

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA - CBIOTEC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MARIA GABRIELLA SILVA SIDRÔNIO

**REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE
COMPOSTOS ANTIMALÁRICOS**

**JOÃO PESSOA - PB
2020**

MARIA GABRIELLA SILVA SIDRÔNIO

**REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE
COMPOSTOS ANTIMALÁRICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba –
UFPB, como requisito parcial para obtenção do Título de
Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Junior

JOÃO PESSOA- PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S569r Sidrônio, Maria Gabriella Silva.

Reposicionamento de fármacos para o tratamento da tuberculose : avaliação da atividade antimicobacteriana de compostos antimaláricos / Maria Gabriella Silva Sidrônio. - João Pessoa, 2020.

70 f. : il.

Orientação: Valnês da Silva Rodrigues Junior.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Tuberculose - Tratamento. 2. Reposicionamento de fármacos. 3. Antimaláricos. 4. Mycobacterium tuberculosis. I. Rodrigues Junior, Valnês da Silva. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616-002.5(043)

MARIA GABRIELLA SILVA SIDRÔNIO

**REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE
COMPOSTOS ANTIMALÁRICOS**

Avaliado em 22 de dezembro de 2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Junior – PGBiotecM/UFPB

Orientador

Prof^a. Dr^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa – PGBiotecM/UFPB

Membro Interno

Prof^a. Dr^a. Priscila Lamb Wink - UFRGS

Membro Externo

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, Maria do Socorro e Rafael Sidrônio, por todo o amor e luta para que sempre tivesse a melhor educação possível.

Aos meus irmãos Rafael e Alline, por sempre me apoiarem e incentivarem.

Ao meu orientador Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Junior, por ter acreditado em mim e no meu potencial e por todo o conhecimento em mim depositado, dedicação e compreensão.

A graduanda Ana Paula Oliveira, pelos auxílios prestados durante a realização de todos experimentos, em especial durante os últimos meses.

Aos meus amigos por compreenderem a minha ausência e sempre me incentivarem, em especial Gabriella Jerônimo e Josefa Luana.

A Azene e Lídia por me auxiliarem e me receberem em João Pessoa, sem vocês essa jornada seria bem mais difícil.

A professora Thamara Melo, por me incentivar a ingressar no mestrado.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por todo o conhecimento compartilhado.

Aos pesquisadores do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), pela parceria.

À banca por aceitarem participar desse momento tão importante para mim e por todas as contribuições.

“Onde há amor e sabedoria, não
existe temor nem ignorância.”

(São Francisco de Assis)

RESUMO

Mycobacterium tuberculosis é o patógeno causador da tuberculose, uma doença infecto contagiosa, que se propaga através das vias aéreas de indivíduos infectados. A tuberculose é uma das principais causas de morte em todo o mundo e um dos fatores que contribuem para essa condição é o surgimento de cepas resistentes a terapia recomendada para tratar esta doença. A fim de diminuir as altas taxas de incidência de tuberculose, pesquisadores buscam novas alternativas para o tratamento da tuberculose. Nesse sentido, alguns estudos apontam que antimaláricos como cloroquina, mefloquina e primaquina possuem atividade antimicrobiana contra cepas de *M. tuberculosis*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as atividades antimicobacterianas de primaquina, cloroquina, mefloquina e tafenoquina, em cepas de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* mc2155. Inicialmente, os antimaláricos foram incubados com *M. tuberculosis* H37Ra e *M. smegmatis*, a fim de determinar suas concentrações inibitórias mínimas. As atividades das moléculas-teste foram comparadas entre si e com fármacos usados no tratamento da tuberculose. Adicionalmente, foram realizados testes combinatórios envolvendo a molécula antimalárica de maior potencial, a tafenoquina, e fármacos usados no tratamento da tuberculose. Após a determinação das moléculas antimaláricas de maior potencial, suspensões de *M. tuberculosis* H37Ra foram submetidas a modelos de estresse e dormência. Também foram realizados experimentos a fim de determinar uma curva de morte do antimalárico de maior potencial em *M. tuberculosis* H37Ra. Ainda foram realizados testes, a fim de determinar a concentração inibitória mínima em cepas resistentes e virulentas de *M. tuberculosis*, bem como testes para determinar o alvo molecular do antimalárico de maior potencial nesses microrganismos. Após a realização destes ensaios, foi possível concluir que todas os fármacos da primaquina, cloroquina, mefloquina e tafenoquina apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas de *M. tuberculosis*, bem como *M. smegmatis*, no entanto os fármacos da mefloquina e tafenoquina foram consideradas os de maior potencial. Em relação aos testes combinatórios, foi possível observar que a mefloquina quando combinada com tafenoquina, apresentam efeito sinérgico em *M. tuberculosis*. Após a realização dos experimentos em bactérias submetidas a modelos de estresse e dormência, foi possível observar que os fármacos tafenoquina e mefloquina apresentam atividade antimicrobiana em suspensões de *M. tuberculosis* submetidas a estresse nitrosativo e à depleção de nutrientes. Adicionalmente foi possível observar que tafenoquina, bem como a mefloquina apresentam atividade em cepas resistentes e virulentas de *M. tuberculosis*. A atividade satisfatória dos antimaláricos em cepas de *Mycobacterium* spp. sugere que estes fármacos podem ser considerados candidatos promissores para o tratamento da tuberculose.

Palavra- chaves: *Mycobacterium tuberculosis*, reposicionamento de fármacos, antimaláricos.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis is the pathogen that causes tuberculosis, a contagious infectious disease that spreads through the airways of infected individuals. Tuberculosis is a leading cause of death worldwide and one of the factors that contribute to this condition is the emergence of strains resistant to the recommended therapy to treat this disease. In order to reduce the high incidence rates of tuberculosis, researchers are looking for new alternatives for the treatment of tuberculosis. In this sense, some studies indicate that antimalarials such as chloroquine, mefloquine and primaquine have antimicrobial activity against strains of *M. tuberculosis*. This study aimed to evaluate the antimycobacterial activities of primaquine, chloroquine, mefloquine and tafenoquine, in strains of *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* mc2155. Initially, antimalarials were incubated with *M. tuberculosis* H37Ra and *M. smegmatis*, in order to determine their minimum inhibitory concentrations. The activities of the test molecules were compared with each other and with drugs used in the treatment of tuberculosis. Additionally, combinatorial tests were carried out involving the antimalarial molecule with the greatest potential, tafenoquine, and drugs used in the treatment of tuberculosis. After determining the antimalarial molecules with the greatest potential, suspensions of *M. tuberculosis* H37Ra were subjected to models of stress and starvation. Experiments were also carried out in order to determine a death curve for the most potential antimalarial in *M. tuberculosis* H37Ra. Tests were also carried out in order to determine the minimum inhibitory concentration in resistant and virulent strains of *M. tuberculosis*, as well as tests to determine the molecular target of the most potential antimalarial in these microorganisms. After these tests, it was possible to conclude that all drugs of primaquine, chloroquine, mefloquine and tafenoquine showed antimicrobial activity against strains of *M. tuberculosis*, as well as *M. smegmatis*, however the drugs of mefloquine and tafenoquine were considered to be greatest potential. Regarding combinatorial tests, it was possible to observe that mefloquine, when combined with tafenoquine, has a synergistic effect in *M. tuberculosis*. After carrying out experiments on bacteria submitted to stress and dormancy models, it was possible to observe that the drugs tafenoquine and mefloquine have antimicrobial activity in suspensions of *M. tuberculosis* subjected to nitrous stress and nutrient depletion. Additionally, it was possible to observe that tafenoquine, as well as mefloquine, present activity in resistant and virulent strains of *M. tuberculosis*. The satisfactory activity of antimalarials in strains of *Mycobacterium spp.* suggests that these drugs may be considered promising candidates for the treatment of tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, drug repositioning, antimalarials.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL- Microlitros

μM- Micromolar

CIF- Concentração inibitória fracionada

CQ- Cloroquina

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ESTR- Estreptomicina

ETB- Etambutol

HIV- Síndrome da imunodeficiência adquirida

ICIF- Índice de concentração inibitória fracionada

INH- Isoniazida

MDR- TB- Tuberculose resistente a múltiplos fármacos

MEF- Mefloquina

MIC- Concentração inibitória mínima

mM- Milimolar

MOX- Moxifloxacina

Msm- *Mycobacterium smegmatis*

Mtb- *Mycobacterium tuberculosis*

OD- Densidade Ótica

OMS- Organização Mundial da Saúde

PBS- Salina Tamponada com Fosfato

PQ- Primaquina

REMA- Ensaio de microplaca com resazurina

RIF- Rifampicina

TB- Tuberculose

TQ- Tafenoquina

XDR- TB- Tuberculose extensivamente resistente a fármacos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 2- Representação da estimativa de incidência mundial dos casos de tuberculose, no ano de 2019.

Figura 3- Representação dos 8 países com maior incidência nos casos totais tuberculose.

Figura 4- Representação dos estados brasileiros com maior incidência de tuberculose (em cada 100 mil habitantes).

Figura 5- Mecanismo de ação de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose.

Figura 6- Representação em porcentagem da incidência de tuberculose resistente a rifampicina e isoniazida (MDR-TB) no mundo.

Figura 7- Estrutura química dos antimaláricos avaliados no estudo.

Figura 8- Teste de combinação entre tafenoquina e moxifloxacina contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Figura 9- Teste de combinação entre tafenoquina e rifampicina contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Figura 10- Teste de combinação entre tafenoquina e isoniazida contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Figura 11- Teste de combinação entre tafenoquina e etambutol contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Figura 12- Teste de combinação entre tafenoquina e estreptomicina contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Figura 13- Teste de combinação entre tafenoquina e mefloquina contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Figura 14- Curva de morte da tafenoquina (TQ) contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, durante 14 dias.

Figura 15- Atividade antimicobacteriana dos fármacos tafenoquina (TQ), mefloquina (MEF), rifampicina (RIF) e isoniazida (INH) contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (A) e H37Ra submetida ao modelo de depleção de nutrientes (B).

Figura 16- Atividade antimicrobacteriana dos fármacos tafenoquina (TQ), mefloquina (MEF), rifampicina (RIF) e isoniazida (INH) contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (A) e H37Ra submetida ao modelo de estresse nitrosativo (B).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Representação das concentrações de cada solução para determinar as concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos antimaláricos e antituberculosos.

Tabela 2- Valores da concentração inibitória fracionada (ICIF) correspondentes às diferentes interações

Tabela 3- Concentrações de tafenoquina (TQ) utilizadas para o tratamento das suspensões de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, para determinação da cinética de morte.

Tabela 4- Concentrações dos fármacos isoniazida (INH), rifampicina (RIF), tafenoquina (TQ) e mefloquina (MEF) utilizadas para o tratamento das suspensões de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra submetidas ao estresse nitrosativo e à depleção de nutrientes.

Tabela 5- Sumário das características genotípicas e fenotípicas dos 3 isolados clínicos usados neste estudo, bem como a cepa de H37Rv.

Tabela 6- Resultados das concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos antituberculosos usados como controles positivos para a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Tabela 7- Resultados das concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos antituberculosos usados como controles positivos para a cepa de *Mycobacterium smegmatis* mc2155.

Tabela 8- Resultados das concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos antimaláricos testados na cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Tabela 9- Resultados das concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos antimaláricos testados na cepa de *Mycobacterium smegmatis* mc2155.

Tabela 10- Resultados obtidos após a combinação da molécula antimalárica de maior potência, tafenoquina (TQ), com os fármacos antituberculosos e com a segunda droga mais potente, a mefloquina (MEF), contra *M. tuberculosis* H37Ra.

Tabela 11- Concentração inibitória mínima de tafenoquina (TQ) e mefloquina (MEF) contra a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a fármacos.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	12
1.1-<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
1.2-TUBERCULOSE	13
1.2.1- CARACTERÍSTICAS GERAIS	13
1.2.2- EPIDEMIOLOGIA NO MUNDO	15
1.2.3- EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL.....	16
1.2.4- TRATAMENTO.....	17
1.2.3- RESISTÊNCIA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
1.3 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS	22
1.3.1- FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS	22
1.3.1.1- PRIMAQUINA.....	23
1.3.1.2- CLOROQUINA.....	23
1.3.1.3- MEFLOQUINA.....	24
1.3.1.4- TAFENOQUINA.....	25
2- JUSTIFICATIVA	28
3-OBJETIVOS	29
3.1- OBJETIVO GERAL	29
3.2- OBJETIVOS ESPECIFICOS	29
4- MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1- Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) dos compostos antimaláricos em <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e em <i>Mycobacterium smegmatis</i>	30
4.2- Combinação da molécula de maior atividade com medicamentos anti-tuberculosos (anti-TB) usados clinicamente	31
4.3- Cinética de morte das bactérias frente ao antimalárico mais potente	32
4.4- Avaliação dos efeitos das moléculas com maior potencial antimicrobiano usando bactérias submetidas a modelos de dormência, como depleção de nutrientes e estresse	33
4.5- Concentração inibitória mínima dos compostos antimaláricos de maior potencial frente a cepas resistentes e virulentas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	35
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1- Determinação das MIC dos antimaláricos e antituberculosos em cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra e <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc2155	36
5.2- Determinação da molécula de maior atividade combinada a medicamentos anti-TB usados clinicamente e a mefloquina	41

5.3- Cinética de morte das bactérias frente ao antimalárico mais potentes	47
5.4 - Efeitos das moléculas com maior potencial antimicrobiano em cepas bacterianas submetidas a modelos de dormência, como depleção de nutrientes e estresse nitrosativo.	49
5.5- Concentrações Inibitórias Mínimas dos compostos antimaláricos de maior potencial frente a cepas resistentes em <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	53
6- CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1- INTRODUÇÃO

1.1-*Mycobacterium tuberculosis*

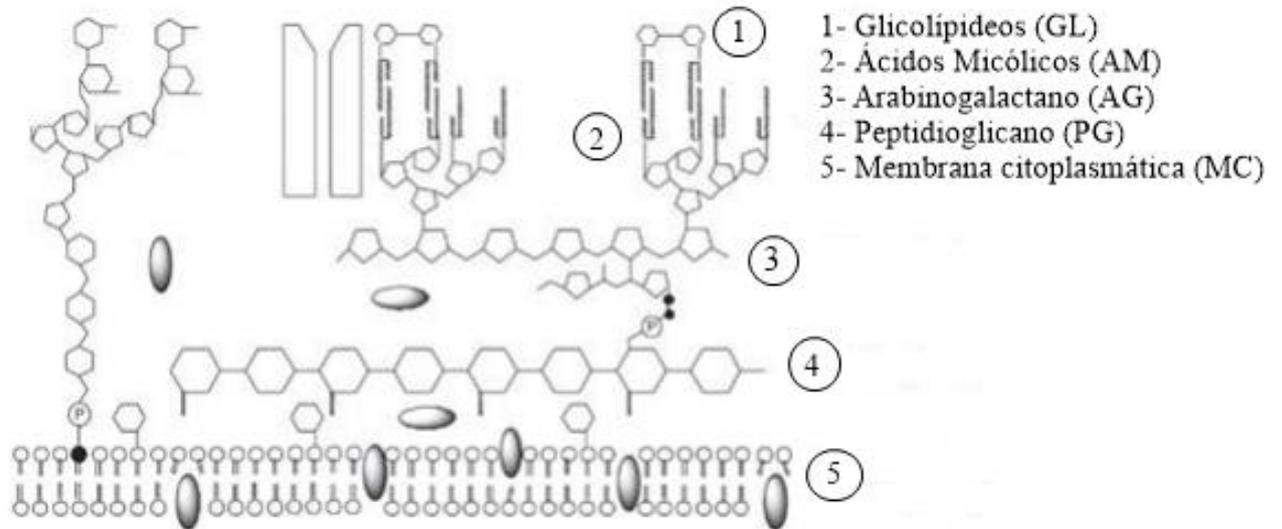
Mycobacterium tuberculosis é um bastonete anaeróbio facultativo, de parasitismo intracelular, que se propaga em tecidos com altas taxas de concentração de oxigênio, hidrogênio, carbono, magnésio e enxofre (OLIVEIRA, 2018). O táxon de *Mycobacterium* é complexo e inclui *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. canettii*, considerados patógenos humanos; também nesse táxon pode-se citar a presença de *M. pinnipeddi*, *M. microti* e *M. smegmatis*. Esse conjunto de microrganismo formam um pequeno e discreto grupo que exibem mais de 95 % de homologia no que diz respeito aos seus ácidos nucleicos (BAÑULS *et al.*, 2015).

M. tuberculosis foi descrito, pela primeira vez por Robert Koch em 1882 (PAI *et al.*, 2016) e, desde então, esta bactéria passou a ser conhecida como o bacilo de Koch (CAMBAU; DRANCOURT, 2014). Esse bacilo infecta as células do sistema mononuclear fagocitário (LUGO-VILLARINO; NEYROLLES, 2014) podendo sobreviver sob baixa atividade metabólica, devido à capacidade de persistência apresentada por estes microrganismos. A presença desta característica está associada à habilidade de *M. tuberculosis* em assimilar e utilizar lipídeos (ácidos graxos e colesterol) dos seus hospedeiros em forma de reservas energéticas (WILBURN; FIEWEGER; VANDERVEN, 2018).

Além de apresentar esta característica singular de sobrevivência, *M. tuberculosis* apresenta em sua estrutura uma resistente parede celular que está relacionada ao desenvolvimento da infecção e apresentação de uma baixa taxa de crescimento bacteriano, bem como ao aumento da virulência desses microrganismos (SINGH *et al.*, 2017). A parede celular de *M. tuberculosis* é constituída principalmente por lipídios (Figura 1), que formam uma camada serosa e resistente à água (QUEIROZ; RILEY, 2016).

A formação da camada serosa em *M. tuberculosis* provoca uma objeção na passagem de nutrientes para o interior das células, além de impedir a excreção de resíduos dos produtos metabólicos para fora da célula (BRENNAN, 2003). Dessa forma, a camada serosa torna as bactérias resistentes ao ressecamento, além de conferir resistência à digestão por fagócitos, permitindo assim que as bactérias se multipliquem no interior desses fagócitos, sem que fármacos sejam capazes entrar na célula (TORTORA, 2016).

Figura 1- Representação esquemática da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis*.



GL: desempenha papel estrutural na membrana das micobactérias; AM: responsáveis pela morfologia do bacilo; PG: confere rigidez a parede celular; AG: polissacarídeo formado por galactose e arabinose, abundante na parede celular das *Mycobacterium* e das plantas, entretanto seu mecanismo não está totalmente evidenciado; MC: responsável pelo transporte e seleção de substâncias. Fonte: Adaptado de Mota, 2011.

A interação entre *M. tuberculosis* e as células do hospedeiro é extremamente complexa, sendo determinada em parte pela virulência da cepa, mas também pela presença de resistência no hospedeiro; entretanto, tem-se ideia que a imunidade mediada por células desempenha um papel importante no desenvolvimento da tuberculose (NOGUEIRA *et al.*, 2012).

