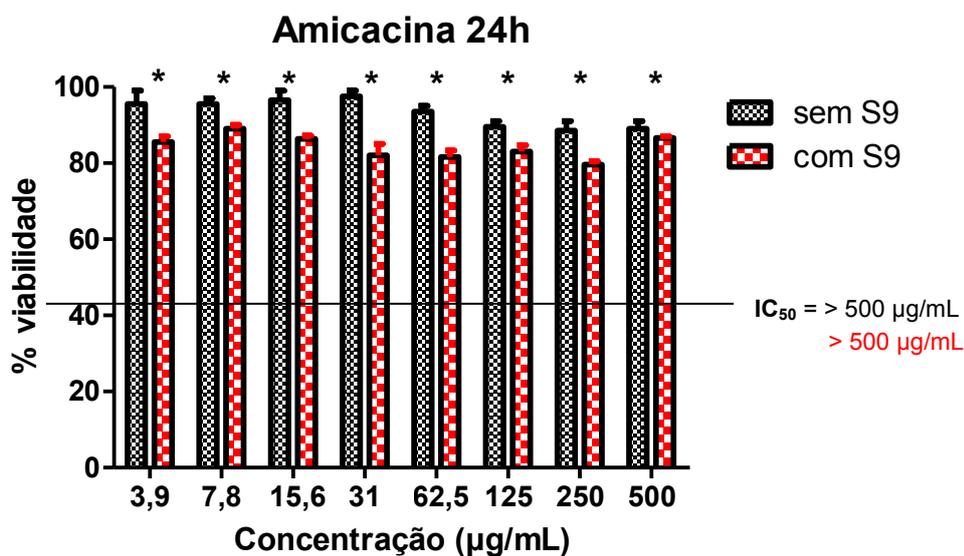
O **gráfico 1** abaixo relacionam a porcentagem de viabilidade celular pelas concentrações utilizadas nos ensaios com e sem a utilização da fração s9 em três períodos.

Com relação ao fármaco amicacina, foi possível analisar que não houve diferença estatisticamente significativa na citotoxicidade com o uso da fração S9 em 24 e 48 horas. Após 72 horas o fármaco apresentou maior toxicidade com uma diminuição da viabilidade celular.

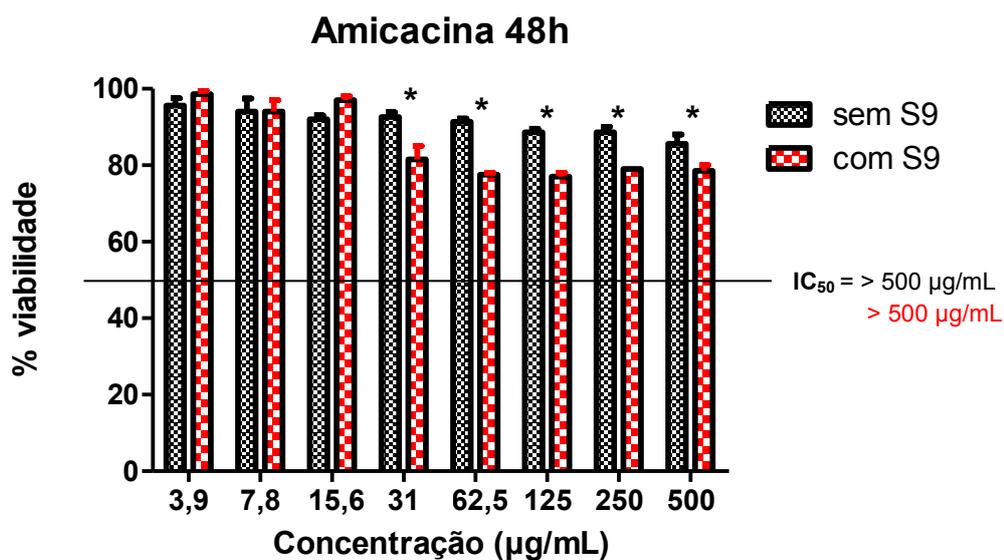
Esse fármaco apresenta baixa biodisponibilidade oral e devido a isso é administrado por via parenteral logo, são poucas as informações e estudos de seu metabolismo na literatura atual. Por apresentar alta polaridade, a amicacina é

incapaz de atravessar a membrana celular e tem sua atividade bactericida após cruzar os canais de porina das micobactérias e se ligar aos ribossomos celulares (BRUNTON, 2012; RANGE & DALE, 2010), sendo assim, apresenta uma menor chance de induzir toxicidade às células de defesa. Após as 72 horas foi possível notar uma maior toxicidade em comparação com os dois primeiros tempos. A atividade da amicacina é proporcional a sua concentração indicando que possivelmente com o maior tempo de exposição e acúmulo desses fármacos frente às células, sua toxicidade também pode ser maior (RANGE & DALE, 2010; BRUNTON, 2012).

