

FLÁVIA DE FREITAS MENDES

**PROSPECÇÃO DE NOVOS CANDIDATOS A
FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE: UMA
ABORDAGEM *in vitro***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Coordenadoria de
Controle de Doenças da Secretaria
de Estado da Saúde de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof^a Dr^a Rosângela
Siqueira de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. André
Gustavo Tempone Cardoso

**SÃO PAULO
2022**

FLÁVIA DE FREITAS MENDES

**PROSPECÇÃO DE NOVOS CANDIDATOS A
FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE: UMA
ABORDAGEM *in vitro***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Coordenadoria de
Controle de Doenças da Secretaria
de Estado da Saúde de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof^a Dr^a Rosângela
Siqueira de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. André
Gustavo Tempone Cardoso

**SÃO PAULO
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Mendes, Flávia de Freitas

Prospecção de novos cêndidos a fãrmacos antituberculose: uma abordagem *in vitro*.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Rosângela Siqueira de Oliveira.

Co-orientador(a): Dr. André Gustavo Tempone

1. Tuberculose/microbiologia. 2. Mycobacterium tuberculosis/efeitos dos fãrmacos. 3. Reposicionamento de medicamentos/métodos.

SES/CCD/CD - 436/2021

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

Dedicatória

***Aos meus pais, Líliam e
Décio, meu irmão Gabriel
e meus avós/padrinhos
Valdomiro (in memoriam)
e Erodite.***

Agradecimentos

Aos meus pais, Líliam e Décio, e ao meu irmão, Gabriel, que me deram amor, incentivo, apoio, exemplo, cuidado e paciência para esta realização.

A minha orientadora, Dra. Rosângela Siqueira de Oliveira, pela oportunidade, confiança, paciência, amizade e por ter compartilhado seu conhecimento e experiência com valiosos ensinamentos acadêmicos e pessoais.

Ao Dr. André Gustavo Tempone por todos os ensinamentos, paciência e por ter cedido os fármacos utilizados neste estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e a todos os professores que foram importantes para esta formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder a bolsa de estudos.

À minha amiga Helen Caroline Nantes pelos anos de amizade e apoio em todos os momentos.

Ao Centro de Bacteriologia e toda a equipe do Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do Instituto Adolfo Lutz. Obrigada de coração, vocês foram muito importantes por todo o apoio, ensinamentos, conversas, cafés e almoços compartilhados desde o Programa de Aperfeiçoamento Profissional.

Ao Centro de Parasitologia e Micologia e toda a equipe do Núcleo de Novos Fármacos- Doenças Negligenciadas. Em especial à Maiara Maria Romanelli e Isabela Teresa Santos Corrêa por todos os ensinamentos e apoio na execução dos experimentos.

Epígrafe

***“Em algum lugar, algo
incrível está esperando
para ser descoberto”
(Carl Sagan)***

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* que apresenta alta morbidade e mortalidade. Atualmente, a tuberculose afeta 9,9 milhões de pessoas em todo o mundo e é responsável por cerca de 1,3 milhões de mortes, sendo um sério problema de Saúde Pública global. O tratamento da TB é composto por uma associação de fármacos e dura seis meses. A frequência de doentes infectados com isolados resistentes aos fármacos de primeira linha, principalmente os isolados multirresistentes, é uma ameaça mundial que caracteriza um importante problema de saúde pública no controle da TB em vários países. Existem poucos medicamentos para o tratamento da TB multi-resistente e com base nesta problemática o presente estudo visou a avaliação do potencial farmacológico *in vitro* de fármacos aprovados, utilizando a abordagem de reposicionamento de fármacos. A partir de uma triagem *in vitro* de 89 fármacos, foram selecionados os que apresentaram atividade antituberculose para a avaliação da concentração inibitória mínima, os fármacos foram avaliados em exposição a 23 isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e a cepa ATCC H37 RV 27294 *in vitro* utilizando o ensaio de resazurina. Além disso, foram realizados ensaios de citotoxicidade contra células de mamíferos NCTC L929 em cultura, determinando-se os Índices de Seletividade *in vitro*. Dentre os 89 fármacos testados, quatro (amiodarona, flunarizina, ivermectina e pentamidina) apresentaram atividade antituberculose a 10 µM. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) 90% da amiodarona resultou em 5-10 µM, flunarizina 10 µM, ivermectina 0,15 – 10 µM e pentamidina 1,25-10 µM. Os índices de seletividade observados para a amiodarona foram de 4,21 – 8,43, flunarizina >20, ivermectina 1,17 – 78,47 e pentamidina 14,40 – 115,2. Com base na atividade e citotoxicidade da amiodarona, foi realizado um ensaio fluorimétrico utilizando Sytox Green para avaliar a permeabilidade de membrana plasmática do complexo *M. tuberculosis* na presença deste fármaco. Foi observado que a amiodarona não alterou a permeabilidade da membrana plasmática do Complexo *M. tuberculosis*, tendo seu mecanismo de ação letal por outra via. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a amiodarona, flunarizina, ivermectina e pentamidina apresentaram um potencial antimicrobiano promissor e poderão ser futuramente estudadas em associadas terapêuticas *in vitro*.