1.2-TUBERCULOSE

1.2.1- CARACTERÍSTICAS GERAIS

A tuberculose (TB) é uma doença bacteriana infectocontagiosa crônica, transmitida pela inalação de gotículas contendo o bacilo de Koch (PAI *et al.*, 2016), se caracteriza como uma patologia que acomete em especial as vias aéreas de indivíduos infectados, em virtude das condições ideais de crescimento bacteriano, apresentadas no pulmão (GUPTA; KUMAR; AGRAWAL, 2018).

Após as primeiras descrições de infecções por TB, esta doença apresentou uma intensa progressão mundial com aumento dos índices de infecção pelo bacilo cresceram. Durante a

revolução industrial, a disseminação da TB se deu em especial pelas condições socioeconômicas precárias, bem como a alta aglomeração de pessoas em locais de trabalho (BARBIER; WIRTH, 2016). Após estudos para maior entendimento sobre o patógeno causador da TB, o movimento sanitário, assim como o surgimento de estudos envolvendo a descoberta de quimioterápicos e novos antibióticos (MURRAY; SCHRAUFNAGE; HOPEWELL, 2015), além da melhoria nas condições de moradia e nutrição, devido ao desenvolvimento econômico, contribuíram para o declínio no nível de infecção mundial, em especial em países com súbita evolução social, onde se acreditou na eliminação definitiva desta doença (DANIEL, 2006).

Entretanto, ocorreu um crescimento nos casos de TB, a partir da década de 80, em decorrência da disseminação da infecção pelo HIV no mundo (POKROVSKY, 2017). A coinfeção por *M. tuberculosis* e o HIV levam a uma deterioração do sistema imunológico dos seus hospedeiros, favorecendo o estabelecimento de novas doenças infecciosas, tornando assim a infecção pelo HIV o maior fator de risco para a progressão da infecção latente da TB (BRUCHFELD; CORREIA-NEVES; KALLENIOUS, 2015).

Leite Júnior *et al.*, (2017), definem que a infecção latente da TB se caracteriza por um estado persistente de resposta imune, onde existe ativação do sistema imunológico por parte de antígenos de *M. tuberculosis*, entretanto não se tem a presença de manifestações clínicas (LEITE JUNIOR *et al.*, 2017). Contudo, a ausência de sintomas não exclui a possibilidade do desenvolvimento da TB ativa por parte destes indivíduos (BUSATTO *et al.*, 2016). O desenvolvimento da TB ativa nos portadores da infecção latente ocorre em apenas 10 % dos seres humanos expostos ao bacilo de Koch (SALGAME *et al.*, 2015).

O desenvolvimento da infecção pulmonar por *M. tuberculosis* ocorre ao contato do bacilo de Koch em uma via aérea terminal, resultando em um processo inflamatório pulmonar denominado de foco parenquimatoso. A partir desse foco, os microrganismos se alastram através do sistema linfático até a circulação sistêmica, podendo sobreviver dentro dos órgãos-alvo por longos períodos (PAI *et al.*, 2016). O curso futuro da TB ativa depende do equilíbrio dinâmico entre a imunidade do hospedeiro e o patógeno; diversos fatores influenciam no equilíbrio entre a infecção latente da TB e a progressão para a TB ativa, tal como idade, estado nutricional, vacinação com BCG e estado imunológico (CARVALHO *et al.*, 2018).

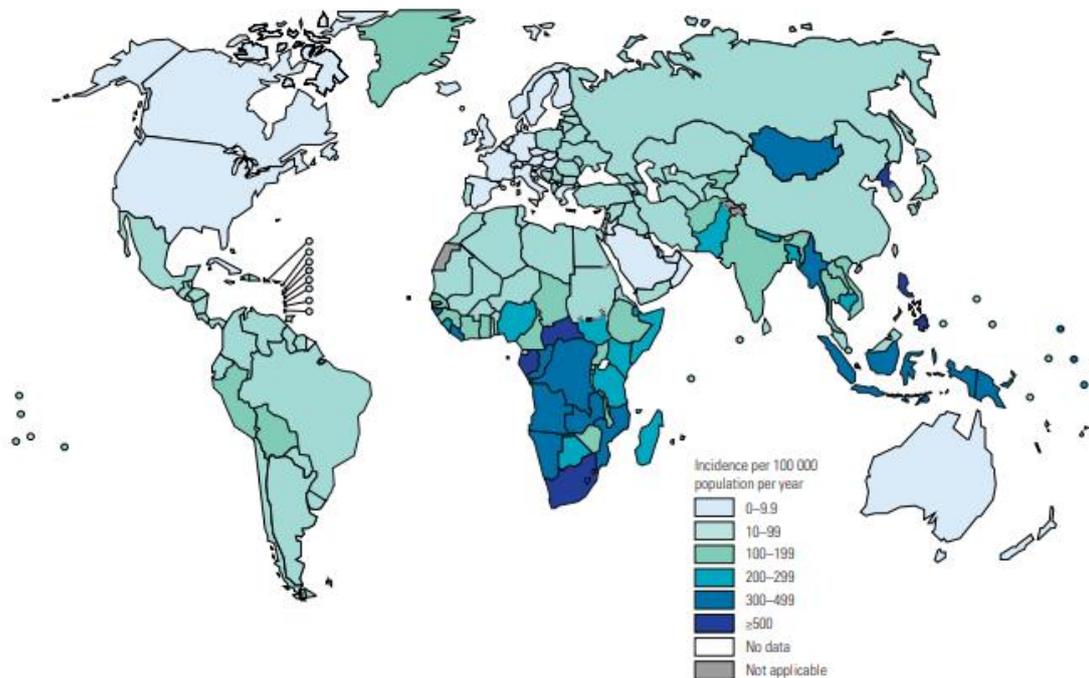
Os primeiros relatos de infecção em órgãos como a pleura e o fígado foram relatados na década de 90, quando a TB foi a segunda causa de mortalidade naquela época, ocasionando um decreto da OMS, devido à alta capacidade de infecção desse microrganismo, sendo necessária

a implementação de formas terapêuticas e profiláticas em todos os países no mundo (NGUTA *et al.*, 2015). Além de poder infectar outros órgãos do corpo humano, a infecção assintomática expõe alto risco para o indivíduo infectado, pois pode evoluir para a TB ativa (PAI *et al.*, 2016).

1.2.2- EPIDEMIOLOGIA NO MUNDO

Segundo dados presentes no relatório global da TB, disponibilizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no ano de 2020, cerca de um terço da população mundial é afetada pela condição latente da doença. Além de apresentar alto índices de prevalência dessa patologia em condição latente, em 2019 a OMS estimou que 10 milhões de pessoas desenvolveram a TB ativa mundialmente (Figura 2), e 1,2 milhões de pessoas morreram em decorrência desta patologia (WHO, 2020).

Figura 2- Representação da estimativa de incidência dos casos de tuberculose mundial no ano de 2019.



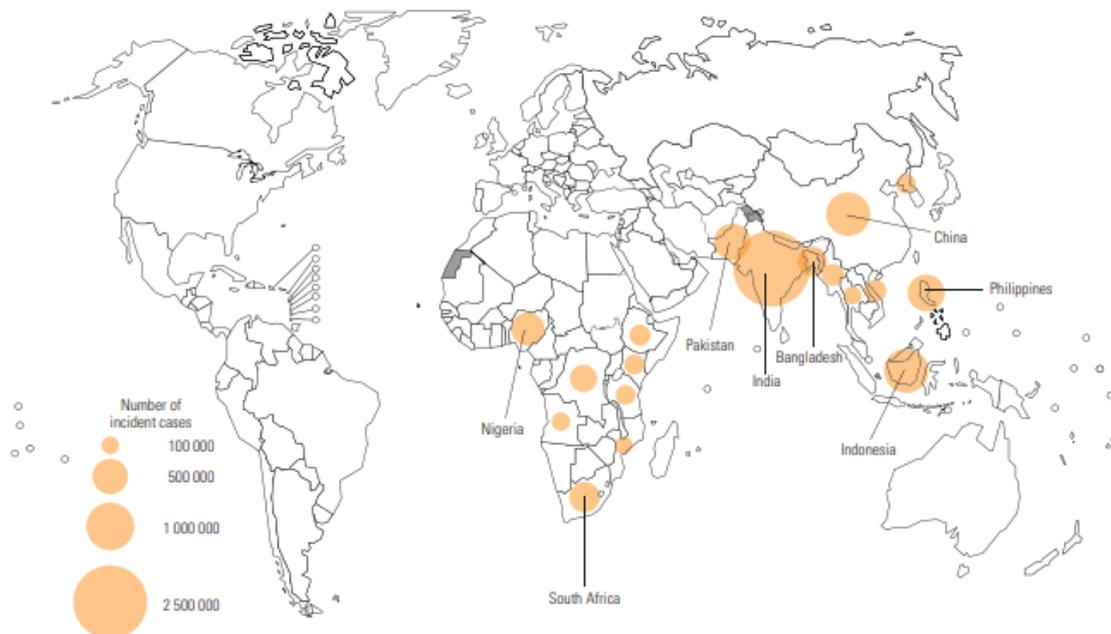
Fonte: Extraído do Relatório Global de Tuberculose (2020).

Globalmente, o número estimado de 10 milhões pessoas que adoeceram com TB em 2019 são considerados números relativamente estáveis em comparação com os últimos anos,

podendo- se afirmar que, em relação ao ano de 2018, houve uma diminuição de 2,3 %. Entre todos os casos de TB, cerca de 8,2 % dos casos notificados à OMS no ano de 2019 foram de portadores do HIV; entretanto o HIV não pode considerado fator crucial para o desenvolvimento da TB. Sabe- se que este microrganismo infecta pessoas de ambos os sexos em todas as faixas etárias, tendo o maior ônus nos homens (com idade ≥ 15 anos), que representaram 56 % de todos os casos de TB notificados em 2019 (WHO, 2020).

Geograficamente, a maioria dos casos de TB, em 2019, ocorreu no Sudeste Asiático (44 %), África (25 %) e na região do Pacífico Ocidental (18 %), com porcentagens menores em Mediterrâneo Oriental (8,2 %), Américas (2,9 %) e Europa (2,5 %). Oito países representaram dois terços do total global (Figura 3), sendo estes: Índia (26 %), China (9 %), Indonésia (8,5 %), Filipinas (6 %), Paquistão (5,7 %), Nigéria (4,4 %), Bangladesh (3,6 %) e África do Sul (3,6 %); juntamente com outros 22 países da lista da OMS, completam os 30 países com elevados números de casos de TB (WHO, 2020).

Figura 3- Representação dos 8 países com maior incidência nos casos totais de tuberculose.



Fonte: Extraído do Relatório Global de Tuberculose (2020).

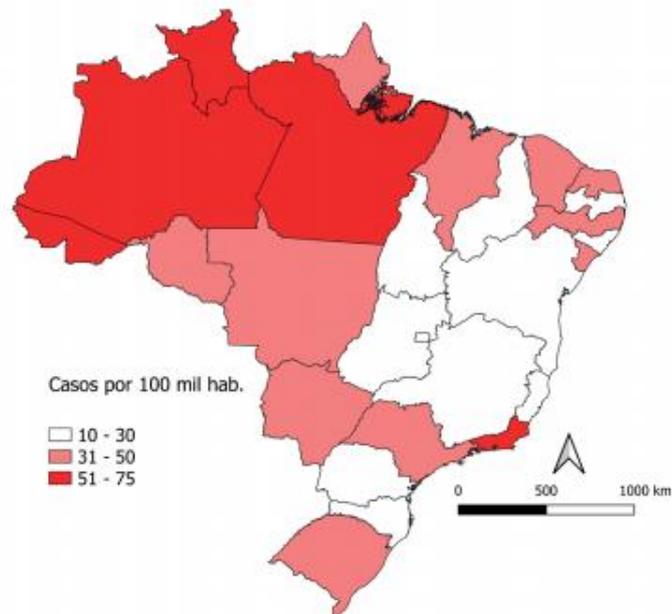
1.2.3- EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL

Segundo dados presentes no Boletim Epidemiológico publicado em março de 2020, divulgado pelo Ministério da Saúde juntamente com a Secretaria de Saúde, no Brasil, em 2019,

foram diagnosticados 73.864 novos casos da doença, perfazendo um coeficiente de incidência de 35 casos/100 mil habitantes. As regiões Norte e Nordeste (Figura 4) apresentam os maiores percentuais de casos novos de TB, sendo assim considerado um problema de saúde pública no Brasil e no mundo (BRASIL, 2020).

Em 2019, foram registrados 4.490 óbitos em decorrência da doença, o que equivale a um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos/100 mil habitantes. Desde 2010, o número de óbitos por TB no Brasil variou de 4.400 a 4.600. Ainda, em 2019, nove estados apresentaram coeficiente de mortalidade por TB próximo ou superior ao coeficiente médio do país, sendo estes os estados: Amazonas, Rio de Janeiro, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Pará, Maranhão, Rio Grande do Norte, Ceará e Acre. Nessa perspectiva, as respectivas capitais desses estados também apresentaram os maiores coeficientes de mortalidade quando comparadas às demais capitais do país (BRASIL, 2020).

Figura 4- Representação dos estados brasileiros com maior incidência de tuberculose no ano de 2019 (em cada 100 mil habitantes).



Fonte: Extraído do Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde (2020).

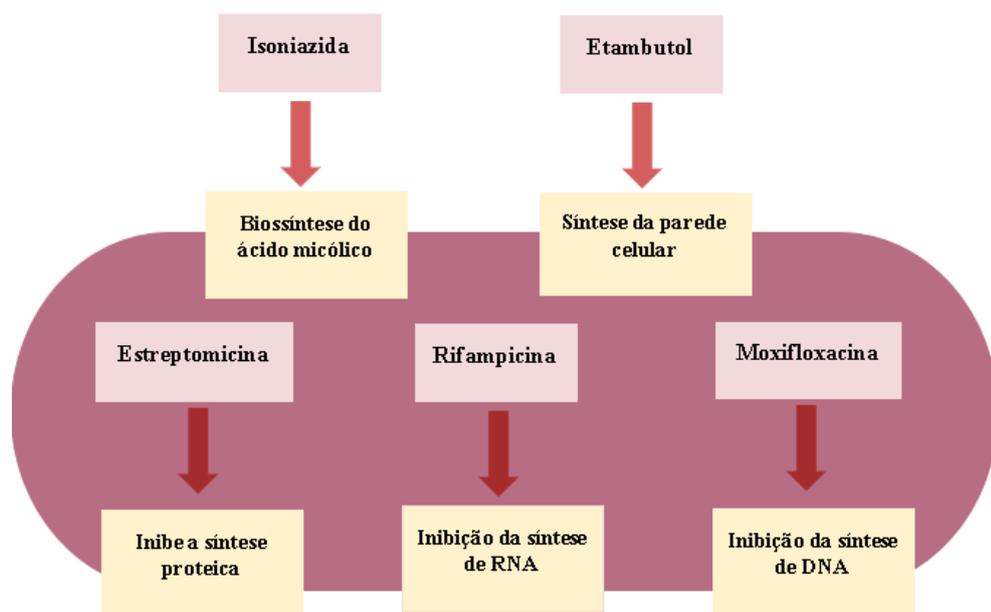
1.2.4- TRATAMENTO

Os medicamentos utilizados no tratamento da TB são divididos em dois grupos principais, os agentes de primeira linha, fármacos considerados com maior eficácia e graus aceitáveis de toxicidade usados com sucesso na grande maioria dos casos, e os medicamentos

de segunda linha, usados em casos de resistência a medicamentos ou naqueles em que alguma outra condição relacionada ao paciente comprometeu a eficácia da terapia primária (CARVALHO *et al.*, 2018).

Segundo o manual de recomendação para o controle da TB do ano de 2019, os antituberculosos, no geral, interferem em sistemas enzimáticos do bacilo ou bloqueiam a síntese de algum metabólito essencial para o seu crescimento (Figura 5), tendo em vista que a sua atuação difere conforme o metabolismo bacilar (BRASIL, 2019).

Figura 5- Mecanismo de ação de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose.



Fonte: Adaptado do Manual de recomendação para o controle de tuberculose no Brasil (2019).

A fim de minimizar os casos de TB e trazer a cura aos infectados, a OMS designou que o tratamento padrão para a TB compreende na administração de quatro antimicrobianos de primeira linha, que são: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida e etambutol (ETB), com o objetivo de reduzir a transmissibilidade da doença e conduzir à cura (FERREIRA *et al.*, 2018). Para que isso ocorra, os fármacos utilizados devem ser capazes de reduzir rapidamente a população bacilar, prevenir a seleção de cepas naturalmente resistentes e esterilizar a lesão (RABAHI *et al.*, 2017).

O esquema de tratamento da TB é padronizado e deve ser realizado de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde e compreende duas fases: a intensiva, que tem por objetivo reduzir rapidamente a população bacilar e eliminar os bacilos com resistência natural

a algum medicamento e a fase de manutenção, que tem o objetivo de eliminar os bacilos latentes ou persistentes e reduzir a possibilidade de recidiva da doença (BRASIL, 2019).

Entretanto, a falta de orientação, informação e acompanhamento corretos, podem ser alguns dos fatores determinantes ao desenvolvimento de impasses na cura da TB. A fim de minimizar esta condição, foi designado o regime terapêutico de poliquimioterapia como primeira linha no tratamento da TB, capaz de curar quase a totalidade dos casos que seis meses (GUIMARÃES *et al.*, 2018).

Um dos principais fatores que contribuem como interferência nos desfechos durante o tratamento da TB, é o abandono ao tratamento. Em 2018, 11,6 % dos novos casos de TB abandonaram o tratamento, uma proporção mais que duas vezes superior ao máximo de 5 % recomendado pela OMS em relação a abandono do tratamento. Os maiores percentuais de abandono no país foram observados em Porto Alegre (25,3 %), Porto Velho (24,6 %), Florianópolis (23,4 %) e Goiânia (21,3 %) (BRASIL, 2019).

A proporção de cura entre os casos novos de TB pulmonar com confirmação laboratorial no Brasil (2018) foi de 71,9 %, com exceção dos estados do Pará e Rio de Janeiro. Todos os estados do Norte e Sudeste apresentaram percentuais de cura de TB pulmonar acima do percentual nacional. Por outro lado, Paraíba e Distrito Federal mostraram percentuais de cura da TB pulmonar inferiores a 60 %. De forma geral, na maioria dos estados, houve uma tendência de melhora no percentual de cura e tratamento aos novos casos de TB (BRASIL, 2020). Cabe salientar que as taxas de cura de TB susceptível, a nível mundial, é de 95- 97 % (WHO, 2020).