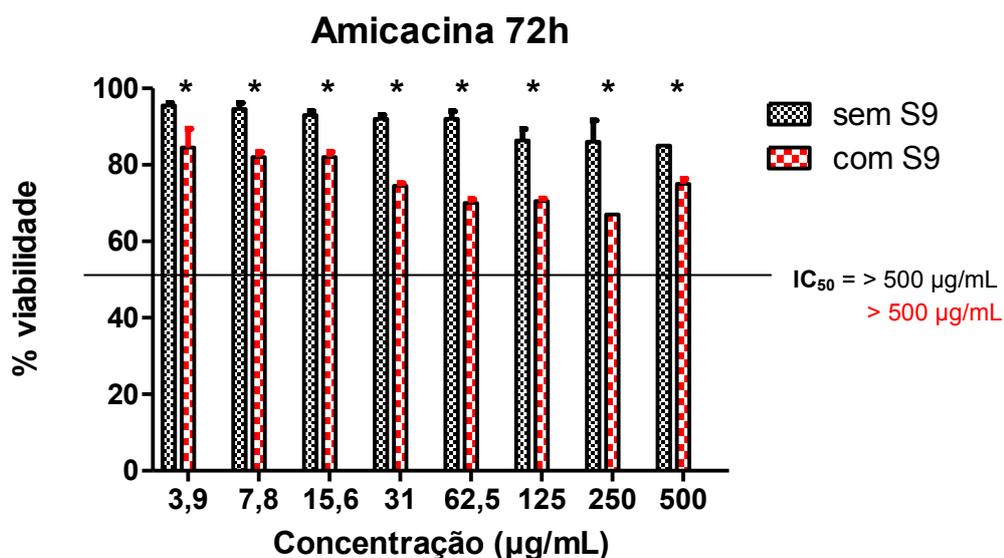
Gráfico 1 - Dose-resposta de macrófagos J774A.1 frente ao fármaco amicacina pelos períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação.



*Diferença estatística significativa. Análise de variância One-Way ANOVA com pós teste T student.



*Diferença estatística significante. Análise de variância One-Way ANOVA com pós teste T student.

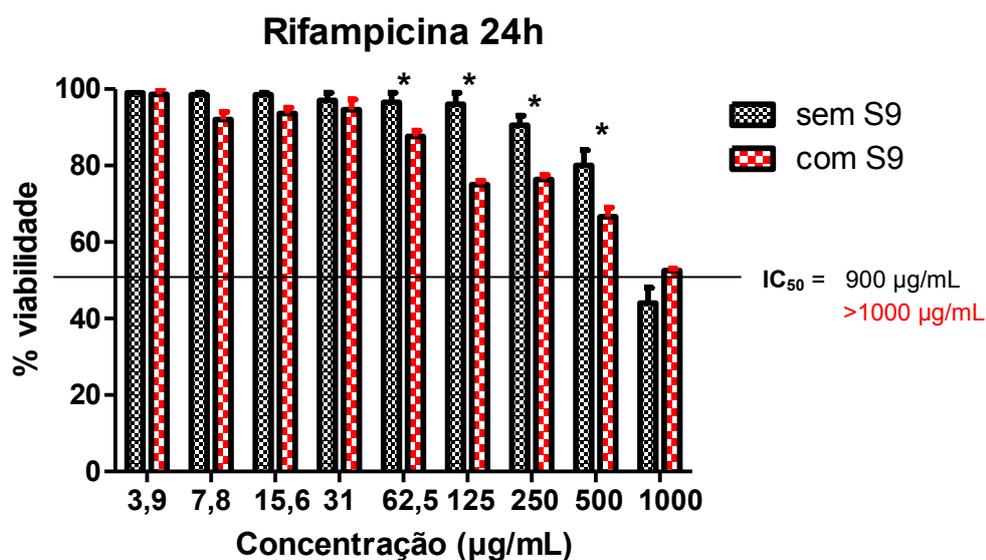


*Diferença estatística significante. Análise de variância One-Way ANOVA com pós teste T student.

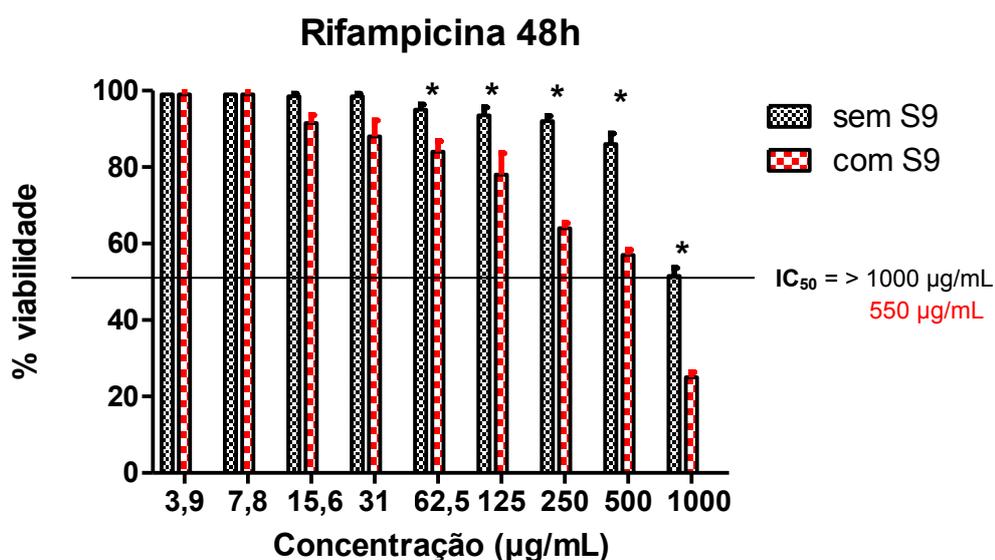
No caso da rifampicina (**gráfico 2**), o uso da fração s9 levou a um aumento na toxicidade do fármaco e, logo, a uma maior inibição do crescimento celular principalmente após a exposição de 72h em uma maior concentração e acúmulo do fármaco e seus metabólitos. A rifampicina é um dos fármacos que sofre metabolização hepática pelas enzimas do complexo citocromo P450 (WALLACE

AND GRIFFITH, 2009). Ao ser metabolizada a rifampicina forma dois metabólitos, a formilrifampicina e a desacetilrifampicina, que demonstraram ainda apresentar um perfil de citotoxicidade frente aos macrófagos.