Palavras-chave: tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, reposicionamento de fármacos.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* that has high morbidity and mortality. Currently, tuberculosis affects 9,9 million people worldwide and is responsible for about 1,3 million deaths, being a serious global public health problem. The treatment of TB consists of a combination of drugs and lasts for six months. The frequency of infected patients with resistance to first-line drugs, especially possible multidrug-resistant ones, is a global threat that characterizes an important public health problem in the control of TB in several countries. There are few medications for the treatment of multi-resistant TB and based on this issue, the present study aimed to evaluate the in vitro pharmacological potential of drugs, using the drug repositioning approach. From an in vitro screening of 89 drugs, dissipators of antituberculosis activity were selected for the assessment of minimal inhibitory concentration, the drugs were evaluated in exposure to 23 available *Mycobacterium tuberculosis* complex and the ATCC H37 RV 27294 strain in vitro using the resazurin assay. In addition, cytotoxicity assays were performed against NCTC L929 mammalian cells in culture, determining in vitro Selectivity indices. Among the 89 drugs tested, four (amiodarone, flunarizine, ivermectin and pentamidine) dual anti-tuberculosis activity at 10 μ M. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 90% of amiodarone resulted in 5-10 μ M, 10 μ M flunarizine, 0.15 - 10 μ M ivermectin and 1.25-10 μ M pentamidine. The observed selectivity indices for amiodarone were 4.21 - 8.43, flunarizine > 20, ivermectin 1.17 - 78.47 and pentamidine 14.40 - 115.2. Based on the activity and cytotoxicity of amiodarone, a fluorimetric assay was performed using Sytox Green to assess the permeability of the plasma membrane of the *M. tuberculosis* complex in the presence of this drug. It was observed that amiodarone did not alter the permeability of the plasma membrane of the *M. tuberculosis* Complex, having its lethal mechanism of action through another route. According to the results obtained in this study, an amiodarone, flunarizine, ivermectin and pentamidine dissipates a promising antimicrobial potential that can be studied in the future in associated in vitro therapies.

Keywords: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, drug repurposing.

Lista de abreviaturas e siglas

°C	Graus Celsius
CO ₂	Gás carbônico
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μg	Micrograma
AIDS	Acquire Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
AIE	Anti-inflamatório esteroideal
AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG	Bacille Calmette e Guérin
CDC	Center Of Disease Control and Prevention (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CC50	Concentração citotóxica 50%
CC90	Concentração citotóxica 90%
CIM90	Concentração inibitória mínima 90%
CMT	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Conitec	Comissão Nacional de Incorporação de Novas Tecnologias no SUS
DFC	Dose Fixa Combinada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNDi	Drugs for Neglected Diseases initiative (Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas)
EMA	European Medicine Agency (Agência Européia de Medicamentos)
FDA	Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Medicamentos)
g	Grama
HBSS	Hank's Balanced Solution
HIV	Human immunodeficiency vírus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IS	Índice de seletividade
Kg	Quilograma
L	Litro
LED	Light Emitting Diode (Diodo emissor de luz)
LJ	Lowenstein-Jensen
M- 199	Meio M-199
mg	Miligrama
MR	Multirresistente
MGIT	Mycobacteria growth indicator tube (Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias)

mL	Mililitro
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
NCTC	National Collection of Type Cultures
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OADC	Ácido Oléico, Albumina, Dextrose e Catalase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
RPM	Rotação por minuto
RR-TB	Tuberculose rifampicina resistente
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TB-MR	Tuberculose multirresistente
TB-XDR	Tuberculose extensivamente resistente
TRM	Teste Rápido Molecular
U\$	Dólar
UFC	Unidade Formadora de Colônia
XDR	Extensivamente resistente