Apesar dos esquemas multidrogas adotados, continua cada vez mais frequente o surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes, que acabam desenvolvendo-se através de eventos aleatórios nas micobactérias; por exemplo, mutações espontâneas no genoma destes microrganismos, decorridas após terapia com único fármaco, bem como a inadequada adesão ao tratamento ou diagnóstico incorreto (VILCHÈZE; JACOBS JR, 2019). O tratamento medicamentoso inadequado de um indivíduo com TB mata a maioria de suas bactérias, mas permitirá o crescimento do pequeno número de organismos dessa população bacteriana que estão surgindo após mutação espontânea (FAUSTINI; HALL; PERUCCI, 2005).

1.2.3- RESISTÊNCIA DE *Mycobacterium tuberculosis*

A TB multirresistente a fármacos (MDR-TB) ou TB que não responde à isoniazida ou à rifampicina, é a principal complicação enfrentada nos dias atuais para o tratamento da TB (SEUNG; KESHAVJEE; RICH, 2015). Segundo dados presentes no Boletim Epidemiológico

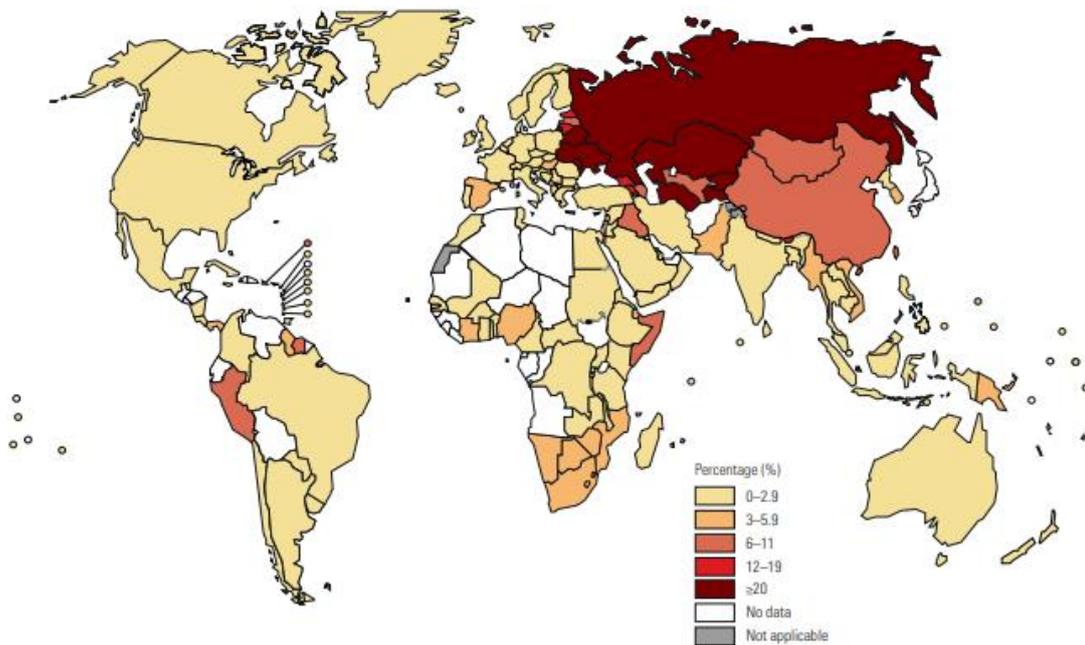
divulgado pelo Ministério da Saúde de 2020, até o ano de 2018 os casos de MDR-TB no Brasil representaram aproximadamente 3,9 % de todos os novos casos de TB (BRASIL, 2020).

Os casos de MDR-TB podem surgir por transmissão direta, de um indivíduo para outro, mas também por tratamento inadequado de um indivíduo que foi inicialmente infectado por uma cepa totalmente sensível ou cepas que apresentem resistência a fármacos utilizados no tratamento da TB (FAUSTINI; HALL; PERUCCI, 2005). A baixa adesão às terapias medicamentosas contribui para a amplificação da resistência, enquanto a falta de detecção e o tratamento inadequado aumentam o risco de transmissão direta de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a medicamentos (SEIFERT *et al.*, 2015).

Sabe-se que o desenvolvimento de resistência em cepas de *M. tuberculosis* pode levar a um patógeno potencialmente intratável (MAMATHA; SHANTI, 2018). Para que estes microrganismos desenvolvam resistência a um medicamento se faz necessário inúmeros fatores, dentre esses pode-se citar o regime de tratamento monoterápico, bem como abandono ao tratamento, no qual, essa condição irá propor uma seleção artificial na população das bactérias (ISLAM *et al.*, 2017). A partir disso, os bacilos de *M. tuberculosis*, poderão apresentar novas proteínas em sua parede celular, podendo assim desenvolver resistência ao fármaco utilizado (GÓMEZ-TANGARIFE *et al.*, 2018).

A TB resistente a medicamentos atingiu níveis alarmantes com o surgimento de cepas praticamente intratáveis com os medicamentos existentes (SEUNG; KESHAVJEE; RICH, 2015). Em 2018, havia cerca de meio milhão de novos casos TB resistente à rifampicina (Figura 6), dos quais 78 % eram TB multirresistente. Os três países com maior número de casos são Índia (27 %), China (14 %) e a Rússia (8 %). Globalmente, em 2019, 3,3 % dos novos casos, bem como 17,7 % dos casos tratados anteriormente com o esquema terapêutico recomendado pela OMS, apresentaram TB multirresistente ou resistente à rifampicina (MDR-TB), sendo estes adquiridos, em sua maioria, por nova reinfecção com cepas resistentes (WHO, 2020).

Figura 6- Representação em porcentagem da incidência de tuberculose resistente a rifampicina e isoniazida (MDR-TB) no mundo.



Fonte: Relatório Global de Tuberculose (2020).

A TB extensivamente resistente a fármacos (XDR-TB), consiste em cepas que são resistentes à isoniazida e rifampicina, uma das fluoroquinolonas (como moxifloxacina ou ofloxacina) e a pelo menos um dos fármacos injetáveis da segunda linha de tratamento para TB (RAHMAN; SARKAR; 2017). A ocorrência de casos de TB resistente vem crescendo nos últimos anos e, até o fim de 2019, foram notificados à OMS, 12.350 casos de XDR-TB, sendo o continente europeu e o sudeste do continente asiático responsáveis por aproximadamente 75 % destes casos (WHO, 2020). O tratamento para TB resistente continua sendo uma tarefa difícil para os médicos, em razão da alta incidência de eventos adversos dos fármacos utilizados, do tempo de tratamento mais longo, bem como o alto custo dos medicamentos necessários (SILVA *et al.*, 2018). Diante disto, estudos como de Rodrigues Junior *et al.*, (2016) e Louheed *et al.*, (2009) vem ganhando bastante enfoque nos últimos anos com intuito de buscar novas formas terapêuticas para o tratamento da MDR-TB e XDR-TB.

1.3 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

Em 1988, a OMS determinou algumas exigências para a busca por um fármaco ideal, e dentre os requisitos, os mesmos devem apresentar ação eficaz com uma única dose ou poucas doses, bem como poucos efeitos colaterais e ausência de efeitos teratogênicos, além de apresentar baixo custo (VILLALBA, 2015). Entretanto, na prática, devido às limitações de uso de um fármaco em diferentes condições, bem como as diferentes cepas, complexidade das pesquisas e desenvolvimento de um novo fármaco, estes objetivos são tidos como distantes da realidade (DALBERTO *et al.*, 2020).

Na busca e desenvolvimento de novos fármacos, pesquisas que usam extração de princípios ativos de fontes naturais (NKOT *et al.*, 2018), bem como a síntese ou modificação molecular de compostos já existentes (NELSON *et al.*, 2016), além do reposicionamento de fármacos (RODRIGUES- JUNIOR *et al.*, 2016), vem ganhando grande destaque nas últimas décadas. Neste contexto, pode-se citar alguns exemplos bem-sucedidos de reposicionamento de fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral, como é o caso da pentamidina e da anfotericina B, utilizados primeiramente para tratar infecções fúngicas (FERREIRA, 2014).

Para Pushpakom *et al.* (2018), o termo reaproveitamento de medicamentos também chamado de reposicionamento de medicamentos, “reprofiling” ou re-tarefa consiste em uma estratégia para identificar novos direcionamentos para medicamentos aprovados ou em fase experimental (PUSHPAKOM *et al.*, 2018). Vários estudos que vêm demonstrando o potencial de medicamentos conhecidos e compostos farmacologicamente ativos como base para uma abordagem terapêutica contra a TB demonstraram grande importância nos últimos anos (AN *et al.*, 2020). Neste cenário, fármacos antimaláricos como mefloquina, cloroquina e primaquina têm sido considerados importantes pontos de partida para o desenvolvimento de novos fármacos para a terapia da TB (CROWLE; MAY, 1990; LOUGHEED *et al.*, 2009; BERMUDEZ; MEEK, 2014).

1.3.1- FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS

Segundo o Guia de Tratamento da Malária no Brasil do ano de 2020, os fármacos usados no tratamento da malária são geralmente classificados com base em sua ação contra o *Plasmodium spp.* em diferentes estágios de seu ciclo de vida no ser humano (BRASIL, 2020). O tratamento da malária visa atingir o parasita em pontos-chave de seu ciclo evolutivo, que podem ser através da interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e

manifestações clínicas da infecção, bem como através da destruição de formas latentes do parasita no ciclo tecidual *P. vivax* e *P. ovale* (BRASIL, 2020). Desta forma, evita-se novas reincidência da doença e a interrupção da transmissão do parasito, pelo uso de fármacos que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitas (BRASIL, 2020).

1.3.1.1- PRIMAQUINA

A primaquina (PQ) pertence à classe das 8-aminoquinolinas (Figura 7). Esta molécula teve sua síntese nos Estados Unidos, em 1946, como parte dos esforços de tratamento e prevenção da malária (ZORC *et al.*, 2019). Apesar dos longos anos de uso deste fármaco no tratamento da malária, seu mecanismo de ação não se encontra totalmente esclarecido, entretanto, um modo de ação proposto inclui o comprometimento da mitocôndria do parasita interferindo com a função da ubiquinona na cadeia respiratória, podendo assim eliminar a infecção da malária, impedindo o desenvolvimento do *P. vivax* (DAVANÇO *et al.*, 2014).

Após a administração deste fármaco, este terá sua absorção no trato gastrointestinal, e o metabolismo se dará 10 a 12 horas após sua ingestão (ASHLEY; WHITE, 2014). O metabolismo da PQ ocorre nos hepatócitos, durante a metabolização. A molécula da PQ será convertida em 6-hidroxiprimaquina e a 6- hidrocimetilprimaquina, transformando a PQ em potente agente oxidante (RISHIKESH; SARAVU, 2016).

No estudo de Lougheed *et al.*, (2009), que teve como objetivo avaliar a ação de medicamentos conhecidos e compostos farmacologicamente ativos em cepas *M. tuberculosis*. Foi possível concluir que a PQ juntamente com demais fármacos selecionados na pesquisa, apresentaram resultados satisfatórios em modelos com abordagem intracelular. A atividade antituberculose da PQ parece ser um novo achado, tendo em vista que este agente antimalárico possui uma estrutura não vista entre os medicamentos conhecidos para TB, aumentando a possibilidade de representar um novo modelo de medicamento com um novo mecanismo de ação contra *M. tuberculosis* (LOUGHEED *et al.*, 2009).

1.3.1.2- CLOROQUINA

Cloroquina (CQ) é uma aminoquinolina com atividades antimaláricas e anti-inflamatórias (Figura 7). Sabe-se que este fármaco apresenta múltiplas propriedades terapêuticas; entretanto, seus mecanismos de ação ainda não estão totalmente elucidados. Ainda, pode-se relatar que este fármaco está envolvido no tratamento de doenças tromboticas e metabólicas, bem como doenças fúngicas (PLANTONE; KOUDRIAVTSEVA, 2018). Além

destes mecanismos, um outro mecanismo apresentado por esta molécula no interior das células é o de interferência na biossíntese de ácidos nucleicos, permitindo a este a possibilidade de sua utilização no tratamento de células cancerígenas (LEVY; TOWERS; THORBURN, 2017).

Esse fármaco é totalmente absorvido pelo trato gastrointestinal, atingindo o pico de concentração plasmática entre 2 e 8 horas e o equilíbrio dos níveis plasmáticos é encontrado com quatro semanas de uso da CQ (THELINGWANI *et al.*, 2014). A CQ é eliminada lentamente pelos rins (3 a 6 meses), e cerca de 15 a 30 % da cloroquina é oxidada no fígado em metabólitos inativos e, então, eliminada. Há relato de achados de traços de CQ no plasma, eritrócitos e urina de indivíduos com retinopatia, após cinco anos de interrupção da droga (GREGÓRIO *et al.*, 2012).

No estudo de Crowle e May (1990) foi realizado teste para avaliar a ação da CQ na inibição de bacilos de *M. tuberculosis* em macrófagos humanos. Neste estudo, foi possível concluir que a CQ diminuiu ou interrompeu o crescimento de *M. tuberculosis* em macrófagos humanos, quando foi adicionada a uma concentração de 5 µM. Nesse contexto, acredita-se que a CQ pode inibir algumas espécies de bactérias, agindo diretamente no DNA e na síntese de RNA, levando a acreditar que *M. tuberculosis* esteja entre as bactérias sensíveis a esta molécula (CROWLE; MAY, 1990).

1.3.1.3- MEFLOQUINA

A mefloquina (MEF) é um fármaco derivado da CQ empregado no tratamento da malária, desenvolvido por Ohnmacht *et al.*, (1970), a fim de combater cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à CQ (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Esta molécula possui atividades antimaláricas e anti-inflamatórias, no entanto seu mecanismo exato ainda deva ser elucidado (Figura 7). A MEF se acumula preferencialmente em lisossomos e interrompe a função e integridade lisossômica, levando assim à morte celular hospedeira (MCCANN *et al.*, 2018).

A MEF é bem absorvida pelo trato gastrointestinal, apresentando variação individual no tempo necessário para alcançar a concentração plasmática máxima. Esta molécula se liga aproximadamente a 98 % das proteínas plasmáticas, tendo relatos de suas altas concentrações em células sanguíneas da série vermelha (VIEIRA *et al.*, 2016). A interação entre MEF e proteínas plasmáticas, auxilia na determinação das propriedades farmacológicas, como biodisponibilidade e distribuição, além de aumentar sua solubilidade, reduzir seu efeito tóxico e prolongar sua meia-vida (MUSA *et al.*, 2019).

Embora a MEF seja geralmente prescrita como profilaxia contra a malária, sua atividade antimicobacteriana foi identificada em estudos como o de Bermudez e Meek (2014) e Krieger *et al.* (2015), onde foi demonstrado que a MEF possui atividade bactericida contra cepas resistentes de *M. tuberculosis*. Diante disso, no estudo de Rodrigues- Junior *et al.* (2016) foi possível determinar a atividade dessa molécula em um modelo de infecção tuberculosa em roedores, bem como demonstrar o potencial desta molécula para matar cepas de *M. tuberculosis*. Gonçalves *et al.* (2012), sintetizou e testou moléculas derivadas da MEF, contra cepas de *M. tuberculosis* resistentes. Dentre os resultados apresentados neste estudo, foi possível observar que a MEF, bem como os compostos derivados desta molécula apresentaram atividade contra as cepas de *M. tuberculosis*. Os compostos derivados apresentaram uma atividade 2,7 vezes maior em comparação à MEF (GONÇALVEZ *et al.*, 2012).

1.3.1.4- TAFENOQUINA

A tafenoquina (TQ) é um análogo 8 aminoquinolina da PQ (Figura 7), sendo sintetizada por cientistas do Instituto de Pesquisa do Exército Walter Reed, em 1978 com o intuito de gerar melhor eficácia no tratamento da malária, bem como vir a substituir futuramente a PQ (VAL *et al.*, 2019). A TQ tem sido associado a baixas lesões hepáticas, além de estar associada a baixa alterações nas enzimas séricas durante a terapia com este fármaco, sendo esses motivos considerados favoráveis para sua grande aceitação no tratamento da malária (THAKKAR *et al.*, 2018).

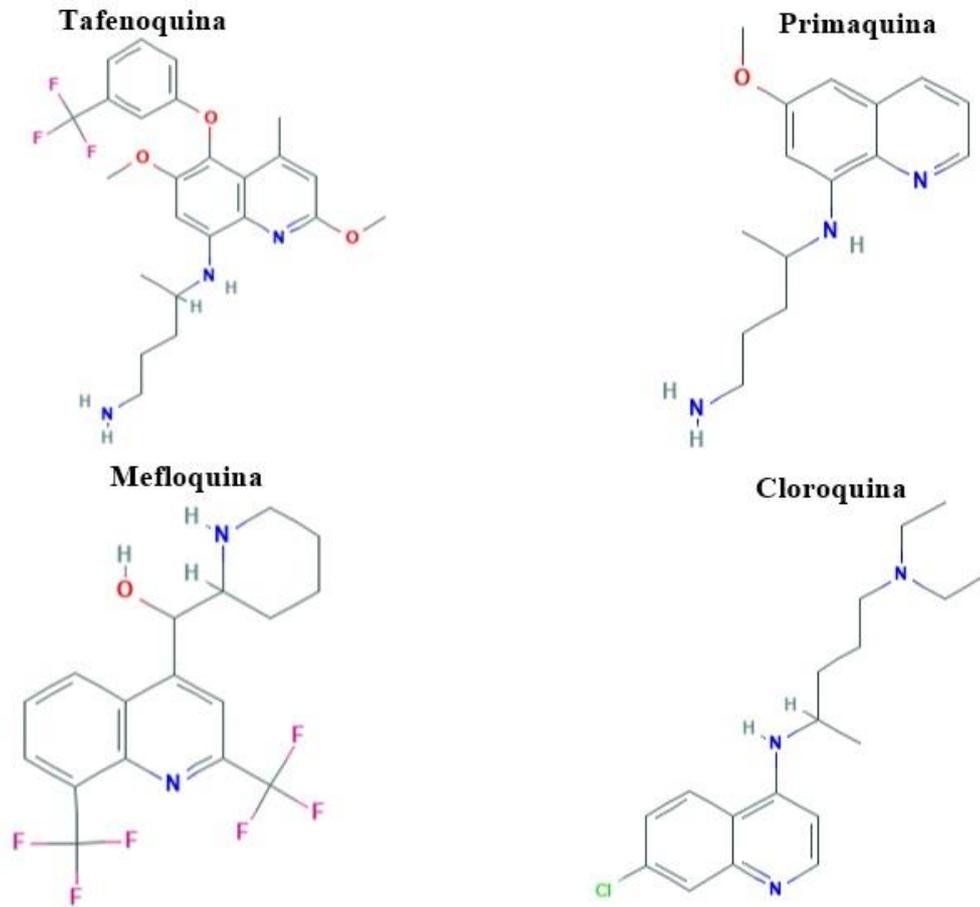
Estudos sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da TQ apontam que esta molécula possui sua absorção no trato gastrointestinal (VAL *et al.*, 2019). A sua absorção se dá de maneira lenta, no entanto, sua concentração máxima plasmática é entre 12 e 15 horas após sua administração oral deste fármaco (FRAMPTON, 2018).