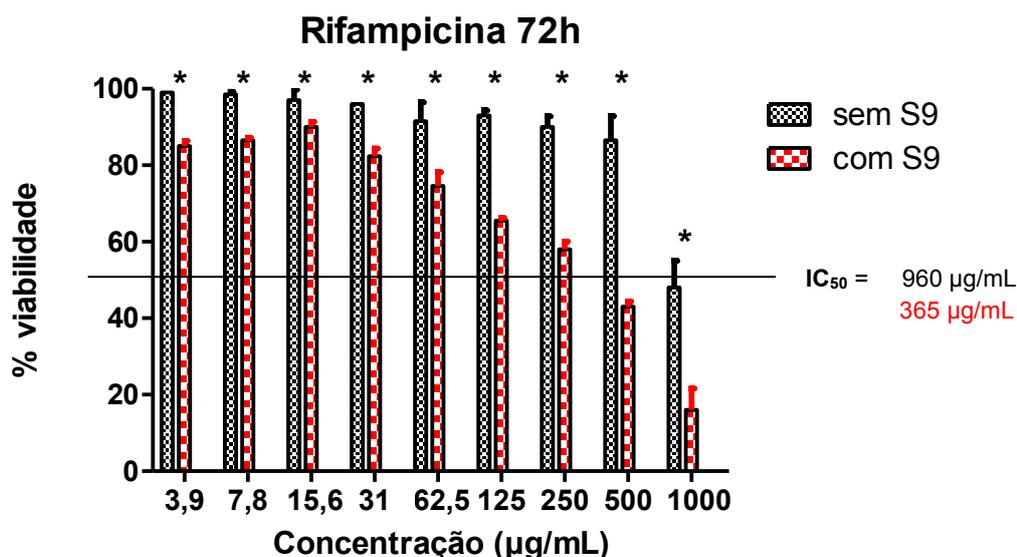
Gráfico 2 - Dose-resposta de macrófagos J774A.1 frente ao fármaco rifampicina pelos períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação.



*Diferença estatística significante. Análise de variância One-Way ANOVA com pós teste T student.



*Diferença estatística significante. Análise de variância One-Way ANOVA com pós teste T student.

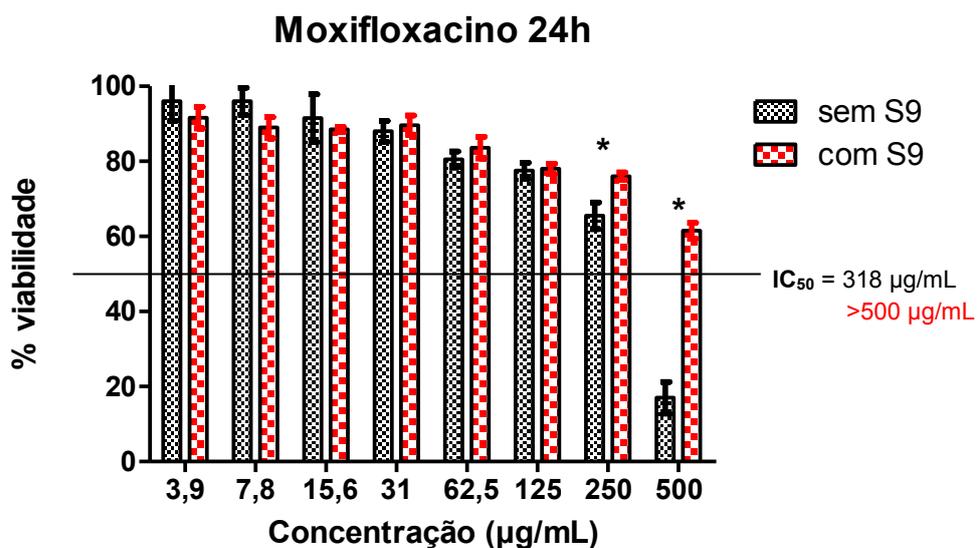


*Diferença estatística significante. Análise de variância One-Way ANOVA com pós teste T student.