Lista de tabelas

Tabela 1- Diagnóstico diferencial da tuberculose pulmonar	25
Tabela 2- Fármacos disponíveis para o tratamento de tuberculose	27
Tabela 3— Esquema de tratamento indicado para casos de TB-MR	33
Tabela 4- Fármacos com potencial de reposicionamento em uso clínico e em estudos pré-clínicos.	39
Tabela 5- Fármacos que foram avaliados.	44
Tabela 6-Concentração inibitória mínima dos fármacos pelo método da resazurina.	64
Tabela 7- Resultado da concentração citotóxica 50% e concentração citotóxica 90% dos fármacos ativos contra isolados do complexo <i>M. tuberculosis</i>	65
Tabela 8- Índice de seletividade dos fármacos que foram ativos contra isolados do complexo <i>M. tuberculosis</i>	66

Lista de figuras

Figura 1 - Microscopia Eletrônica do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
Figura 2 - Modelo da placa de screening dos fármacos.	59
Figura 3- Avaliação por espectrofluorimetria da permeabilidade da membrana do Complexo <i>M. tuberculosis</i> H37Rv tratado com o amiodarona no CIM ₉₀ (20 µM) e 2X o CIM ₉₀ (40 µM) utilizando o fluoróforo Sytox Green® (excitação 485 nm e emissão 520 nm).....	67
Figura 4- Avaliação por espectrofluorimetria da permeabilidade da membrana plasmática do Complexo <i>M. tuberculosis</i> MR tratado com o amiodarona no CIM ₉₀ (10 µM) e 2X CIM ₉₀ (20 µM) utilizando o fluoróforo Sytox Green® (excitação 485 nm e emissão 520 nm).	68

Índice

1.0 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 HISTÓRIA DA TUBERCULOSE.....	15
1.1.2 A IMPORTÂNCIA DA DESCOBERTA DO GÊNERO <i>MYCOBACTERIUM</i>	15
1.1.3 PALEOMICROBIOLOGIA.....	15
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO	16
1.3 EPIDEMIOLOGIA.....	18
1.4 TRANSMISSÃO.....	19
1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	19
1.6 DIAGNÓSTICO	20
1.6.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO	20
1.6.2 DIAGNÓSTICO POR IMAGEM	20
1.6.3 DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO	20
1.6.4 TESTE RÁPIDO MOLECULAR	22
1.6.5 CULTURA.....	23
1.6.6 DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	24
1.6.7 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	24
1.7 PREVENÇÃO E TRATAMENTO.....	25
1.8 TESTE DE SENSIBILIDADE	28
1.8.1 MGIT BACTEC 960 (BECTON DICKINSON, NEW JERSEY, EUA).....	28
1.8.2 MÉTODO DAS PROPORÇÕES	29
1.8.3 LINE PROBE ASSAY (TESTE DE SONDA EM LINHA)	30
1.9 RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS	30
1.10 TUBERCULOSE MULTIDROGA RESISTENTE (TB -MR).....	32
1.11 TRATAMENTO DA TB – MR.....	32
1.12 TUBERCULOSE EXTENSIVAMENTE RESISTENTE (TB-XDR)	33
1.13 TRATAMENTO DA TB – XDR.....	34
1.14 NOVOS FÁRMACOS	35
1.15 ESTRATÉGIA DE REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS	37
1.16 RELEVÂNCIA DO ESTUDO.....	41
2.0 OBJETIVOS.....	43

2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3.0 METODOLOGIA	44
3.1 MODELO DO ESTUDO.	44
3.2 REAGENTES E COMPOSTOS SINTÉTICOS	56
3.3 ISOLADOS CLÍNICOS.	56
3.4 DEFINIÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	57
3.5 CULTIVO DOS ISOLADOS.....	57
3.6 TRIAGEM DOS FÁRMACOS.....	57
3.7 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM ₉₀)	59
3.8 CULTURA DE CÉLULAS	59
3.9 ENSAIO DA CITOTOXICIDADE.....	60
3.10 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE MEMBRANA COM SYTOX GREEN	61
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
4.0 RESULTADOS.....	63
4.1 TRIAGEM DA BIBLIOTECA DE FÁRMACOS.	63
4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS FÁRMACOS ATIVOS NA ETAPA DA TRIAGEM.....	63
4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE MAMÍFERO	65
4.4 ESTUDO DA PERMEABILIDADE DE MEMBRANA.....	67
5.0 DISCUSSÃO.....	69
6.0 CONCLUSÕES.....	78
6.1 CONCLUSÕES GERAIS.....	75
7.0 BIBLIOGRAFIA.....	79