Estudos envolvendo a TQ vem ganhando bastante enfoque nos últimos anos. De forma importante, o estudo de Carvalho *et al.* (2015) teve como objetivo investigar o efeito deste fármaco contra a infecção causada pelo parasito *T. brucei*. Diante dos resultados presentes no trabalho foi possível concluir que este fármaco apresentou atividade significativa contra *T. brucei*, sugerindo que sua atividade antiparasitária se apresenta devido à desintegração da membrana celular gerando um processo necrótico na célula e consequente morte do parasita. Nesse contexto, este fármaco foi o primeiro da classe dos aminoquinolinas a apresentar atividade contra o *T. brucei*.

Nesse sentido, se faz necessário explicar que este fármaco também apresenta atividade antifúngica, levando em consideração que este está envolvido na inibição do *Pneumocystis carinii*. Através da realização de testes ultra estruturais envolvendo TQ e *P. carinii*, foi possível observar que a ação deste fármaco sobre esses microrganismos extracelular, está associada ao inchaço e vacuolização da mitocôndria do *P. carinii*, demonstrando potencial para a inibição deste microrganismo (GOHEN *et al.*, 1993).

Além de atuar na mitocôndria do *P. carinii*, estudos vêm demonstrando que a TQ tem a capacidade de interferir na função da mitocôndria e induzir a morte celular apoptótica em diversos protozoários, incluindo *Plasmodium* spp. (MORDUE; WORMSER, 2019). Até então, nenhum estudo avaliou o efeito da TQ sobre nenhuma espécie de micobactéria, sobretudo contra *M. tuberculosis*.

Figura 7- Estrutura química dos antimaláricos avaliados no estudo.



Fonte: Adaptado PubChem Database (2020).

2- JUSTIFICATIVA

A tuberculose é uma doença infecto contagiosa, que se caracteriza pelo contato de indivíduos saudáveis com o bacilo de Koch. Este microrganismo tem a capacidade de afetar o pulmão de indivíduos, bem como outros órgãos do corpo humano. Nos últimos anos tem sido reportados altos números de indivíduos infectados com *M. tuberculosis* mundialmente, perfazendo com os altos índices de óbitos devido a essa condição patológica.

A alta incidência da TB, bem como os altos número de óbitos, podem ser explanados, pelo menos em parte, devido ao surgimento da resistência bacteriana, por parte das cepas de *M. tuberculosis*. O desenvolvimento dessa condição adaptativa por parte das bactérias cria uma série de problemas em virtude da baixa disponibilidade de fármacos efetivos disponíveis no mercado, podendo levar a uma doença potencialmente intratável. A presença desta condição está associada em grande parte ao vigente longo tratamento para a TB.

O esquema poliquimioterápico básico de tratamento da TB é composto de duas fases, tendo duração total de 6 meses. A falta da adesão a este esquema terapêutico, o abandono ao tratamento, bem como o tratamento incorreto, são fatores que estão inteiramente relacionados ao desenvolvimento de resistência em cepas de *M. tuberculosis*, em especial pela capacidade de persistência apresentada por estes microrganismos.

A realização de estudos que buscam novas moléculas para o tratamento da TB é extremamente necessária. Nessa perspectiva, o reposicionamento de fármacos representa uma forma promissora para a introdução de novos medicamentos. Essa alternativa terapêutica contribui para o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos e menos tóxicos para doenças com alto grau de infecção, além de apresentar uma forma mais rápida e mais econômica para o desenvolvimento de novas terapias.

Nessa perspectiva, estudos vem demonstrando que fármacos desenvolvidos para o tratamento da malária, quando comparados com fármacos de primeira linha de tratamento contra a TB, podem ser considerados importantes pontos de partida para o desenvolvimento de novas moléculas para tratar a TB. Diante deste contexto, os fármacos antimaláricos PQ, CQ, MEF e TQ foram selecionados para estudos de eficácia pré-clínica *in vitro*, com vistas a identificar possível potencial antimicobacteriano.

3-OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antimicobacteriano de quatro fármacos antimaláricos em cepas de *Mycobacterium ssp.*

3.2- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar a atividade da cloroquina, mefloquina, primaquina e tafenoquina frente a *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, em estudos *in vitro*, através da determinação das concentrações inibitórias mínimas destes fármacos;
- Determinar o fármaco antimalárico que possui maior potencial antimicobacteriano;
- Realizar testes de combinação com fármacos usados na terapia contra a tuberculose com o fármaco antimalárico de maior potencial;
- Determinar a cinética de morte das bactérias frente ao antimaláricos mais potente;
- Avaliar os efeitos das moléculas com maior potencial antimicobacteriano em cepas bacterianas submetidas a modelos de dormência, como depleção de nutrientes e estresse nitrosativo;
- Avaliar a atividade da molécula que possui maior potencial antimicobacteriano em cepas resistentes de *M. tuberculosis*;

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) dos compostos antimaláricos em *Mycobacterium tuberculosis* e em *Mycobacterium smegmatis*

As concentrações inibitórias mínimas (MIC) de cada composto testado foram determinadas nas cepas *M. tuberculosis* H37Ra e *M. smegmatis* mc2155. As MICs foram determinadas usando o ensaio de redução de resazurina em microplaca (REMA), como um indicador de crescimento. Foram utilizadas as moléculas TQ, MEF, CQ e PQ, adquiridos da Sigma- Aldrich, bem como moléculas antituberculosas usadas no tratamento da TB, etambutol (ETB), estreptomicina (ESTR), isoniazida (INH), rifampicina (RIF) e moxifloxacina (MOX), como controles positivos.

Estes fármacos foram pesados, tendo suas soluções preparadas em DMSO (RIF, MOX, TQ e MEF) e em meio 7H9 com ADC e DMSO (PQ, CQ, ETB, ESTR e INH). Foram preparadas soluções de trabalho usando caldo 7H9 Middlebrook para atingir as respectivas concentrações apresentadas na Tabela 1. Foram realizadas diluições em série em microplacas de 96 poços de poliestireno com fundo U. A concentração de DMSO foi mantida a 2,5 % em todos os poços do ensaio.

Após a adição das cepas bacterianas aos poços, procedeu-se com a incubação das microplacas à temperatura de 37 °C, durante 7 dias para a *M. tuberculosis* e 24 horas para *M. smegmatis*. Após isso, 30 µL de uma solução de resazurina (0,02 %), foi adicionado a cada poço e os resultados foram avaliados após 48 horas para *M. tuberculosis* e 24 horas para *M. smegmatis*. A MIC de cada molécula foi considerada como a menor concentração de fármaco que impede uma mudança de cor de azul (resazurina) para rosa (resorufina) (MURADÁS et al., 2018).

Tabela 1- Representação das concentrações de cada solução para determinar as concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos antimaláricos e antituberculosos.

Fármacos	Concentração das soluções (μM)	Concentração Máxima das soluções usadas no ensaio (μM)
Primaquina	21 960	10 980
Cloroquina	20 900	10 450
Mefloquina	160	80
Tafenoquina	80	40
Etambutol	128	64
Estreptomicina	128	64
Moxifloxacina	3	1,5
Rifampicina	0,25	0,125
Isoniazida	60	30

4.2- Combinação da molécula de maior atividade com medicamentos anti-tuberculosos (anti-TB) usados clinicamente.

Os efeitos da combinação da molécula de maior atividade com alguns medicamentos anti-TB usados clinicamente como: INH, RIF, ETB, MOX e ESTR foram avaliados por um ensaio de tabuleiro de damas em um esquema de associação de dois compostos, através do REMA. Adicionalmente, combinou-se os dois antimaláricos mais potentes. Para o preparo das soluções dos fármacos foi usado DMSO puro para TQ, MEF, RIF, MOX e meio 7H9 com ADC e DMSO para os fármacos INH, ETB e ESTR. Em seguida, os compostos foram diluídos em caldo 7H9 para obter uma concentração máxima em microplacas de 30 μM para INH; 1,5 μM para MOX; 0,25 μM para RIF; 60 μM para ETB; 8 μM para ESTR e 160 μM para MEF. Os fármacos anti-TB foram diluídos horizontalmente (colunas 2 a 10), enquanto a molécula antimalárica de maior potencial foi diluída verticalmente (linhas B a H). O inóculo de micobactérias (*M. tuberculosis* H37Ra), as condições de incubação das microplacas e a leitura dos resultados foram realizadas como descrito anteriormente na determinação das MICs em

cepas de *M. tuberculosis* H37Ra. Para avaliar a interação entre os diferentes tratamentos foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) de acordo com a seguinte fórmula (Eq 02):

$$\text{ICIF: } \text{CIF}_{(\text{molécula x})} + \text{CIF}_{(\text{fármacos anti-TB})} \quad (\text{Eq. 01})$$

$$\text{ICIF: } \frac{(\text{MIC}_{\text{molécula x na combinação}})}{(\text{MIC}_{\text{molécula x isolado}})} + \frac{(\text{MIC}_{\text{fármacos anti-TB na combinação}})}{(\text{MIC}_{\text{fármacos anti-TB isolados}})} \quad (\text{Eq. 02})$$

A partir do ICIF obtido foi avaliada a interação seguindo a classificação descrita por Muradas *et al.* (2018) (Tabela 2).

Tabela 2- Valores da concentração inibitória fracionada (ICIF) correspondentes às diferentes interações.

Interação	ICIF
Sinergismo	$\text{CIF} \leq 0,5$
Aditivo ou Indiferente	$0,5 < \text{CIF} \leq 4,0$
Antagonismo	$\text{CIF} > 4,0$

4.3- Cinética de morte das bactérias frente ao antimalárico mais potente

Para a determinação da cinética de morte da cepa *M. tuberculosis* H37Ra frente ao fármaco da TQ, foi conforme a metodologia descrita por Demitto *et al.* (2015). Um clone de micobactéria foi selecionado para a realização deste experimento e inicialmente cultivado em meio 7H9 Middlebrook suplementado com OADC e Tween 0,05 %. Após 21 dias de incubação a 37 °C, foi medida a OD da suspensão bacteriana, e em seguida foi preparada uma suspensão contendo cerca de 5×10^5 unidades formadoras de colônia (CFU)/mL em meio líquido 7H9 Middlebrook, 10 % de OADC, 0,2 % de glicerol, e 0,025 % de Tween.

Posterior à preparação da suspensão bacteriana foram preparadas soluções contendo diferentes concentrações da molécula TQ, bem como uma solução de INH (Tabela 3), incluída como controle para avaliação da cinética de morte.

Tabela 3- Concentrações de tafenoquina (TQ) e isoniazida (INH) utilizadas para o tratamento das suspensões de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, para determinação da cinética de morte.

Moléculas usadas para tratar as suspensões bacterianas	Concentração das soluções preparadas para tratar as suspensões bacterianas (μM)	Equivalente em MIC (vezes)
TQ	80	8
TQ	40	4
TQ	20	2
TQ	10	1
TQ	5	0,5
TQ	2,5	0,25
TQ	1,25	0,125
INH	3,75	2

As culturas foram incubadas a 36-37 °C com agitação a 96 rotações por minuto (rpm) por 14 dias. Alíquotas (0,1 mL) foram removidas no dia inicial do experimento e, em seguida, no primeiro, terceiro, sétimo, décimo e décimo quarto dia. Uma alíquota (100 μL) de cada diluição foi semeada em meio 7H10 Middlebrook suplementado com 10 % OADC. As placas foram incubadas em 36–37 °C por 4 semanas, e as CFU foram contadas. Os números de CFU foram expressos em CFU/mL (considerando as diluições) e, posteriormente, convertidos para \log_{10} (CFU/mL).

4.4- Avaliação dos efeitos das moléculas com maior potencial antimicrobacteriano usando bactérias submetidas a modelos de dormência, como depleção de nutrientes e estresse

Os modelos de dormência com suspensões de *M. tuberculosis* H37Ra foram realizados usando a metodologia descrita por Sridevi *et al.* (2015) e por Betts *et al.* (2002). Foram selecionados quatro clones bacterianos de *M. tuberculosis* H37Ra e inoculados em meio líquido 7H9 Middlebrook suplementado com OADC 10 %. Após o crescimento, as suspensões foram

centrifugadas (a 3500 rpm durante 5 minutos), sedimentadas e lavada duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. O sedimento foi ressuspensão em PBS em frascos selados e incubado a 37 °C por 6 semanas, para o experimento de depleção de nutrientes. Após 6 semanas de incubação, as culturas foram tratadas com medicamentos padrão como a INH e RIF, juntamente com as moléculas antimaláricas de maior potencial (TQ e MEF). As células tratadas foram pipetadas em placas de 96 poços em triplicadas, juntamente com as moléculas da RIF, INH, TQ e MEF, usando as concentrações apresentadas na Tabela 4. Poços de controle para o tratamento, foram pipetados na placa de 96 poços, e tratadas com DMSO na concentração de 2,5 %.

As placas de 96 poços foram fechadas e incubadas a 37 °C por 7 dias. Após o tempo de incubação foram retiradas 100 µL de cada poço contendo as células bacterianas e os antimaláricos de maior potencial, bem como os fármacos usados como controle, diluídos e semeadas em placas com meio 7H10 com 10 % de OADC. Em seguida, as placas foram fechadas e incubadas por 3 semanas a 37° C.

Paras os experimentos envolvendo a submissão das cepas bacterianas ao estresse nitrosativo foi seguida a metodologia descrita por Kawaji *et al.* (2010) e por Sridevi *et al.* (2015). Foram selecionados três clones bacterianos de *M. tuberculosis* H37Ra cultivados em meio 7H9 Middlebrook suplementado com OADC 10 % e Tween 0,05 %. As suspensões bacterianas foram expostas a uma concentração de 1 mM de nitrito de sódio (NaNO₂) e, em seguida, incubadas por 7 dias a 37 °C. Antes de serem incubadas foram retirados 100 µL da suspensão bacteriana contendo NaNO₂, onde as culturas foram diluídas usando 900 µL de uma solução de PBS e semeadas em placas com meio 7H10 contendo 10 % de OADC.

Após os 7 dias de incubação, as culturas foram tratadas com medicamentos padrão como a INH e RIF, juntamente com as moléculas antimaláricas de maior potencial (TQ e MEF). As células tratadas foram pipetadas em placas de 96 poços em triplicadas, juntamente com as moléculas de RIF, INH, TQ e MEF, usando as concentrações presentes na Tabela 4. Os poços de controle foram tratados com DMSO na concentração de 2,5 %.

As placas de 96 poços foram fechadas e incubadas a 37° C por 7 dias. Após o tempo de incubação foram retiradas 100 µL de cada poço contendo as células bacterianas e os antimaláricos de maior potencial, bem como os fármacos usados como controle, diluídos e semeadas em placas com meio 7H10 com 10 % de OADC. Em seguida as placas foram fechadas e incubadas por 3 semanas a 37 °C.

Tabela 4- Concentrações dos fármacos isoniazida (INH), rifampicina (RIF), tafenoquina (TQ) e mefloquina (MEF) utilizadas para o tratamento das suspensões de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra submetidas ao estresse nitrosativo e à depleção de nutrientes.

Fármacos usadas para o tratamento das suspensões de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra submetida aos modelos de dormência	Concentração dos fármacos usadas para tratar as suspensões de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra submetida aos modelos de dormência (µM)
Isoniazida	10
Rifampicina	10
Tafenoquina	10
Mefloquina	20

4.5- Concentração inibitória mínima dos compostos antimaláricos de maior potencial frente a cepas resistentes e virulentas de *Mycobacterium tuberculosis*.

As cepas de *M. tuberculosis* resistentes foram recuperados de laboratórios e unidades hospitalares na região de Lisboa, Portugal. Estes conjuntos de cepas compreenderam amostras de isolados clínicos de *M. tuberculosis*, recebidos para análise genotípica no Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. A caracterização genotípica e fenotípica dessas cepas está descrita no trabalho publicado por Perdigão *et al.* (2014).

Alguns dessas cepas de *M. tuberculosis* como MTB2, MTB4, MTB5, MTB12 e MTB20 foram submetidos a testes de sensibilidade aos medicamentos INH, RIF, ESTR e ETB, bem como medicamentos de segunda linha de tratamento para a TB. Além disto, estas cepas tiveram alguns genes sequenciados e o sumário destes achados é mostrado no trabalho de Perdigão *et al.* (2014). Na Tabela 5, temos a representação de algumas características apresentadas pelas cepas usadas neste trabalho. Ainda, foi realizada a determinação da MIC dos fármacos da TQ e MEF na cepa laboratorial e virulenta *M. tuberculosis* H37Rv. O desenvolvimento desses testes foi realizado através da colaboração com pesquisadores do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Os testes foram realizados dentro de um laboratório de biossegurança 3 por

pesquisadores treinados para a manipulação de micobactérias virulentas e resistentes, seguindo protocolos internacionais de biossegurança.

Tabela 5- Sumário das características genotípicas e fenotípicas dos 3 isolados cepas clínicas usados neste estudo, bem como a cepa de H37Rv.

Cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> testadas no experimento	Classificação da cepa	MIC da RIF (µM)	MIC da INH (µM)
Isolado 2	MDR- TB	49	292
Isolado 12	MDR- TB	49	146
Isolado 20	MDR- TB	49	292
H37Rv	SENSÍVEL	<0,1	2,3

Para a determinação dos MICs envolvendo a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv e as cepas resistentes, foi seguida a metodologia relata no item 4. 1..

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Determinação das MIC dos antimaláricos e antituberculosos em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra e *Mycobacterium smegmatis* mc2155

. Nas Tabelas 6 e 7, são apresentados os valores das MICs para os antituberculosos usados no experimento como controles. Os valores de MIC frente às cepas de *M. tuberculosis* H37Ra *M. smegmatis* mc2155 foram obtidos a partir da realização de três a quatro experimentos independentes. Em todos os experimentos os controles positivos de tratamento, de esterilidade do meio, do crescimento microbiano e dos solventes com e sem o inóculo foram adicionados.

Tabela 6- Resultados das concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos antituberculosos usados como controles positivos para a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Antituberculosos	Concentração Inibitória Mínima em <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra (μM)	Concentração Inibitória mínima em <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ($\mu\text{g/mL}$)
Etambutol	8	2,21
Estreptomicina	0,25	0,18
Moxifloxacina	0,19	0,07
Rifampicina	0,03	0,02
Isoniazida	1,88	0,26

Tabela 7- Resultados das concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos antituberculosos usados como controles positivos para a cepa de *Mycobacterium smegmatis* mc2155.