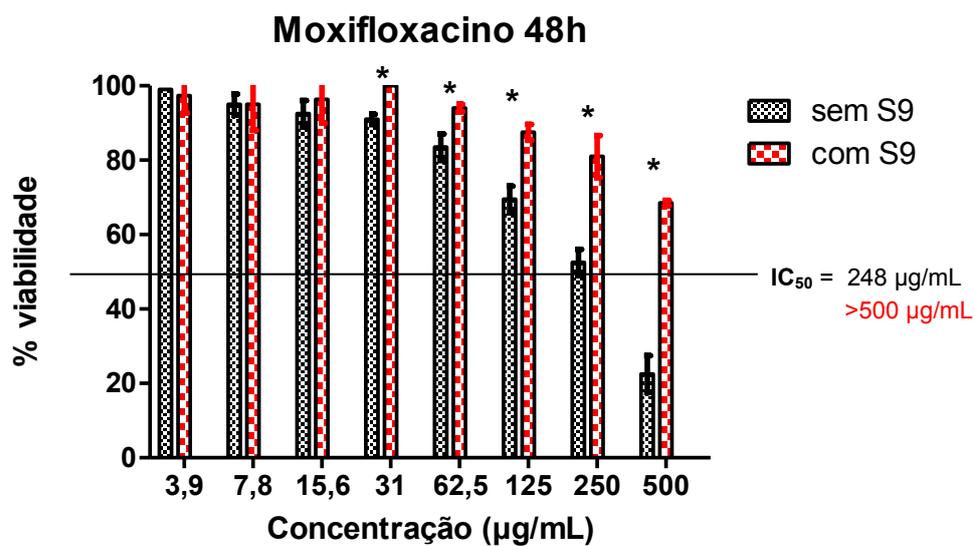
Ao contrário dos outros antibióticos, a moxifloxacino (**gráfico 3**) apresentou uma menor citotoxicidade após o processo de metabolização principalmente quando comparados os três tempos. Após a metabolização e o aumento da exposição às células, sua citotoxicidade foi ainda menor possivelmente devido aos metabólitos formados e suas características específicas.

Os metabólitos demonstraram apresentar uma menor toxicidade quando comparados com o fármaco em si, sabe-se que a moxifloxacino é um fármaco relativamente seguro e seus efeitos adversos são devido à combinações com outros fármacos e tratamentos e específicos para diferentes grupos de risco (RANGE & DALE, 2010; BRUNTON, 2012).

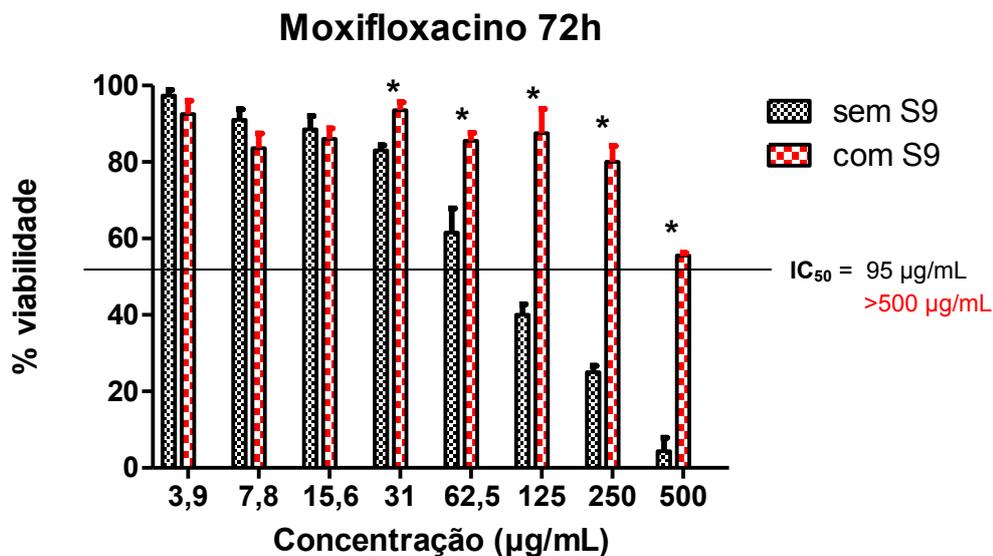
Gráfico 3 - Dose-resposta de macrófagos J774A.1 frente ao fármaco moxifloxacino pelos períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação.



*Diferença estatística significativa. Análise de variância One-Way ANOVA com pós teste T student.



*Diferença estatística significativa. Análise de variância One-Way ANOVA com pós teste T student.



*Diferença estatística significativa. Análise de variância One-Way ANOVA com pós teste T student.

4.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados obtidos pra cada fármaco estão listados na **tabela 2** e no **gráfico 4**. Na tabela abaixo está representada as concentrações inibitória mínima que foi determinada, sendo essa a menor concentração capaz de inibir aproximadamente 90% da multiplicação bacteriana e, nos gráficos a relação da porcentagem de viabilidade micobacteriana pelas concentrações utilizadas.

Com relação ao fármaco amicacina, após a metabolização sua atividade frente à cepa H₃₇RV diminuiu considerando as maiores concentrações permitindo uma maior viabilidade micobacteriana. Sendo um fármaco utilizado por via parenteral no tratamento, há poucas informações acerca da influência do metabolismo de 1ª passagem e as reações de fase I e II nesse fármaco. Esses resultados demonstram que a amicacina pode sofrer ação das enzimas metabólicas hepáticas.

Ambos os fármacos, moxifloxacino e rifampicina, são metabolizados no fígado por enzimas distintas. A moxifloxacino quando metabolizada é convertida a dois metabólitos inativos (MOISE, 2000) o que condiz com os resultados obtidos, sua atividade diminuiu comparada com os resultados onde não há indução do processo de metabolização.