Antituberculosos	Concentração Inibitória Mínima em <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc2155 (μM)	Concentração Inibitória mínima em <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc2155 ($\mu\text{g/mL}$)
Etambutol	2	0,55
Estreptomicina	0,12	0,09
Moxifloxacina	0,09	0,03
Rifampicina	31	25,51
Isoniazida	125	17,14

Diante disso, os antituberculosos usados como controle positivo neste estudo apresentaram MIC de acordo com a literatura, considerando o estudo de Heirinchs *et al.* (2018), onde foi realizado um estudo de susceptibilidade *in vitro* comparando a MIC *in vitro* de 16 drogas antituberculosas contra cepas de *M. tuberculosis* H37Ra e H37Rv. Além disso os valores de MIC encontrados nos estudos foram muito próximos aos resultados presentes nos estudos de Tonelli *et al.* (2014) e Sienawska *et al.* (2018), nos quais foram usados antituberculosos como controle positivo para a realização de ensaios.

Os resultados da MIC dos antimaláricos (Tabelas 8 e 9), demonstraram que todos os fármacos apresentaram capacidade de inibir o crescimento das cepas *M. tuberculosis* H37Ra e *M. smegmatis* mc2155. Os fármacos da TQ e MEF mostraram maior atividade pois apresentaram MICs mais baixas quando comparadas às MICs dos fármacos PQ e CQ.

Tabela 8- Resultados das concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos antimaláricos testados na cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Antimaláricos	Concentração Inibitória Mínima em <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra (μ M)	Concentração Inibitória Mínima em <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra (μ g/mL)
Primaquina	1.372	624
Cloroquina	2.612	1.347
Mefloquina	20	8,29
Tafenoquina	10	5,81

Tabela 9- Resultados das concentrações inibitórias mínimas (MICs) dos antimaláricos testados na cepa de *Mycobacterium smegmatis* mc2155.

Antimaláricos	Concentração Inibitória Mínima em <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc2155 (µM)	Concentração Inibitória Mínima em <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc2155 (µg/mL)
Primaquina	620	282
Cloroquina	320	165
Mefloquina	20	8,29
Tafenoquina	10	5,81

A realização de testes usando as cepas *M. tuberculosis* H37Ra e *M. smegmatis* permite que se tenha um modelo de estudo preliminar para avaliação da atividade de fármacos sobre *Mycobacterium* spp. (PAVIĆ *et al.*, 2018). Nesse sentido, estudos como o de Chaturvedi *et al.* (2007), demonstraram que as cepas de *M. smegmatis*, podem servir como um modelo específico e mais rigoroso na triagem de moléculas contra cepas de MDR- TB (CHATURVEDI *et al.*, 2007). Adicionalmente, tem-se conhecimento que as cepas de *M. tuberculosis* H37Ra, apresentam alta proximidade com as cepas de *M. tuberculosis* que infectam humanos, levando em consideração que estas apresentam menor risco para a saúde dos pesquisadores (PAVIĆ *et al.*, 2018).

No estudo de Lougheed *et al.* (2009), foi possível observar que a PQ apresenta MIC de 5 µM em *M. tuberculosis* H37Rv. Pavić *et al.* (2018), demonstrou que a PQ apresenta MIC de 32 µg/mL em *M. tuberculosis* H37Ra. A discrepância entre os valores da MIC da PQ nos estudos de Lougheed *et al.* (2009) e Pavić *et al.* (2017) e os valores da MIC da PQ presentes neste trabalho, podem estar associados as metodologias utilizadas para determinação das MICs, bem como o modo de preparo das soluções testados no trabalho.

Tukulula *et al.* (2012) teve como objetivo no seu estudo investigar a atividade antiplasmódica e antimicobacteriana de novos análogos de nitroimidazol e nitroimidazooxazina. Durante a realização destes testes, os fármacos da ESTR, CQ e PQ foram adicionados como controles positivos. Foi observado que o fármaco da CQ, apresenta MIC

maior que 160 μM em cepas de *M. tuberculosis* H37Rv, levando a crer que este fármaco possa apresentar valores da MIC semelhante ao presente neste estudo.

O motivo pelo qual a PQ e CQ apresentam atividade antimicrobiana ainda é desconhecido, todavia a presença de resultados como os Lougheed *et al.* (2009) e Pavić *et al.* (2018), bem como Tukulula *et al.* (2012), juntamente com os resultados presentes neste estudo, indicam que estes fármacos podem ser novos achados para a terapia da TB. No entanto a presença de valores altos da MIC destes medicamentos em comparação com os fármacos da TQ e MEF, bem como os antituberculosos testados neste estudo, podem interferir no direcionamento destes fármacos para o tratamento da TB, sugerindo que, em futuras avaliações toxicológicas, se tenha a presença de resultados adversos destes fármacos em modelos *in vivo*. No entanto, para melhor conhecimento destas características se faz necessário o desenvolvimento de testes do perfil toxicológico comparativo em modelos *in vivo*.

A TQ apresenta concentração efetiva média de 1,41 μM em formas esquizontes do *P. falciparum* (RAHMHARTER *et al.*, 2002), e o seu mecanismo de ação no *Plasmodium* spp. não está totalmente estabelecido. A TQ foi considerada o fármaco de maior potencial dentre os antimaláricos testados contra cepas de *M. tuberculosis* H37Ra e *M. smegmatis* mc2155. O valor da MIC da TQ aponta que este fármaco pode ser direcionado, futuramente, para o tratamento da TB.

A MEF apresentou MIC de 20 μM em cepas de *M. tuberculosis* H37Ra e *M. smegmatis* mc2155. Juntamente com a TQ, a MEF foi considerada com um potencial contra as cepas de *Mycobacterium* spp. testadas neste trabalho. Os valores das MIC da MEF expressas neste trabalho, foram semelhantes às MICs deste fármaco descritos nos trabalhos de Mao *et al.* (2010) e Gonçalves *et al.* (2012) e

Diferentemente da TQ, a MEF já possui estudos que demonstram sua atividade contra cepas de *M. tuberculosis*. Em consequência disso, acredita-se que se tenha melhor discernimento em relação a atuação da MEF sobre *M. tuberculosis*. No estudo de Bermudez e Meek (2014), foi possível observar que a MEF possui atividade sob condições anaeróbicas em *M. tuberculosis*, sugerindo que o alvo molecular para a MEF nesses microrganismos não está relacionado à replicação bacteriana (BERMUDEZ; MEEK; 2014).

Rodrigues- Junior *et al.* (2016), observaram que após administração oral da MEF, este fármaco foi absorvido e atingiu os bacilos presentes no pulmão de camundongos infectados por TB, diminuindo a carga de micobactérias nos pulmões. O macrófago desempenha uma função vital no ciclo de infecção de *M. tuberculosis*, embora não seja um patógeno intracelular

obrigatório, esse microrganismo irá alojar-se no interior dos macrófagos do hospedeiro (HUANG; NAZAROVA; RUSSEL, 2019), propiciando um ambiente favorável ao seu crescimento, tendo em vista que a resposta imune do hospedeiro se dará de maneira bem mais complexa (PIETERS, 2008). O tratamento com MEF reduziu a quantidade de *M. tuberculosis* intracelular, em um modelo de infecção usando macrófagos murinos (RODRIGUES- JUNIOR *et al.*, 2016).

Como já foi relatado neste trabalho, Crowle e May (1990), determinou que a CQ apresenta capacidade de inibir o crescimento de *M. tuberculosis* em macrófagos a partir de uma concentração de 5 μ M. Pavić *et al.* (2017), determinou que PQ na concentração de 5 μ M tem a capacidade de inibir o crescimento de *M. tuberculosis* em macrófagos humanos. Estudos envolvendo a ação da MEF e TQ em macrófagos humanos ainda não foram realizados, no entanto a presença da atividade de antimaláricos nestes processos direciona a eventual utilização da MEF e TQ na terapia da TB. Estudos envolvendo a determinação das MICs de antimaláricos em *M. smegmatis* não foram encontrados.

5.2- Determinação da molécula de maior atividade combinada a medicamentos anti-TB usados clinicamente e a mefloquina.

A utilização de combinações pareadas e triplas de agentes antimicrobianos na clínica, vem sendo grande precursor para a atenuação da infecção causada por bactérias, bem como a diminuição da forma adaptativa de resistências por parte das mesmas (ODDS, 2003). Nesse sentido a realização de testes *in vitro* com apresentação de interações positivas que afetam o crescimento de microrganismos alvos, podem direcionar para a uma nova perspectiva de tratamento da doença.

Os resultados da interação entre os antituberculosos e os antimaláricos em *M. tuberculosis* H37Ra, estão mostrados na Tabela 10. Após a realização de três experimentos independentes, foi possível determinar que a molécula antimalárica TQ apresentou interação indiferente com ESTR, MOX, RIF, ETB e INH (Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 12). Ainda foi detectado que TQ apresentou efeito sinérgico com MEF em *M. tuberculosis* H37Ra (Tabela 10 e Figura 13).

Tabela 10- Resultados obtidos após a combinação da molécula antimalárica de maior potência, tafenoquina (TQ), com os fármacos antituberculosos e com a segunda droga mais potente, a mefloquina (MEF), contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

Fármacos combinados	MIC (μM) *		ICIF	Interação
	Individual	Combinado		
TQ	10	5	1	Indiferente
INH	1,875	0,9375		
TQ	10	5	1	
INH	1,875	0,9375		
TQ	10	5	1	
INH	1,875	0,9375		
TQ	10	5	1	Indiferente
RIF	0,031	0,015		
TQ	10	5	1	
RIF	0,031	0,015		
TQ	10	10	2	
RIF	0,015	0,015		
TQ	10	10	1,5	Indiferente
ETB	8	4		
TQ	10	10	1,5	
ETB	8	4		
TQ	10	10	1,5	
ETB	8	4		
TQ	10	10	2	Indiferente
MOX	0,1875	0,1875		
TQ	10	10	2	
MOX	0,1875	0,1875		
TQ	10	10	2	
MOX	0,1875	0,1875		
TQ	10	10	2	Indiferente
ESTR	0,5	0,5		
TQ	10	10	2	
ESTR	0,5	0,5		
TQ	10	5	1,5	
ESTR	1	0,5		
TQ	10	2,5	0,5	Sinérgica
MEF	20	5		
TQ	10	2,5	0,5	
MEF	20	5		
TQ	10	2,5	0,5	
MEF	20	5		

A partir da realização do teste de combinação envolvendo a TQ, juntamente dos fármacos usado no tratamento da TB, foi possível observar que as moléculas ESTR, MOX, RIF,

* Três experimentos independentes; TQ – tafenoquina; MOX – moxifloxacina; MEF – mefloquina; ESTR – estreptomicina; ETB- etambutol; INH- isoniazida; RIF- rifampicina;

ETB e INH, não possuem alteração em relação a seus MICs individuais em *M. tuberculosis* H37Ra. Ainda, o valor de FICI de cada combinação não mostrou interação entre os fármacos usados no tratamento contra a TB e a TQ. Podemos assim concluir que a análise do FICI sugeriu que esses medicamentos atuam de forma independente entre si, sendo importante ressaltar que nenhuma combinação demonstrou interações antagônicas nesses experimentos. Adicionalmente, foram realizados testes de combinação entre TQ e MEF contra *M. smegmatis* mc2155. No entanto a combinação de TQ e MEF neste microrganismo resultou interação indiferente.

Figura 8- Teste de combinação entre tafenoquina e moxifloxacina contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

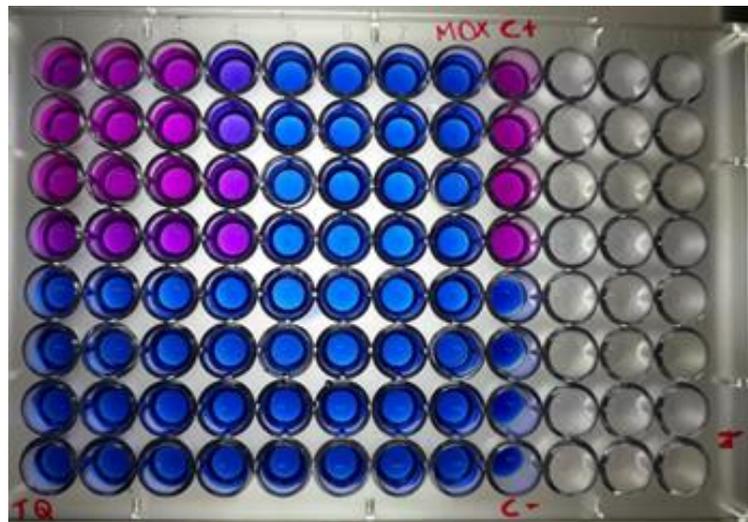


Figura 9- Teste de combinação entre tafenoquina e rifampicina contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

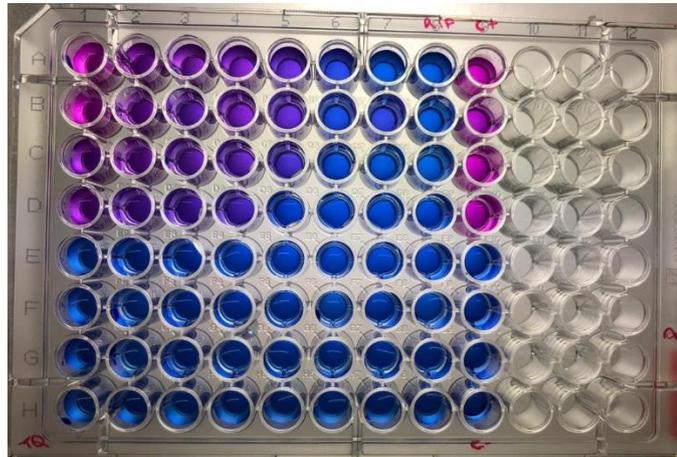


Figura 10- Teste de combinação entre tafenoquina e isoniazida contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

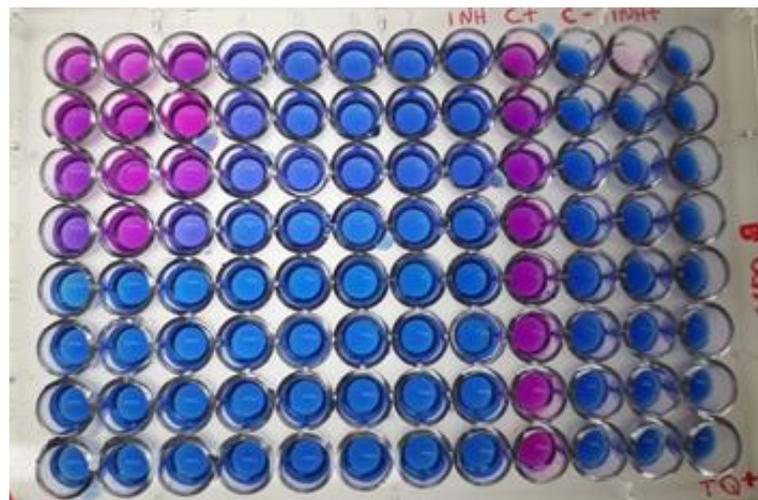


Figura 11- Teste de combinação entre tafenoquina e etambutol contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

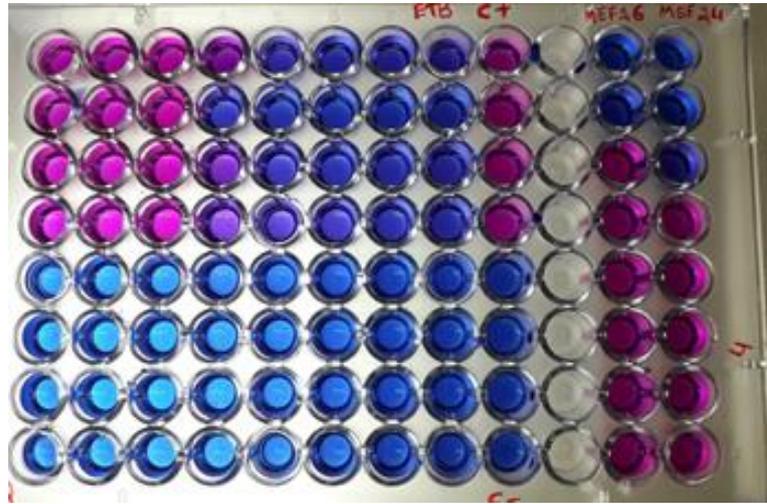
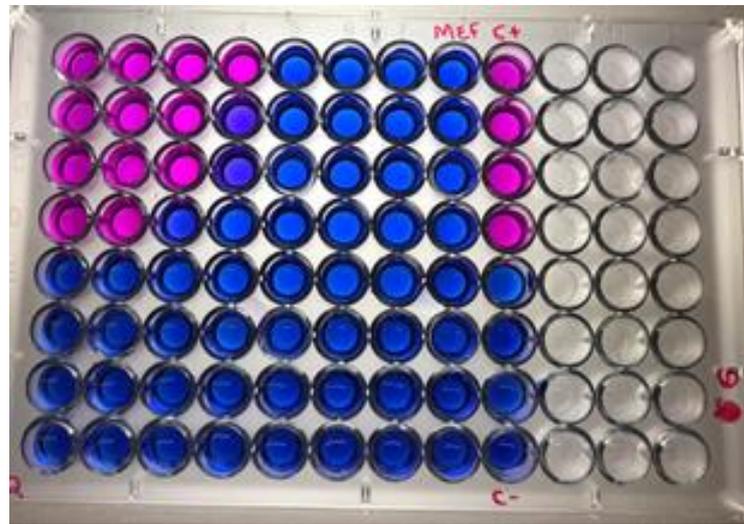


Figura 12- Teste de combinação entre tafenoquina e estreptomicina contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.



Figura 13- Teste de combinação entre tafenoquina e mefloquina contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.



Os resultados da combinação de MEF com TQ (Figura 13) sugerem interação sinérgica em *M. tuberculosis* H37Ra. Estes resultados podem ser justificados devido à capacidade da MEF interagir com outros fármacos que dependem de rotas de metabolismo semelhantes no corpo (LEWIS; GREGORIAN; PORTILO, 2019). No entanto, a presença de resultados a partir de testes *in vitro*, não podem constatar a existência desse mecanismo, para maior reconhecimento dos mecanismos de interação entre MEF e TQ faz se necessário a realização de mais estudos contra *M. tuberculosis*.

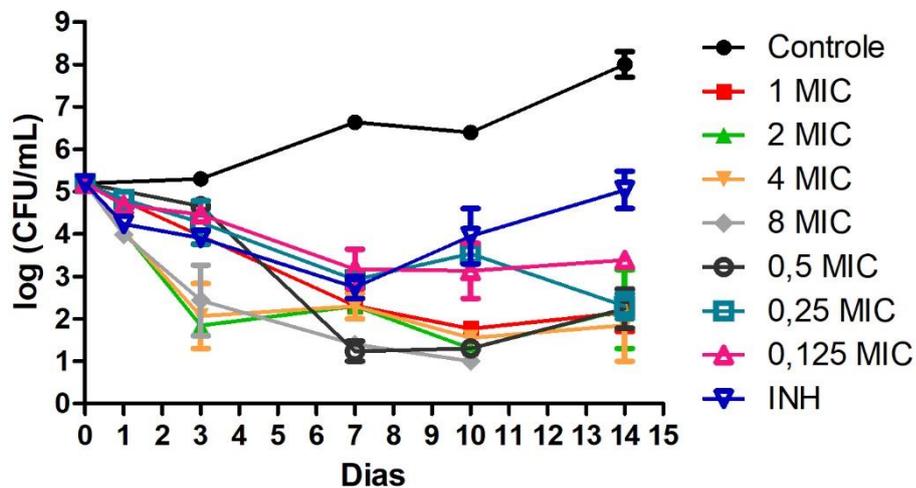
A determinação da interação entre a molécula da MEF juntamente com os fármacos utilizadas para o tratamento da TB, como INH, ETB, ESTR, MOX e RIF, foram determinados no estudo de Rodrigues- Júnior et al. (2016). Este trabalho mostrou que as combinações da MEF com os fármacos usados no tratamento da TB não possuem alteração em relação ao seu MIC contra cepas de *M. tuberculosis* H37Rv, bem como foi possível observar que o FICI não mostrou interação entre os medicamentos.

A presença da interação entre os fármacos da TQ e MEF pode indicar que estes agentes antimaláricos possuem a capacidade de ser empregados como um novo modelo de abordagem para o tratamento da TB.

5.3- Cinética de morte das bactérias frente ao antimalárico mais potentes

A realização de ensaios para determinação da curva de morte de um medicamento pode prever a farmacocinética e a farmacodinâmica do mesmo, bem como demonstrar o efeito bactericida deste fármaco. Além disso, esta metodologia permite a avaliação de combinações entre dois ou mais medicamentos contra um microrganismo em específico (DEMITTO *et al.*, 2014). Nesse sentido, a Figura 14 mostra a curva de morte de 7 concentrações diferentes de TQ contra *M. tuberculosis* H37Ra, durante 14 dias.

Figura 14- Curva de morte da tafenoquina (TQ) contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, durante 14 dias.



Durante avaliação da curva de morte é possível observar que a suspensão bacteriana tratada com 2,5 % de DMSO apresenta crescimento lento e progressivo, característico das cepas de *M. tuberculosis* (STEENWINKE *et al.*, 2010), sugerindo que a colônia selecionada para a realização deste teste se encontrava viável. As suspensões bacterianas expostas a concentrações acima da MIC da TQ (8,4 e 2x a MIC) apresentam atividade antimicrobiana significativa a partir do terceiro dia de avaliação. Quando comparada ao controle, observa-se que estas suspensões apresentam uma diminuição média de 2,5 log CFU/ mL.

Ao decorrer dos dias de exposição, observou-se que as suspensões bacterianas submetidas a concentrações de TQ acima da MIC, apresentam diminuição média de 2 log CFU/ mL no sétimo dia, 3,5 log CFU/ mL no décimo e décimo quarto dias, quando comparada à suspensão controle exposta ao DMSO. Suspensões bacterianas expostas a concentrações de TQ correspondentes ao seu MIC, bem como inferior a este, apresentaram atividade antimicrobiana durante todos os dias avaliados durante o ensaio da curva de morte.

A suspensão bacteriana submetida a concentração correspondente ao MIC da TQ apresentou diminuição de 1 log CFU/mL no terceiro dia, 4 log CFU/mL no sétimo dia, 4,5 log CFU/mL no décimo dia e 5,9 log CFU/mL no décimo quarto dia, em comparação a suspensão controle. Suspensões de *M. tuberculosis* H37Ra expostas a soluções com concentrações abaixo da MIC da TQ, apresentaram atividade no décimo quarto dia semelhantes a concentrações mais altas, ainda, foi possível observar que estas apresentam redução média de 4,5 log CFU/mL em relação ao controle.

Este ensaio da curva de morte, revelou o crescimento de bacilos após o sétimo dia de exposição à INH, o que não foi observado nas bactérias expostas a TQ. O aumento de colônias de *M. tuberculosis* viáveis em testes usando a INH já foram reportados em estudos de Gumbo *et al.* (2007) e Machado *et al.* (2018).

INH é um dos principais fármacos utilizados no tratamento da TB, esse medicamento apresenta atividade antimicrobiana inibindo a biossíntese dos ácidos micólicos em *M. tuberculosis* (BOLLELA *et al.*, 2016). Após administração da INH, este fármaco sofrerá ação da enzima catalase peroxidase (*katG*), para a formação do seu metabolito biologicamente ativo (UNISSA *et al.*, 2016).

Gumbo *et al.* (2007), observaram no seu estudo que 73 % das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* expostas a INH, obtiveram mutação no gene da *katG* (GUMBO *et al.*, 2007), mutações como *katG* são predominantes em isolados clínicos de *M. tuberculosis* e têm sido associados com transmissão direta (MACHADO *et al.*, 2018). A presença de mutação nesse gene está associada a presença de inibidores de INH nas cepas de *M. tuberculosis*, resultando em cepas resistentes a INH (TAKAWIRA *et al.*, 2017).

Além de mutações espontâneas no genoma de *M. tuberculosis*, Machado *et al.* (2012), observou no seu estudo que o sistema de efluxo desempenha um papel importante no desenvolvimento da resistência à INH (MACHADO *et al.*, 2012). A principal função das bombas de efluxo é expelir substâncias antimicrobianas (JAISWAL *et al.*, 2017). Estudos apontam que a super expressão de bombas de efluxo, provém uma redução nas concentrações intracelulares dos antibióticos e os impede de atingir seu alvo (AIMATAR *et al.*, 2020), resultando na formação de um fenotípico de resistência aumentado em células sobreviventes (NARANG *et al.*, 2017).

Os mecanismos pelo qual a TQ apresenta atividade antimicrobiana ainda é desconhecido, no entanto é possível concluir que este fármaco apresenta potencial contra cepas

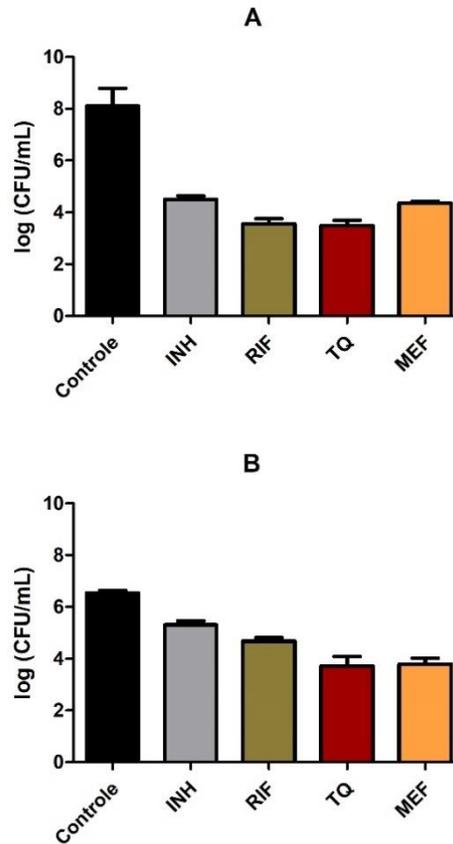
de *M. tuberculosis* H37Ra em diferentes concentrações no intervalo de 80 µM a 1,25 µM, durante 14 dias de tratamento, reduzindo a população bacteriana inicialmente exposta (5×10^5 CFU/mL).

5.4 - Efeitos das moléculas com maior potencial antimicobacteriano em cepas bacterianas submetidas a modelos de dormência, como depleção de nutrientes e estresse nitrosativo.

A exposição de clones de *My. tuberculosis* à depleção de nutrientes submete esses microrganismos a uma deficiência no fornecimento de nutrientes necessários para suas atividades de vida e replicação (BATYSHINA; SCHWARTZ, 2019). A incubação de 6 semanas da suspensão de *M. tuberculosis* em PBS diminuiu o consumo de oxigênio desses microrganismos, além de atrasar seu crescimento, sem reduzir a viabilidade, simulando o modelo de persistência que esses microrganismos apresentam durante a infecção nos seres humanos (BETTS *et al.*, 2002).

A Figura 15A, mostra os resultados da atividade antimicrobiana dos fármacos, MEF, RIF e INH contra *M. tuberculosis* H37Ra. A Figura 15B, evidencia a atividade antimicrobiana dos fármacos da TQ, MEF, RIF e INH contra *M. tuberculosis* H37Ra, submetida à depleção de nutrientes.

Figura 15- Atividade antimicrobiana dos fármacos da tafenoquina (TQ), mefloquina (MEF), rifampicina (RIF) e isoniazida (INH) contra as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (A) e H37Ra submetida ao modelo de depleção de nutrientes (B).



Os resultados (Figura 15A) comprovam a atividade antimicrobiana de TQ e MEF contra *M. tuberculosis* H37Ra. É possível observar que suspensões bacterianas expostas a TQ e MEF apresentam redução de aproximadamente 5 e 4 log CFU/mL, respectivamente, quando comparadas a suspensões tratadas com 2,5 % de DMSO. Suspensões bacterianas expostas a soluções de INH e RIF, apresentam atividade antimicrobiana média de 4,5 e 3,7 log CFU/mL, respectivamente.

Na Figura 15B, pode-se observar que os fármacos TQ, MEF, INH e RIF apresentam potencial antimicrobiano contra *M. tuberculosis* submetida à depleção de nutrientes. Ainda, observamos que os antimaláricos utilizados no tratamento das suspensões bacterianas submetidas à depleção de nutrientes obtiveram maior atividade quando comparado aos fármacos utilizados no tratamento da TB (INH e RIF): O grupo tratado com TQ apresentou uma média final de redução aproximada de 3,6 log CFU/mL, enquanto o grupo tratado com MEF apresentou média final de redução aproximada de 3,8 log CFU/mL, quando comparados ao controle. Grupos de *M. tuberculosis* expostos a INH apresentou uma média final de redução

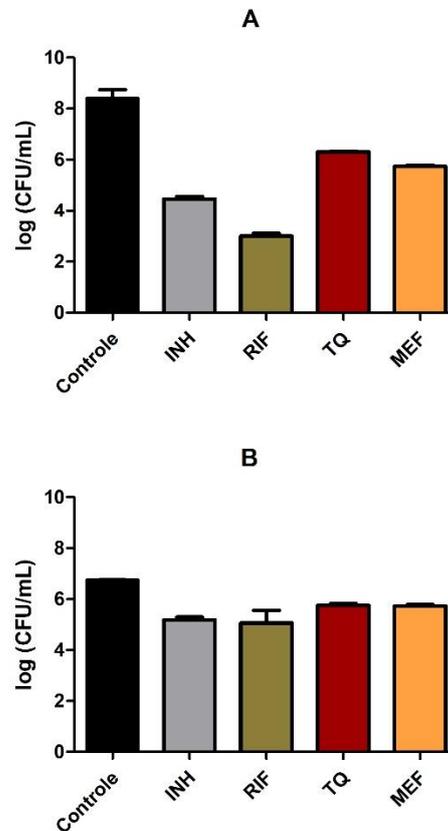
aproximada de 5,6 log CFU/mL, no mesmo momento que o grupo tratado com RIF apresentaram redução aproximada média de 4,9 log CFU/mL para RIF, quando comparados ao controle.

Sugere-se que, o fármaco TQ apresenta atividade antimicrobiana aproximada contra as duas amostras, sugerindo que este fármaco manterá seu mecanismo de ação em bacilos ativos e bacilos persistentes. O fármaco da MEF apresentou maior potencial em cepas de H37Ra submetidas a depleção de nutrientes, quando comparado a sua atividade em cepas de H37Ra, foi possível observar uma diferença de potencial antimicobacteriano deste fármaco de aproximadamente 0,5 log CFU/mL, entre os grupos de tratados. Os mecanismos pelo qual MEF e TQ possuem atividade antimicobacteriana em *M. tuberculosis* submetidas a depleção de nutrientes ainda são desconhecidos.

As suspensões de H37Ra submetidas a depleção de nutrientes, quando tratadas com soluções de INH e RIF, apresentaram diminuição na susceptibilidade a ambos os antimicrobianos (Figura 15B), quando comparada com as susceptibilidades da cepa H37Ra que não passou pelo processo de depleção de nutrientes (Figura 15A): é possível observar uma diferença de atividade média de 0,8 log CFU/mL para INH e 1,3 log CFU/mL para RIF. Estes resultados foram também observados no estudo de Sridevi *et al.* (2015) e Xie, Siddiqi e Rubin (2005), onde sugere-se que a diminuição da eficácia de INH e RIF está relacionada aos seus respectivos locais de ação, no qual estes serão irrelevantes em bacilos submetidos a depleção de nutrientes, tendo em vista que estes microrganismos não apresentaram replicação, bem como transcrição para a formação de novas bactérias (BETTS *et al.*, 2002).

Os estudos de Kawaji, Zhong e Whittington (2010) e Sridevi *et al.* (2015) e, apontam que a exposição de *M. tuberculosis* a NaNO₂ inibem a respiração aeróbica nas mitocôndrias destes microrganismos, além de reduzir seu crescimento, reproduzindo a capacidade de sobrevivência destes microrganismos em baixa atividade metabólica. A Figura 16 mostra a atividade antimicobacteriana da TQ e MEF contra a cepas de *M. tuberculosis* H37Ra submetidas a estresse nitrosativo.

Figura 16- Atividade antimicrobiana dos fármacos tafenoquina (TQ), mefloquina (MEF), rifampicina (RIF) e isoniazida (INH) contra as cepas *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (A) e H37Ra submetida ao modelo de estresse nitrosativo (B).



A Figura 16A, mostra a atividade antimicrobiana dos fármacos TQ, MEF, RIF e INH contra *M. tuberculosis* H37Ra. Aa Figura 16B, mostra a atividade antimicrobiana dos fármacos TQ, MEF, RIF e INH contra *M. tuberculosis* H37Ra submetida a estresse nitrosativo.

Os valores médios das CFUs que permaneceram viáveis após os tratamentos com os fármacos TQ, MEF, INH e RIF apresentaram redução (Figura 16A), quando comparados ao controle tratado apenas com 2,5 % de DMSO. Observou-se uma diminuição de aproximadamente 4 e 5,2 log CFU/mL após tratamento com INH e RIF respectivamente, e de 2 e 2,3 log CFU/mL após incubação com TQ e MEF, respectivamente, quando comparados ao controle.

Na Figura 16B, observa-se que os fármacos TQ, MEF, INH e RIF apresentaram potencial antimicrobiano contra *M. tuberculosis* submetida a estresse nitrosativo. Os antimaláricos utilizados no tratamento das suspensões bacterianas submetidas a estresse nitrosativo apresentaram relevante diminuição na quantidade de CFUs, indicando potencial antimicrobiano destes fármacos em bacilos expostos a NaNO₂. Foi possível observar uma

diferença aproximada de 0,3 log CFU/mL na atividade antimicrobiana entre os grupos da TQ, enquanto grupos da MEF apresentaram diferença de 0,3 log CFU/mL.

Observa-se que o fármaco da TQ apresenta atividade antimicrobiana aproximada, sugerindo que este fármaco manterá seu mecanismo de ação em bacilos ativos e bacilos expostos ao estresse nitrosativo. O fármaco da MEF apresentou maior potencial em cepas de H37Ra submetidas a NaNO₂. Os mecanismos pelo qual MEF e TQ possuem atividade antimicrobiana em *M. tuberculosis* submetidas a estresse nitrosativo ainda são desconhecidos.

Os fármacos INH e RIF diminuíram seu potencial antimicrobiano em H37Ra submetida a estresse nitrosativo, quando comparamos aos efeitos observados em suspensões bacterianas de *M. tuberculosis* H37Ra. Observou-se que ambos os fármacos apresentam atividade antimicrobiana relativamente semelhantes em cepas de H37Ra estressadas, apresentando uma média de aproximadamente 5 log CFU/mL para INH e 4,8 log CFU/mL para RIF.

A diminuição da atividade da INH e RIF em cepas de *M. tuberculosis* submetidas a modelos de dormência e estresse foi observada no estudo de Flint, Korkegian e Parish (2020), sugerindo que a diminuição nos potenciais antimicrobianos destes fármacos em suspensões submetidas a modelos de estresse pode estar relacionada com o surgimento de inibidores de metabolitos ativos destes fármacos, em cepas de *Mycobacterium* spp. submetidas a modelos de estresse (FLINT; KORKEGIAN; PARISH, 2020).

5.5- Concentrações Inibitórias Mínimas dos compostos antimaláricos de maior potencial frente a cepas resistentes em *Mycobacterium tuberculosis*

A fim de melhor elucidar a atividade da TQ e da MEF sobre *M. tuberculosis*, foram realizados experimentos a fim de determinar as MICs destas duas moléculas contra cepas de *M. tuberculosis* resistentes, bem como contra a cepa laboratorial e virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv, usando o método colorimétrico REMA. A Tabela 11, mostra a MIC de TQ e MEF contra isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes e contra *M. tuberculosis* H37Rv.

Tabela 11- Concentração inibitória mínima de tafenoquina (TQ) e mefloquina (MEF) contra a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a fármacos.

Isolados clínicos/cepa	MIC da TQ (μM)	MIC da MEF (μM)
Isolado 2	20	20
Isolado 12	10	20
Isolado 20	10	20
H37Rv	20	nd

Durante avaliação dos resultados obtidos, observa-se que os fármacos TQ e MEF apresentaram atividade antimicrobiana contra *M. tuberculosis* H37Rv e isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes. Em relação a cepa de H37Rv, sabe-se que esta apresenta sensibilidade aos fármacos da RIF e INH (Tabela 5), sugerindo que esta cepa não apresenta mutações em seu genoma que possam conferir resistência a estes 2 fármacos. O potencial antimicrobiano apresentado pela TQ nesta cepa, corrobora os resultados apresentados anteriormente em relação a sua atuação em cepas de *M. tuberculosis* H37Ra (Tabela 8).

Em relação aos 3 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes avaliados, sabe-se que estes isolados são considerados MDR-TB. De forma importante, os fármacos TQ e MEF apresentaram atividade antimicobacteriana nestes isolados clínicos (Tabela 11). Observa-se que as MICs da TQ frente às cepas resistentes testadas neste trabalho apresentaram valores semelhantes às MICs das cepas H37Rv e H37Ra, sugerindo que a TQ apresenta local de ação diferente a mutações presentes nestes 3 isolados clínicos.