Já a rifampicina, após a metabolização forma dois metabólitos sendo a forma desacetilrifampicina ainda ativa contra micobactérias (SOUZA, 2005) e esse perfil é

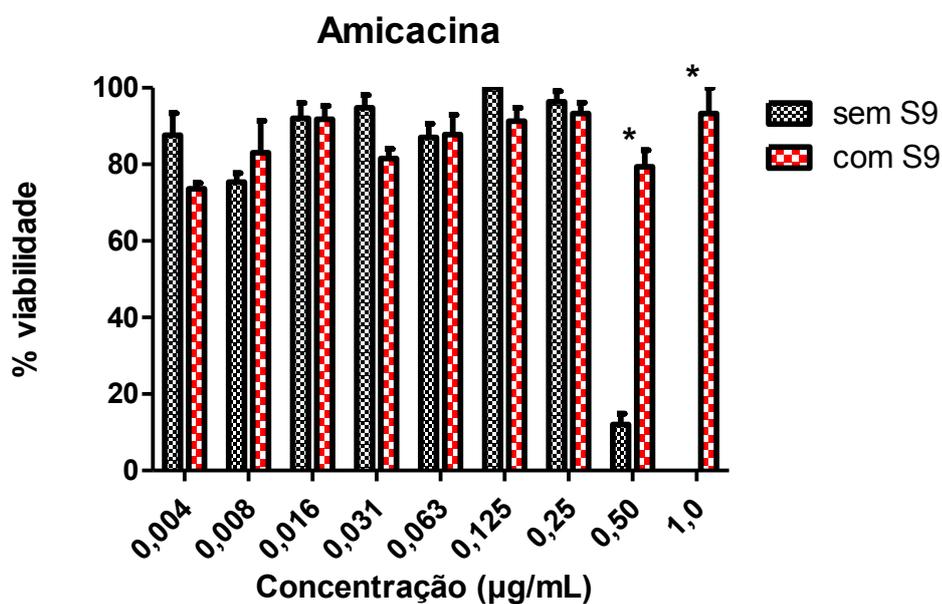
demonstrado no gráfico uma vez que rifampicina e moxifloxacino ainda apresentam um perfil de atividade anti-MTB.

Tabela 2 - Valores de CIM com e sem metabolização.

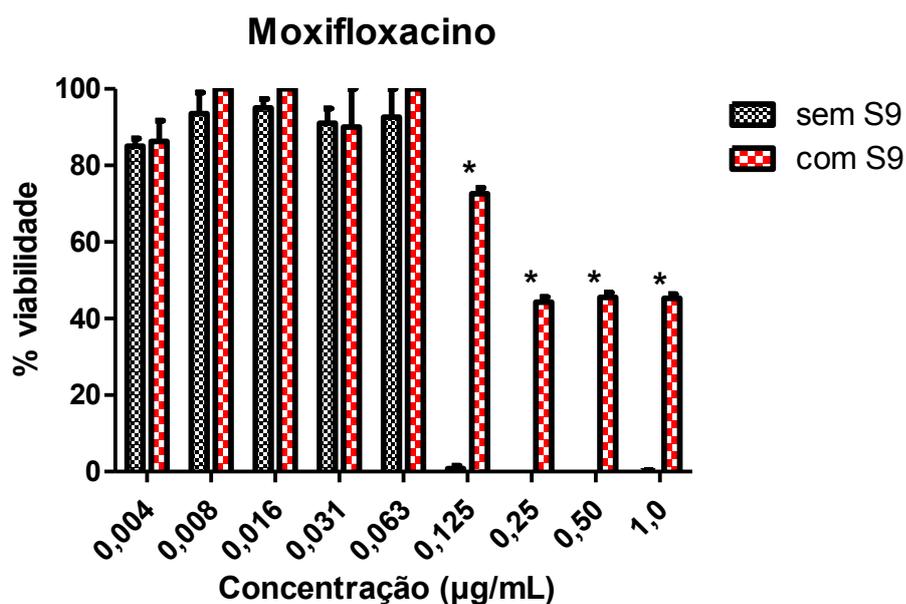
CIM		
Amicacina	sem metabolização	0,7 µg/mL
	após metabolização	> 1 µg/mL
Moxifloxacino	sem metabolização	0,11 µg/mL
	após metabolização	> 1 µg/mL
Rifampicina	sem metabolização	0,13 µg/mL
	após metabolização	> 1 µg/mL

Fonte: Dados do autor.

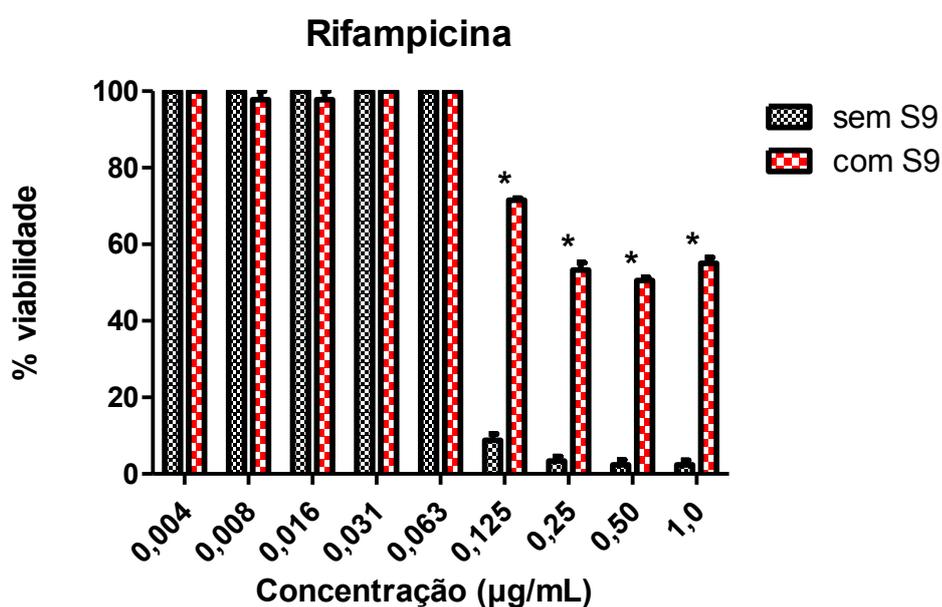
Gráfico 4 - Concentração inibitória mínima dos fármacos amicacina, moxifloxacino e rifampicina antes e após a metabolização.