Atividade antimicrobiana da MEF, observados a partir das MIC deste fármaco, em isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistente, comprovam resultados presentes neste trabalho, sugerindo que MEF tem potencial para ser utilizado no tratamento de cepas resistentes de *Mycobacterium* spp. A atividade antimicrobiana apresentada por MEF em cepas de *M. tuberculosis* resistentes, já foi reportada em estudos como de Krieger et al. (2015), Gonçalves et al. (2012) e Rodrigues Junior et al., (2016), e é importante ressaltar que este fármaco apresentou atividade em diferentes cepas resistentes. O mecanismo pelo qual a TQ e MEF apresentam atividade antimicobacteriana frente a cepas resistentes e sensíveis ainda é desconhecido.

Estudos envolvendo a determinação da MIC da TQ em cepas resistentes e *M. tuberculosis* não foram encontrados. O mecanismo pelo qual a TQ e MEF desenvolvem

atividade antimicobacteriana ainda é desconhecido, no entanto resultados presentes neste trabalho, bem como em estudos desenvolvidos por Kriger *et al.* (2015) e Rodrigues Junior *et al.* (2016), podem direcionar e desvendar seus reais mecanismo de ação em *Mycobacterium* spp.

O desenvolvimento de testes a fim de elucidar o(s) alvo(s) molecular(es) da TQ e da MEF tem por objetivo reconhecer possíveis locais de atuação destes fármacos em *M. tuberculosis* H37Ra. No presente estudo não foi possível observar crescimento de colônias resistentes aos fármacos da TQ e MEF, após o período de incubação. Ainda, podemos mencionar que a fim de melhor reconhecimento da ação da TQ em cepas de *M. tuberculosis*, se faz necessário à realização de estudos voltados para as eventuais alterações morfológicas desses microrganismos, quando submetidas a testes de atividade *in vitro* e *in vivo*.

A MEF apresenta MIC de 0,469 μ M em *P. falciparum* (GUPTA *et al.*, 2002), sabe-se que este fármaco atua como um esquizonticida do sangue, no entanto seu mecanismo de ação exato em *P. falciparum* não é totalmente conhecido (LEWIS; GREGORIAN; PORTILLO, 2019). No entanto, HAWLEY *et al.* (1998) observou que um dos principais mecanismos de ação da MEF, está relacionado a inibição da polimerização da heme (HAWLEY *et al.*, 1998) mecanismo este fundamental para a sobrevivência do *P.falciparum* na hemácia (AGUIAR, 2011). Resultados presentes no estudo de Ghavami *et al.* (2016) sugerem que a MEF é um inibidor potente e rápido do efluxo de aminoácidos de eritrócitos parasitados (GHAVAMI *et al.*, 2016).

Os mecanismos de ação citados neste estudo, bem como presentes na literatura, sugerem vias de ação para a MEF e TQ em *P. falciparum*, entretanto estes mecanismos são pouco relacionados à ação da MEF e TQ sobre cepas de *M. tuberculosis*, em especial pelo ciclo infeccioso dos dois patógenos. Para maior conhecimento dos mecanismos de ação da MEF e TQ sobre *M. tuberculosis* se faz necessário o desenvolvimento de estudos voltados para farmacodinâmica da MEF sobre estes microrganismos, a partir de estudos e *in vitro* e *in vivo* e mimetizando variadas condições metabólicas de micobactérias.

6- CONCLUSÕES

Os antimaláricos testados neste trabalho apresentaram atividade antimicobacteriana contra cepas de *M. tuberculosis* H37Ra e cepas de *Mycobacterium smegmatis* mc2155. Foram observados que a MIC desses fármacos foi de, 1. 372 μ M para PQ, 2. 612 μ M para CQ, 20 μ M para MEF e 10 μ M para TQ em *M. tuberculosis* H37Ra sendo os fármacos da TQ e MEF considerados o de melhor potencial.

Em relação às combinações da TQ com antituberculosos utilizados na terapia anti-TB, foi possível observar que nenhuma interação apresentou efeito antagonista, e que a combinação da TQ com a MEF, apresentou efeito sinérgico, sugerindo que a terapia conjunta desses fármacos pode eliminar bacilos de *M. tuberculosis* com doses mais baixas.

Com a avaliação da curva de morte da TQ contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, foi possível observar que este fármaco apresenta atividade antimicrobiana em diferentes concentrações tanto superiores quanto inferiores à sua MIC, demonstrando grande potencial de atividade contra *M. tuberculosis* H37Ra, durante 14 dias.

A submissão de cepas de *M. tuberculosis* H37Ra a modelos de dormência e estresse indicou que TQ e MEF, possuem potencial antimicobacteriano, sugerindo que o mecanismo de ação desses fármacos não será afetado em bacilos dormentes.

A determinação das MICs da TQ e da MEF contra isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes e *M. tuberculosis* H37Rv, corroborou com os resultados obtidos anteriormente com a cepa de *M. tuberculosis* H37Ra. TQ e MEF apresentam atividade antimicobacterianas contra 3 isolados MDR- TB, sugerindo que os mecanismos de ação divergem dos fármacos INH e RIF.

Estes resultados sugerem que os antimaláricos, sobretudo a TQ e a MEF, podem ser considerados como novos candidatos ou moléculas-protótipo para o desenvolvimento de fármacos para a terapia da TB, tendo em vista que estes medicamentos possuem uma estrutura ainda não vista entre os fármacos conhecidos para o tratamento desta doença. Cabe mencionar que para a elucidação dos seus mecanismos de ação se faz necessário o desenvolvimento de novas pesquisas envolvendo esses fármacos e *Mycobacterium* spp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. Avaliação da atividade citotóxica e antimalárica de análogos da cloroquina. 2011 (61f). Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2011.

AIMATAR, M.; VAR, I.; KAYAR, B.; KÖKSAL, F. Differential expression. Of resistant and efflux pump genes in MDR- TB isolates, Endocrinology, metabolic & immune disorders- Drug targets, v. 20, p. 01-17, 2020.

AN, Q.; LI, C.; CHEN, Y.; DENG, Y.; YANG, T.; LUO, Y. Repurposed drug candidates for antituberculosis therapy. European Journal of Medicinal Chemistry. v. 192, n. 1, p. 01- 44, 2020.

ASHLEY, E.; PHYO, A. P. Drugs in development for malária. Drugs, v. 78, n. 1, p. 861- 879, 2018.

BAÑULS, A.; SANOU, A.; ANH, N. T.; GODREUIL, S. *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and Evolution of a human bacterium. Journal of Medical Microbiology. v. 64, n. 01, p. 1261- 1269, 2015.

BARBIER, M.; WIRTH, T.; The Evolutionary History, Demography, and Spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Microbioly Spectrum, v. 4, n. 4, p. 01- 21, 2016.

BATYRSHINA, Y. R.; SCHWARTZ, Y.; Modeling of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy in bacterial cultures. Tuberculosis, v. 117, n. 1, p. 7- 17, 2019.

BERMUDEZ, L.; MEEK, L. Mefloquine and Its Enantiomers Are Active against *Mycobacterium tuberculosis* *In Vitro* and in Macrophages. Tuberculosis Research and Treatment. v. 1, n. 1, p. 01- 05, 2014.

BETTS, J.; LUKEY, P.; ROBB, L.; McADAM, R.; DUNCAN, K. Evaluation of a nutrienste starvation modelo of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling, Molecular Microbiology, v. 43, n. 3, p. 717- 731, 2002.

BOLLELA, V.; NAMBURETE, E.; FELICIANO, C.; MACHEQUE, D.; HARRISON, L.; CAMINERO, J. Detection of *katG* and *inhA* mutations to guide isoniazid and ethonamide use for drug-resistant tuberculosis, *International Tuberculosis Lung Dis*, v. 20, n. 8, p. 1099- 1104, 2016.

BRASIL, Ministério Da Saúde; Secretaria De Vigilância Em Saúde. Boletim Epidemiológico De Tuberculose, 2020.

BRASIL, Ministério Da Saúde; Secretaria De Vigilância Em Saúde. Guia De Tratamento Da Malária No Brasil, 2020.

BRASIL, Ministério Da Saúde; Secretaria De Vigilância Em Saúde. Manual De Recomendações Para O Controle Da Tuberculose No Brasil, 2019.

BRASIL, Ministério Da Saúde; Secretaria De Vigilância Em Saúde. Panorama Da Tuberculose No Brasil, 2019.

BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. v. 83, n. 1, p. 91- 97, 2003.

BRUCHFELD, J.; CORREIA- NEVES, M.; KALLENIOUS, G.; Tuberculosis and HIV coinfection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 5, n. 1, p. 01- 15, 2015.

BUSATTO, C.; REIS, A. J.; VALIM, A. R. M.; NUNES, L. Z. CARNEIRO, M. POSSUELO, L. Tuberculose ativa versus Tuberculose Latente: uma revisão de literatura. *Official Journal of the Brazilian Association of Infection Control and Hospital Epidemiology Professionals*. v. 2, n. 3, p. 5324, 2013.

CAMBAU, E.; DRANCOURT, M. Steps towards the Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. *Clinical Microbiol Infect*. v. 20, n. 1, p. 196- 201, 2014.

CARVALHO, A.; CARDOSO, C.; MATIRE, T.; MIGLIORI, G.; SANT'ANNA, C.; Aspectos epidemiológicos, manifestações clínicas e prevenção da tuberculose pediátrica sob a perspectiva da Estratégia *End TB*. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. v. 44, n. 2, p. 134- 144, 2018.

CARVALHO, L.; MARTÍNEZ- GARCIA, M.; PÉREZ- VICTORIA, I.; MANZANO, J.; YARDLEY, V.; GAMARRO, F.; PÉREZ- VICTORIA, J. The Oral Antimalarial Drug Tafenoquine Shows Activity against *Trypanosoma brucei*. *JournalASM*. v.59, n. 10, p. 6151- 6160, 2015.

CHATUVERDI, V.; DWIVEDI, N.; TRIPATHI, R. P.; SINHA, S. Evaluation of *Mycobacterium smegmatis* as a possible surrogate screen for selecting molecules active against multi- drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal General Application Microbiology*, v. 53, n. 01, p. 333- 337, 2007.

CROWLE, A. J.; MAY, M. H. Inhibition of tubercle bacilli in cultured human macrophages by chloroquine used alone and in combination with streptomycin, isoniazid, pyrazinamide, and two metabolites of vitamin D3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 34, n. 11, p. 2217–2222, 1990.

DALBERTO, P.; SOUZA, E.; ABBADI, B.; NEVES, C.; RAMBO, R.; RAMOS, A.; MACCHI, F.; MACHADO, P.; BIZARRO, C.; BASSO, L. Handling the hurdles on the way to anti- tuberculosis drug development. *Frontiers, in chemistry*, v. 8, n. 1, p. 01- 27, 2020.

DANIEL, T. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicini*, v. 1, n. 1, p. 1862- 1870, 2006.

DAVANÇO, M. G.; AGUIAR, A. C. C.; SANTOS, L. A.; PADILHA, E. C.; CAMPOS, M. L.; ANDRADE, C. R.; FONSECA, L. M.; SANTOS, J. L.; CHIN, C. M.; KRETTLI, A. U.; PECCININI, R. G. Evaluation of antimalarial activity and toxicity of a new primaquine produg. *Plos One*, v. 9, n. 8, p. 1- 10, 2014.

DEMITTO, F. O.; AMARAL, R. C. R.; MALTEMPE, F. G.; SIQUEIRA, V. L. D.; SCODRO, R. B. L.; LOPES, M. A.; CALESSI- FERRACIOLI, K. R.; CANEZIN, P. H.; CARDOSO, R. F. In vitro activity of rifampicin and verapil combination in multidrug- resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, v. 10, n. 2, p. 01- 09, 2015.

FAUSTINI, A.; HALL, A. J.; PERUCCI, C. A. Tuberculosis treatment outcomes in Europe: a systematic review. *European Respiratory Journal*. v. 26, n.3, p. 503- 510, 2005.

FAUSTINI, A.; HALL, A.; PERUCCI, C. Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: A systematic review. *BMJ Journals*, v. 1, n. 61, p. 158-163, 2006.

FERREIRA, K. R.; ORLANDI, G. M.; SILVA, T. C.; BERTOLOZZI, M. R.; FRANÇA, F. O. S.; BENDER, A. Representations on adherence to the treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 52, n. December, p. e03412, 2018.

Ferreira, M. Primaquina e carboxiprimaquina em pacientes com malária vivax. 2014 (74f). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêutica do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (Curso de Mestrado). Universidade Federal do Pará, Pará, 2014.

FLINT, L.; KORKEGIAN, A.; PARISH, T. InhA inhibitors have activity against non- replicating *Mycobacterium tuberculosis*, PLoS ONE, v. 15, n. 11, p. 01- 06, 2020.

FRAMPTON, J. Tafenoquine: First Global Approval. ADIS, v. 1, n. 1, p. 01- 07, 2018.

GHAVAMI, M.; DAPPER, C. H.; DALAL, S.; HOLZSCHENEIDER, K.; KLEMBA, M.; CARLIER, P. Parallel inhibition of amino acid efflux and growth of erythrocytic *Plasmodium falciparum* by mefloquine and non- piperidine analogs: Implication for the mechanism of antimalarial action. Bioorganic & Medical Chemistry Letters, p. 01- 05, 2016.

GOÇALVES, R. S. B.; KAISER, C. R.; LOURENÇO, M. C. S.; BEZERRA, F. A. F. M.; SOUZA, M. V. N.; WARDELL, J. L.; WARDELL, S. M. S. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; COSTA, T. Mefloquine-oxazolidine derivatives, derived from mefloquine and arenecarbaldehydes: In vitro activity including against the multidrug-resistant tuberculosis strain T113. Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 20, n. 1, p. 243–248, 2012.

GOHEEN, M. P.; BARTLETT, M. S.; SHAW, M. M.; QUEENER, S. F.; SMITH, J. W. Effects of 8-aminoquinolines on the ultrastructural morphology of *Pneumocystis carinii*. Int J Exp Pathol 74: 379–387, 1993.

GÓMEZ- TANGARIFE, V.; GÓMEZ- RESTREPO, A. J.; ROBLEDO- RESTREPO, J.; HERNÁNDEZ- SARMIENTO, J. M. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: contribution of constituent and acquired mechanisms, v. 20, n. 4, p. 491- 497, 2018.

GREGÓRIO, T.; PIRES, I.; CACHULO, M.; REIS, A.; MATEUS, C.; OLIVEIROS, B.; ABREU, JR.; SILVA, R.; CASTELO-BRANCO, M. Avaliação da Toxicidade Retiniana da Hidroxicloroquina: Revista da Sociedade Portuguesa de Oftalmologia, v. 36, n. 3, p. 193-206, 2012.

GUIMARÃES, A. B. G.; MELLO, D. C.; SOUSA, L. A. C.; SILVA, S. T. F.; SOUZA, V. F. A. História Da Tuberculose Associada Ao Perfil Socioeconomico No Brasil: Uma Revisão Da Literatura. Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - FACIPE, v. 3, n. 3, p. 43, 2018.

GUMBO, T.; LOUIE, A.; LIU, A.; AMBROSE, P.; BHAVNANI, S.; BROWN, D.; DRUSANO, G. Isoniazid's bactericidal activity ceases because of the emergence of resistance, not depletion of *Mycobacterium tuberculosis* in the log phase of growth. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 15, n. 195, p. 194- 201, 2007.

GUPTA, N.; KUMAR, R.; AGRAWAL, B. New players in immunity to Tuberculosis: The host microbiome, lung epithelium and innate immune cells. *Frontiers in Immunology*. v. 9, n. 709, p. 01- 10, 2018.

GUPTA, S.; THAPAR, M. M.; WENSDORFER, W. H.; BJORKMAN, A. *In vitro* interactions of artemisinin with atovaquone, quinine, and mefloquine against *Plasmodium falciparum*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 5, p. 1510- 1515, 2002.

HAWLEY, S. R.; BRAY, P. G.; MUNGTHIN, M.; ATKINSON, J. D.; O'NEILL, P. M.; WARD, S. A. Relationship between antimalarial drug activity, accumulation, and inhibition of heme polymerization in *Plasmodium falciparum* *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 3, p. 682- 686, 1998.

HEIRICHS, M.; MAY, R.; HEIDER, F.; REIMERS, F.; SY, S.; PELOQUIN, C.; DARENDORF, H. *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Ra and H37rv have equivalent minimum inhibitory concentrations to most antituberculosis drugs. *International Journal of Mycobacteriology*. v. 7, n. 2, p. 156- 161, 2020.

HUANG, L.; NAZAROVA, E. V.; RUSSEL, D. G. *Mycobacterium tuberculosis*: Bacterial fitness within the host macrophage *Microbiol Spectrum*, v. 7, n. 2, p. 01- 18, 2019.

ISLAM, M.M.; HAMEED, H.M.A.; MUGWERU, J.; CHHOTARAY, C.; WANG, C.; TAN, Y.; LIU, J.; LI, X.; TAN, S.; OJIMA, I.; YEW, W.W.; NUERMBERGER, E.; LAMICHHANE, G.; ZHANG, T. Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy, *Journal of Genetics and Genomics* (2017).

ITTARAT, I.; ASAQAMAHASAKDA, W.; MESHNICK, S; R. The effects of antimalarials on the *Plasmodium falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase. *Experimental Parasitology*, v. 79, p. 50- 56, 1994.

JAISSWAL, I.; JAIN, A.; VERMA, S.; SINGH, P.; KANT, S.; SINGH, M. Effect of efflux pump inhibitors on the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid, Lung India, v. 34, n. 6, p. 499- 505, 2017.

KAWAJI, S.; ZHONG, L.; WHITTINGTON, R. J. Partial proteome of *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis under oxidative and nitrosative stress. Veterinary Microbiology, v. 145, p. 252- 264, 2010.

KRIGER, D.; VESENBECKH, S.; SCHONFELD, N.; BETTERMANN, G.; BAUER, T. T.; RUSSMANN, H.; MAUCH, H. Mefloquine has *in vitro* activity against MDR- TB and should be evaluated in clinical studies. European Respiratory Society, v. 1, n. 1, p. 01- 02, 2015.

LEE, S. Tuberculosis Infection and Latent Tuberculosis. Tuberculosis Infection and Latent Tuberculosis. Tuberculosis and Respiratory Diseases. v. 79, n. 1, p. 201- 206, 2016.

LEITE JÚNIOR, J. C.; RAMOS, R. T. T.; ROBAZZI, T. C. M. V. Tratamento da tuberculose latente em pacientes com doenças reumáticas juvenis: uma revisão sistemática. Revista Brasileira de Reumatologia, v. 57, n. 3, p. 245–253, 2017.

LEVY, J.; TOWERS, C.; THORNBURN, A. Targeting autophagy in cancer. Nat Rev Cancer, v. 17, n. 9, p. 528- 542, 2017.

LEWIS, J.; GREGORIAN, T.; PORTILLO, I. Drug interactions with antimalarial medications on older travelers: a clinical guide. Journal of Travel Medicine, v. 1, n. 1, p. 01- 14, 2019.

LOUGHEED, K. E. A.; TAYLOR, D. L.; OSBRONE, S. A.; BRYANS, J. S.; BUXTON, R. S. Europe PMC Funders Group New Anti-tuberculosis Agents Amongst Known Drugs. v. 89, n. 5, p. 364–370, 2010.

LU, K.; DERCSHIRE, E. R. Tafenoquine: A step toward malaria elimination. Biochemistry, v. 1, n. 1, p. 01- 10, 2020.

LUGO- VILLARINO, G.; NEYROLLES, O. Manipulation of the mononuclear phagocyte system by *Mycobacterium tuberculosis*. Cold Spring Harb Perspect Med. v.4, n. 1, p. 01- 14, 2014.

MACHADO, D.; COUTO, I.; PARDIGÃO, J.; RODRIGUES, L.; PORTUGAL, I.; BAPTISTA, P.; VEIGAS, B.; AMARAL, L.; VIVEIROS, M. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS ONE, v. 7, n. 4, p. 01- 12, 2012.

MACHADO, D.; PERDIGÃO, J.; PORTUGAL, I.; PIERONI, M.; SILVA, P.; COUTO, I.; VIVEIROS, M. Efflux activity differentially modulates the levels of isoniazid and rifampicin resistance among multidrug resistant and monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, v. 7, n. 18, p. 01- 17, 2018.

MAHAJAN, P.; NIKAM, M.; NAWALE, L.; KHEDKAR, V.; SARKAR, D.; GILL, C. Synthesis and Antitubercular Activity of New Benzo[*b*]thiophenes. ACS Medical Chemistry Letters. v. 7, n. 1, p. 751-756, 2016.

MAMATHA, H. G.; SHANTHI, V. Baseline resistance and cross resistance among fluoroquinolones in multi drug resistance *Mycobacterium tuberculosis* isolates at a national reference laboratory. Journal of Global Antimicrobial Resistance, v. 1, n. 1, p. 01- 22, 2017.

MAO, J.; YUAN, H.; WANG, Y.; WAN, B.; PAK, D.; RONG, H.; FRANZBLAU, S. Synthesis and antituberculosis activity of novel mefloquine- isoxazole carboxylic esters as prodrugs. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 20, n. 01, p. 1623- 1268, 2010.

MCCANN, H. D. et al. Energy stress-mediated cytotoxicity in tuberous sclerosis complex 2-deficient cells with nelfinavir and mefloquine treatment. Cancers, v. 10, n. 10, 2018.

MELARIRI, P.; KALOMBO, L.; NKUNA, P.; DUBE, A.; HAYESHI, R.; OGUTU, B.; GIBHARD, L.; deKOCK, C.; SMITH, P.; WIESNER, L.; SWAI, H. Oral lipid- base nanoformulation of tafenoquine enhanced bioavailability and blood stage antimalarial efficacy and led to a reduction in human red blood cells loss in mice. International Journal of Nanomedicine, v. 10, p. 1493- 1503, 2015.

MORDUE, D.; WORMSER, G. Could the drug tafenoquine revolutionize treatment of *Babesia microti* infection? The Journal of Infectious Diseases, v. 220, n. 1, p. 442- 447, 2019.

MOTA, P. Isolamento e identificação molecular de micobactérias não tuberculosas. 2011 (71f). Programa de Pós-Graduação em Biologia do departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (Curso de Mestrado). Universidade de Aveiro, Portugal, 2011.

MURADÁS, T. C.; ABBADI, B. L.; VILLELA, A. D.; MACCHI, F. S.; BERGO, P. F.; FREITAS, T. F.; SPEROTTO, N. D. M.; TIMMERS, L. F. S. M.; SOUZA, O. N.; PICADA, J. N.; FACHINI, J.;

SILVA, J. B.; ALBUQUERQUE, N. C. P.; HABENSCHUS, M. D.; CARRÃO, D. B.; ROCHA, B. A.; BARBOSA JUNIOR, F.; OLIVEIRA, A. R. M.; MASCARELLO, A.; NEUENFELDF, P.; NUNES, R. J.; MORBIDONI, H. R.; CAMPOS, M. M.; BASSO, L. A.; RODRIGUES- JUNIOR, V. S. Pre- clinical evaluation of quinoxaline- derived chalcones in tuberculosis. PLoS ONE, v. 13, n. 8, p. 01- 13, 2018.

MURRAY, J.; SCHRAUFNAGEL, D. E.; HOPEWELL, P. C.; Treatment of tuberculosis: A historical perspective. Ann Am Thorac Society. v. 12, n. 12, p. 1749- 1759, 2015.

MUSA, K.; RIDZWAN, N. F.; MOHAMAD, S.; TAYYAB, S. Combination mode of antimalarial drug meflouquine and human sérum albumin: Insights from spectroscopic and docking approaches. Wiley Periodicals, v. 1, n. 1, p. 1- 11, 2019.

NARANG, A.; GIRI, A.; GUPTA, S.; GARIMA, K.; BOSE, M.; VARMA- BASIL, M. Contribution of putative efflux pump genes to isoniazid in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, Inf Journal of Microbioly, v. 6, n. 2, p. 177- 183, 2017.

NELSON, K. M.; VISWANATHAN, K.; DAWADI, S.; DUCKWORTH, B. P.; BOSHOFF, H.; BARRY 3rd, C. E.; ALDRICH, C. C. Synthesis and pharmacokinetic evaluation of siderophore biosynthesis inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis*. Journal Med Chem, v. 58, n. 14, p. 5459- 5475, 2015.

NGUTA, J. M.; APPIAH- OPONG, R.; NYARKO, A. K.; YEBOAH- MANU, D.; ADDO, P. G. A. Current perspectives in drug discovery against tuberculosis from natural products. International Journal of Mycobacteriology, v. 4, n. 3, p. 165–183, 2015.

NKOT, J. L.; BIKOBO, S. N.; ZINTCHEM, A. A. A.; NYEMECK II, N. M.; NDEDI, E. D. F. M.; DIBOUÉ, P. H. B.; PEGNYEMB, D. E.; BOCHET, C. G.; KOERT, U. Antitubercular evaluion of root extract and isolated phytochemicals from *Lophira lanceolata* against two resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Pharmaceutical Biology. v. 56, n. 1, p. 318- 324, 2018.

NOGUEIRA, A.; FACCHNETTI, V.; SOUZA, V.; VASCONCELOS, T. Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos. Revista Brasileira de farmácia. v. 93, n. 1, p. 03- 09, 2012.

ODDS, F. C.; Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. J Antimicrob Chemother v. 52, n. 1, p. 01- 02, 2003.

OLIVEIRA, A. M.; CHAVEZ, J.; LEON, G. P.; DURAND, S.; ARROSPIDE, N.; ROBERTS, J.; CABEZAS, C.; MARQUÍÑO, W. Efficacy and effectiveness of mefloquine and artesunate combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. *American Journal Tropical Medicine*, v. 85, n. 3, p. 573- 578, 2011.

OLIVEIRA, S. M. Fatores associados ao alto risco de abandono do tratamento da tuberculose em Porto Alegre - Região Sul do Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2018.

PAI, M.; BEHR, M.; DAWDY, D.; DHEDA, D.; DIVANGAHI, M.; BOEHME, C.; GINSBERG, A.; SWAMINATHAN, S.; SPIGELMAN, M.; GETAHUN, H. MENZIES, D.; RAVIGLIONE, M. Tuberculosis. *Nature Reviews*, v. 2, n. 1, p. 01- 23, 2016.

PAVIĆ, K.; PERKOVIĆ, I.; POSPIŠILOVÁ, S.; MACHADO, M.; FONTINHA, D.; PRUDÊNCIO, M.; JAMPÍLEK, J.; COFFEY, A.; ENDERSEN, L.; RIMAC, H.; ZORC, B. Primaquine hybrids as promising antimycobacterial and antimalarial agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 8, p. 01- 26, 2017.

PAVIĆ, K.; RAJIĆ, Z.; MICHNOVÁ, H.; JAMPÍLEK, J.; IVANA PERKOVIĆ, I.; ZORC, B. Second generation of primaquine ureas and bis- ureas as potential antimycobacterial agents, *Molecular Diversity*, v.1, n. 1, p. 01- 11, 2018.

PERDIGÃO, J.; SILVA, H.; MACHADO, D.; MACEDO, R.; MALTEZ, F.; SILVA, C.; JORDÃO, L.; COUTO, I.; MALLARD, K.; COLL, F.; HILL- CAWTHORNE, G. A.; MCNERMEY, R.; PAIN, A.; CLARK, T. G.; VIVEIROS, M.; PORTUGAL, I. Unraveling *Mycobacterium tuberculosis* genomic diversity and Evolution in Lisbon, Portugal, a highly drug resistant setting. *BMC Genomics*, v. 15, p. 01- 20, 2014.

PIETERS, J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. *Cell host & Microbe*, v. 3, n. 1, p. 399- 407, 2008.

PLANTONE, D.; KOUDRIAVTSEVA, T. Current and future use of chloroquine and hydroxychloroquine in infectious, immune, neoplastic, and neurological diseases: A mini- review. *ADIS*, v. 1, n. 1, p. 01- 19, 2018.

POKROVSKY, V. Tuberculosis and HIV- AIDS: The alien and the predator. *Lancet*, v. 390, n. 1, p. 1618- 1619, 2017.

PUSHPAKOM, S.; IORIO, F.; EYERS, F.; ESCOTT, K. J.; HOPPER, S.; WELLS, A.; DOIG, A.; GUILLIAMS, T.; LATIMER, J.; MCNAMEE, C.; NORRIS, A.; SANSEAU, P.; CAVALLA, D.; PIRMOHAMED, M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews*, v. 1, n. 1, p. 01- 18, 2018.

QUEIROZ, A.; RILEY, L. Q. Bacterial immunostat: *Mycobacterium tuberculosis* lipids and their role in the host immune response. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, n. 1, p. 09-18, 2017.

RABAHI, M. F.; SILVA JÚNIOR, J. L. R.; FERREIRA, A. C. G.; TANNUS- SILVA, D. G. S.; CONDE, M. B. Tratamento da tuberculose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. v. 43, n. 5, p. 472–486, 2017.

RAHMAN, M. A.; SARKAR, A. Extensively Drug- resistant Tuberculosis (XDR- TB): A daunting challenge to the current End Tb strategy and policy recommendations. *ScienceDirect*, v. 1, n. 1, p. 01-08, 2017.

RAMHARTER, M.; NOEDL, H.; THIMASARN, K.; WIEDERMANN, G.; WERNSDORFER, G.; WERNSDORFER, W. *In vitro* activity of tafenoquine alone and in combination with artemisinin against *Plasmodium falciparum*. *American Journal Tropical Medicine*, v. 67, n. 1, p. 39- 43, 2002.

RISHIKESH, K.; SARAVU, K. Primaquine treatment and relapse in *Plasmodium vivax* malária. *Pathogenus and Global Health*, v. 110, n. 1, p. 1- 8, 2016.

RODRIGUES-JUNIOR, V. S.; VILLELA, A. D.; GONÇALVEZ, R. S. B.; ABBADI, B. L.; TRINDADE, R. V.; LOPEZ- GÁVIN, A.; TUDÓ, G.; GÓNZALEZ- MARTÍN, J.; BASSO, L. A.; SOUZA, M. V. N.; CAMPOS, M. M.; SATOS, D. S. Mefloquine and its oxazolidine derivative compound are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and in a murine model of tuberculosis infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 48, n. 2, p. 203–207, 2016.

SALGAME, P.; GEADAS, C.; COLLINS, L.; JONES- LÓPEZ, E.; ELLENER, J. Latent tuberculosis infection- Recisiting and revising concepts. *Tuberculosis*, p. 01- 11, 2015.

SANTOS, N. C.; SCODRO, R. B. L.; ALMEIDA, A. L.; BALDIN, V. P.; VASCONCELOS, S. S. N.; SIQUEIRA, V. L.D.; CALEFFI- FERRACIOLI, K. R.; CAMPANERUT- SÁ, P. A. Z.; CARDOSO, R. F. Combinatory, activity of linezolid and levofloxacin with antituberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. v. 111, n. 1, p. 41- 44, 2018.

SEIFERT, M.; CATANZARO, D.; CATANZARO, A.; RODWEL, T. Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review: Mutations Associated with Isoniazid Resistance. Journal Plos One, v. 1, n. 1, p. 01-13, 2015.

SEUNG, K.; KESHAVJEE, S.; RICH, M.; Multidrug- resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis. Cold Spring Harb Perspect Med, v. 5, n. 1, 2015.

SIENIAWSKA, E.; SAWICKI, R.; SWATKO- OSSOR, M.; NAPIORKOWSKA, A.; PZERKORA, A.; GINALSKA, G.; AUGUSTYNOWICZ- KOPEC, E. The effect of combining natural terpenes and antituberculous agentes against reference and clinical *Mycobacterium tubérculos* strains, Molecules, v. 23, n. 176, p. 01- 14, 2018.

SILVA, D.; DALCOMO, M.; TIBERI, S.; ARBEX, M.; MUNOZ- TORRICO, M.; DUARTE, R.; DAMBROSIO, L.; VISCA, D.; RENDON, A.; GAGA, M.; ZUMIA, A.; MIGLIORI, G. Novos fármacos e fármacos repropostos para o tratamento da tuberculose multirresistente e extensivamente resistente. Jornal Brasileiro de Pneumologia. v. 44, n. 2, p. 153- 160, 2018.

SINGH, G.; KUMAR, A.; MANN, P.; KAUR, J. Cell wall factors of *Mycobacterium tuberculosis* as major virulence determinants: Current perspectives in drugs Discovery and design. Betham Science. v. 18, n. 1, p. 1904- 1918, 2017.

SRIDEVI, J. P.; SURYANKA, P.; JANUPALLY, R.; SRIDHAR, J.; SONI, V.; ANANTARAJU, H. S.; YOGESWARI, P.; SRIRAM, D. Indentification of potencial *Mycobacterium tuberculosis* topoisomerase I inhibitors: A study against active, dormant and resistant tuberculosis. European Journal of Pharmaceutical Science. v. 72, n. 1, p. 81- 92, 2015.

STEENWINKEL, J.; KNEGT, G.; KATE, M.; BELKUM, A.; VERBRUGH, H.; KREMER, K.; SOLLINGEN, D.; BAKKER- WOUDEBERG, M. Time- kill kinetics of anti- tuberculosis drugs, nd emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal Antimicrobiology Chemother, v. 1, n. 1, p. 01- 08, 2010.

TAKAWIRA, F.; MADISHORA, R.; DHLAMINI, Z.; MUNEMO, E.; STRAY, PEDERSEN, B. Mutations in rpoB and katG GENES OF MULTIDRUG RESISTANT MECHANISM *Mycobacterium tuberculosis* undetectable using genotyping diagnostic methods. PanAfrican Medical Journal, v. 27, n. 145, p. 01- 16, 2017.

THAKKAR, N.; GREEN, J.; KOH, G.; DUPARC, S.; TENERO, D.; GOYAL, N. Population Pharmacokinetics of Tafenoquine, a Novel Antimalarial. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v. 62, n. 11, p. 01- 11, 2018.

THENLINGWANI, R.; BONN, B.; CHIBALE, K.; MASIMIREMBWA, C. Physicochemical and drug metabolism characterization of a series of 4- aminoquinoline- 3- hydroxypyridin- 4- one hybrid molecules with antimalarial activity, Expert Opinion Drug Metabolism Toxicology, v. 10, n. 10, p. 1314- 1324, 2014.

TONELLI, M.; NOVELLI, F.; TASSO, B.; SPARATORE, A.; BOIDO, V.; SPARATORE, F.; CANNAS, S.; MOLICOTTI, P.; ZANETTI, S.; PARAPINI, S.; LODDO, R. Antitubercular activity of quinoliziny/ pyrrolizidinylalkyliminophenazines. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 22, n. 01, p. 6837- 6845, 2014.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. Microbiologia-12ª Edição. Artmed Editora, 2016. ISBN 8582713541.

TUKULULA, M.; SHARMA, R.; MEURILLON, M.; MAHAJAN, M.; NARAN, K.; WARNER, D.; HUANG, J.; MEKONNEN, B.; CHIBALE, K. Synthesis and antiplasmodial and antimycobacterial evaluation of new nitromidazole and nitroimidazoxazine derivatives. ACS Publications, v. 01, n. 01, p. 01- 04, 2012.

UNISSA, A. N.; SUBBIAN, S.; HANNA, L. E.; SELVAKUMAR, N. . Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Infection, Genetics and Evolution, v.45, p. 474–492, 2016.

VAL, F.; COSTA, F. T.; KING, L.; BRITO- SOUSA, J. D.; BASSAT, Q.; MONTEIRO, W. M.; SIQUEIRA, A. M.; LUZZATTO, L.; LACERDA, M. V. G. Tafenoquine for the prophylaxis, treatment and elimination of malária: eagerness must meet prudence. *Future Microbiology*, v. 2, n. 2, p. 01- 20, 2019.

VARTAK, A.; GOINS, C.; MOURA, V.; SCHREIDAH, C.; LANDGRAF, A.; LIN, B.; DU, J.; JACKSON, M.; RONNING, D.; SUCHECK, S. Biochemical and microbiological evaluation of *N*- aryl urea derivatives against mycobacteria and mycobacterial hydrolases. *Royal Society of Chemistry*. v. 10, n. 1, p. 1197- 1204, 2019.

VIEIRA, J. L. F.; BORGES, L. M. G.; FERREIRA, M. V. D.; RIVERA, J. G. B.; GOMES, M. S. M. Patient age does not affect mefloquine concentrations in erythrocytes and plasma during the acute phase of falciparum malária. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 2, n. 5, p. 482- 486, 2016.

VIICHÈZE, C.; JABOS JR, W. The Isoniazid paradigm of killing. Resistance, and persistence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal Molecular Biology*. v. 431, n. 18, p. 3450- 3461, 2019.

VILLALBA, M Reposicionamento de fármacos para tratamento de doenças infecciosas bacterianas. 2015 (40f). Programa de Pós-graduação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Curso de Especialização). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2015.

WILBURN, K. M.; FIEWEGER, R. A.; VANDERVEN, B. C. Cholesterol and fatty acids grease the wheels of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Pathogens and Disease*, v. 76, n. 1, p. 01- 14, 2018.

WORDL HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report. 2020.

WORDL HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for treatment of drug- susceptible tuberculosis and patient care. 2017.

XIE, Z.; SIDDIQI, N.; RUBIN, E. Differential antibiotic susceptibilities of starved *Mycobacterium tuberculosis* isolates, *American Society for Microbiology*, v. 449, n. 11, p. 4778- 4780, 2005.

ZORC, B.; PERKOVIĆ, I.; PAVIĆ, K.; RAJIĆ, Z.; BEUS, M. Primaquine derivates: Modifications of the terminal amino group. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 182, n. 01, p. 01- 19, 2019.