*Diferença estatística significante. Análise de variância One-Way ANOVA com pós teste T student.



*Diferença estatística significativa. Análise de variância One-Way ANOVA com pós teste T student.



*Diferença estatística significativa. Análise de variância One-Way ANOVA com pós teste T student.

4.3. Atividade intracelular

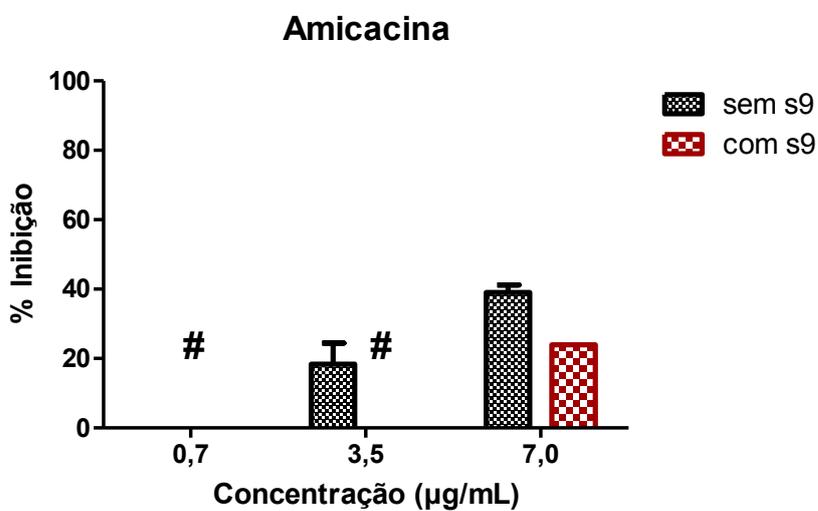
Esses resultados foram obtidos a partir da contagem de UFC após 20 dias de incubação em meio sólido. O **gráfico 5** relaciona a porcentagem de inibição do fármaco em três concentrações diferentes, primeiramente na sua concentração

inibitória mínima (CIM) determinada previamente, em seguida 5 e 10 vezes o valor da CIM.

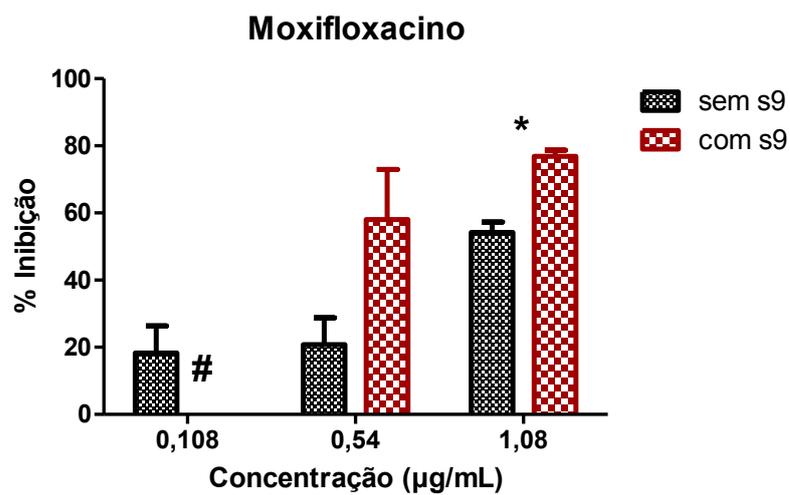
A amicacina é um dos fármacos conhecidos por não apresentar atividade intracelular, apenas extracelular, ou seja, devido a sua polaridade elevada não é capaz de atravessar a membrana celular dos macrófagos e micobactérias (BRUNTON, 2012). Os resultados abaixo demonstraram que a amicacina foi um dos fármacos que apresentou menor porcentagem de inibição em ambas as condições, nos ensaios sem e com a adição da fração S9. Apenas na concentração de 7,0 µg/mL foi possível observar pequena porcentagem de inibição e isso pode ser devido ao aumento significativo da concentração, uma vez que a atividade da amicacina está proporcionalmente relacionada à sua concentração (BRUNTON, 2012).

Por outro lado, a moxifloxacino e a rifampicina são fármacos conhecidos por apresentarem uma atividade intracelular e quando comparados com a amicacina foram os que apresentaram maior porcentagem de inibição, com e sem metabolização prévia e um aumento progressivo junto com as concentrações. Embora seja descrito que os dois metabólitos gerados pelo moxifloxacino não apresentam perfil de atividade, sabe-se que nem todo o fármaco passa pelo processo de metabolização podendo assim ainda apresentar atividade mesmo após a metabolização e o aumento na concentração disponível do fármaco no meio possivelmente favoreceu a passagem pelas membranas celulares levando a uma maior atividade intracelular considerando que não demonstraram citotoxicidade nos ensaios anteriores.

Gráfico 5 - Atividade intracelular dos fármacos amicacina, moxifloxacino e rifampicina antes e após metabolização.

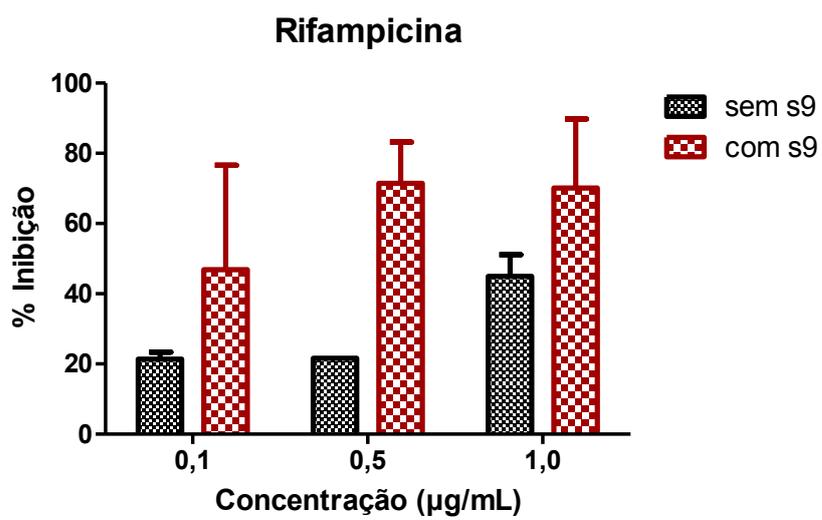


#Não apresentou inibição micobacteriana.



#Não apresentou inibição micobacteriana.

*Diferença estatística significativa. Análise de variância One-Way ANOVA com pós teste T student.



5. Conclusão

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que houve diferença estatística significativa no perfil de citotoxicidade e atividade dos fármacos antes e após a metabolização *in vitro* utilizando a fração S9.

A rifampicina após o processo de metabolização apresentou uma maior citotoxicidade frente à célula estudada e menor atividade quando comparada com os ensaios sem fração S9 e sua atividade intracelular foi ainda maior após o processo de metabolização.

Ao contrário da rifampicina, o moxifloxacino apresentou uma menor citotoxicidade após o processo de metabolização e uma atividade relativamente menor após o processo de metabolização comparado com a atividade prévia. Após a metabolização também foi possível observar um aumento na atividade do fármaco.

Apenas a citotoxicidade da amicacina permaneceu semelhante com e sem o processo de metabolização, porém, sua atividade foi significativamente menor com os ensaios feito com a fração S9, ou seja, possivelmente o processo de metabolização tem influência na atividade desse fármaco. Quanto sua atividade intracelular, não apresentou perfil de atividade significativa com e sem metabolização, considerando que a amicacina é um fármaco já descrito apenas por apresentar atividade extracelular.

Com isso podemos concluir que a utilização da fração S9 é uma possível ferramenta que fornece e amplia informações acerca das características de metabolização de cada substância em estudos *in vitro* para a pesquisa, desenvolvimento e melhoramento de fármacos.

6. Referências Bibliográficas

AMES B. N.; MCCANN J.; YAMASAKI E. METHODS FOR DETECTING CARCINOGENS AND MUTAGENS WITH THE SALMONELLA/MAMMALIAN-MICROSOME MUTAGENICITY TEST. **Elsevier**, 347-364, 1975.

ARBEX M. A.; VARELLA M. C. L.; SIQUEIRA H. R.; DE MELLO F. A. F. Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1: Fármacos de primeira linha. **J Bras Pneumol**, 36(5): 626-640, 2010.

ASHA S.; VIDYAVATHI M. Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs – A Review. **Appl Biochem Biotechnol**, 160:1699–1722, 2010.

ARBEX M. A.; VARELLA M. C. L.; SIQUEIRA H. R.; DE MELLO F. A. F. Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1: Fármacos de segunda linha. **J Bras Pneumol**, 36(5):641-656, 2010.

BARILE F.A. Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods, 1994

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

BLUMBERG H.M.; BURMAN W.J.; CHAISSON R.E.; DALEY C.L.; ETKIND S.C.; FRIEDMAN L.N.; et al. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**.167(4):603-62, 2003.

BRUNTON, L.L. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12ª ed. Rio de Janeiro: **McGraw-Hill**, 2012.

CARRYN S.; CHANTEUX H.; SERAL C.; MINGEOT-LECLERCQ M.P.; VAM BAMBEKE F.; TULKENS P. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. **Infect Dis Clin N Am**. v.17, p.615-634, 2003.

COMAS I.; GAGNEUX S. The past and future of tuberculosis research. **Plos Pathogens** v.5, p.1-7, 2009.

CRUZ-KNIGHT W.; BLAKE-GUMBS L. Tuberculosis: an overview. **Elsevier** v.40, p.743-756, 2013.

CULLEY C.M.; LACY M.K.; KLUTMAN N.; EDWARDS B. Moxifloxacin: Clinical efficacy and safety. **Am J Health-Syst Pharm**. v.58, 2001.

DE MARTINO M.; GALLI L.; CHIAPPINI E. Reflections on the immunology of tuberculosis: will we ever unravel the skein? **BMC Infectious Diseases** , 2014.

GILLESPIE S.H. The role of moxifloxacin in tuberculosis therapy. **Eur Respir Rev.** 25: 19–28, 2015.

GOLETTI D.; PETRUCCIOLI E.; ROMAGNOLI A.; PIACENTINI M.; FIMIA G. M. Autophagy in Mycobacterium tuberculosis infection: A passepartout to flush the intruder out? **Elsevier** p.335-343, 2013.

GUENGERICH F.P.; MARTIN M.V.; BEAUNE P.H.; KREMERS P.; WOLFF T.; WAXMAN D.J. Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. **J Biol Chem** ;261:5051 – 60

GUENGERICH F.P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chem Res Toxicol** 14:611–650, 2001.

GUIMARÃES D.O.; MOMESSO L.S.; PUPO M.T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova.** v.33, No. 3, 667-679, 2010.

HMAMA Z.; PENA-DIAZ S.; JOSEPH S.; AV-GAY Y. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by Mycobacterium tuberculosis. **Immunol. Review** v.264, p.220-232, 2015.

JAYARAM R.; SHANDIL R.K.; GAONKAR S.; KAUR P.; SURESH B.L.; MAHESH B.N.; JAYASHREE R.; NANDI V.; BHARATH S.; KANTHARAJ E.; BALASUBRAMANIAN V. Isoniazid pharmacokinetics pharmacodynamics in an aerosol infection model of tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother** 48, 2951 7, 2004.

KEANE J.; BALCEWICZ-SABLINSKA M.K.; REMOLD H.G.; CHUPP G.L.; MEEK B.B.; FENTON M.J.; KORNFIELD H. Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. **Infect. Immun.** 65: 298–304, 1997.

KESHAVJEE S.; FARMER P. Tuberculosis, drug, resistance, and the history of modern medicine. **N Engl J Med** ; v.367(10):931e6, 2012.

LI AP.; HARTMAN N.R.; LU C.; COLLINS J.M.; STRONG J.M. Effects of cytochrome P450 inducers on 17 α -ethynyl-19-nortestosterone (EE2) conjugation by primary human hepatocytes. **Br J Clin Pharmacol** ;48:733 – 42, 1999.

LEMOES A.J.G.; TRINDADE E.J. Interferências no efeito farmacológico mediadas pelas biotransformações dos citocromos P450. **Revista Científica do ITPAC.** v.7, n.2, 2014.

MASON R. J.; BROADDUS V. C.; MARTIN T.R.; KING T.E.; SCHRAUFNAGEL D. E.; MURRAY J.F.; NADEL J. A. Tuberculosis. In: Murray JF, Nadel JA, editors. Murray and Nadel's textbook of respiratory medicine. 5th ed. St. Louis (MO): Saunders **Elsevier**; 2010.

MOISE P.A.; BIRMINGHAM M.C.; SCHENTAG J.J.; Pharmacokinetics and metabolism of moxifloxacin, 2000.

MOLINA-TORRES C. A.; BARBA-MARINES A.; VALLES-GUERRA O.; OCAMPO-CANDIANI J.; CAVAZOS-ROCHA N.; PUCCI M. J.; CASTRO-GARZA J.; VERA-CABRERA L. Intracellular activity of tedizolid phosphate and ACH-702 versus Mycobacterium tuberculosis infected macrophages. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 2014

PALOMINO J.C.; 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.46(8), p.270-2722, 2002.

PAVAN F. R.; MAIA P.I.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, p. 1898–1905, 2010.

PORCEL J.M. Tuberculous pleural effusion. **Lung**, 187:263-70, 2009.

RANG H. P. et al. **Farmacologia**. 7. ed. Londres: Elsevier, 2012. 804 p.

RAMASWAMY S, MUSSER JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. **Tuber Lung Dis**. 79(1):3-29, 1998.

RUSSEL D. G. Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a chronic infection. **Immunol. Review** v.240(1), p.252-268, 2011.

SOUZA M. V. N.; Rifampicina, um importante fármaco no combate à tuberculose. **Rev. Bras. Farm.** (86) 3: 92-94, 2005.

SNEWIN V.A.; GARES M.; GAORA P.O.; HASAN Z.; BROWN I.N.; YOUNG D.B. Assessment of immunity to microbial infection with luciferase reporter constructs. **Infection and Immunity** v. 67(9), p. 4586-4593, 1999.

THEE S.; GARCIA-PRATS A.J.; DRAPER H.R.; et al. Pharmacokinetics and safety of moxifloxacin in children with multidrug-resistant tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**. v.60 (4):5, p.49-56, 2014.

VERGNE I.; CHUA J.; SINGH S. B.; DERETIC V. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** v.20, p.367-394, 2004.

WALLACE Jr. R.C.; GRIFFITH D.E. Antimycobacterial agents. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone. **Elsevier**, p.533-48, 2009.

WEISS G.; SCHAIBLE U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunol. Review** v.264, p.182-203, 2015.

World Health Organization. c1948. Tuberculosis fact sheet. In: Geneva(Switzerland): WHO global TB programme; 2017.

World Health Organization. The Treatment of Tuberculosis Guidelines. Geneva: World Health Organization, 2010.

YOSHIHARA S.; MAKISHIMA M.; SUZUKI N.; OHTA S. Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction. **Toxicol Sci** ;62:221 – 7, 2001.

ZHANG Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 45:529-64, 2005.

ZHANG Y.; MITCHISON D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. **Int J Tuberc Lung Dis**, 2003.