1.0 Introdução

1.1 História da Tuberculose

1.1.2 A importância da descoberta do Gênero *Mycobacterium*

Em março de 1882, Robert Koch, um médico alemão apresentou a identificação e o cultivo do agente etiológico da tuberculose (TB). Ele revolucionou a ciência ao identificar o bacilo encontrado em um tecido doente, corá-lo, isolá-lo *in vivo*, reproduzindo a doença em animais de laboratório (Barberis *et al.*, 2017; Barnes *et al.*, 2000; Cambau e Drancourt, 2014).

Robert Koch e Louis Pasteur foram os principais fundadores da ciência da bacteriologia e Lehmann e Neumann, em 1896, agruparam os microrganismos pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (Collins *et al.* 1997; Schultz, 2011). A descoberta do *Mycobacterium tuberculosis* foi agraciada com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1905. (Sakula, 1982; Schultz, 2011).

Devido às características do *Mycobacterium tuberculosis* serem semelhantes aos de fungos em cultura líquida, a denominação do gênero teve origem do latim *fungus bacterium* (Collins *et al.*, 1997).

De acordo com “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature”, há 194 espécies validadas e de “habitats” variados, pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (Parte *et al.*, 2020).

1.1.3 Paleomicrobiologia

Os primeiros relatos sobre a TB foram encontrados na Índia e datam de 700 a.C. Hipócrates (460-375 a. C.) é responsável pela etimologia do termo tísico (Grego phthisikós e Latim Phthisicus) que significa excessivamente magro, utilizado para se referir a TB. Aristóteles (384 – 322 a. C.) foi um dos primeiros a descrever o aspecto contagioso da tuberculose e deu origem a Tisiologia, área da Medicina que estuda a TB e outras doenças pulmonares (Barberis *et al.* 2017; Cambau e Drancourt, 2014).

A Paleomicrobiologia contribui para demonstrar a existência da doença ao longo do tempo, pois detecta, identifica e caracteriza microrganismos em restos mortais, por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), microscopia e imunodeteção. O DNA da bactéria presente no hospedeiro pode estar preservado após cerca de 20.000 anos e o DNA de bactérias ambientais em permafrost de 400.000-600.000 anos. (Cambau e Drancourt, 2014; Drancourt e Raoult, 2005). Existem evidências sobre a presença da TB em 44 múmias que datam de 3.700 a 1.000 a. C., a maioria da 21ª dinastia e em múmias de personalidades da 17ª dinastia do Egito como Amenophis IV e sua esposa Nefertiti onde foram encontradas lesões compatíveis com a tuberculose (Rosemberg, 1999).

Em relação à presença da TB nas Américas pré-coloniais, a dúvida que existia foi elucidada após o isolamento do DNA de *M. tuberculosis* numa múmia de uma mulher (1.000 a. C.) encontrada no Peru tornando evidente a presença da doença neste período. Também foram relatadas epidemias e mortes por TB em povos indígenas durante da colonização do país, possivelmente pela disseminação de cepas de *M. tuberculosis* que foram transmitidas pelos colonizadores europeus (Darling, 2014).

No estudo de Comas *et al.* (2013) foram analisados genomas completos de 259 cepas do complexo *M. tuberculosis*, com o objetivo de caracterizar a diversidade global e reconstruir a história evolutiva do patógeno. Estima-se que o Complexo *M. tuberculosis* surgiu na África, cerca de 70.000 anos atrás, entretanto o gênero *Mycobacterium* pode ter surgido há cerca de 150 milhões de anos (Hayman, 1984). Segundo Gutierrez *et al.* (2005) a diversidade genética intraespécies, é usualmente gerada por mutações no DNA e por trocas genéticas horizontais, por este motivo, o bacilo da TB pode ter surgido há cerca de 35.000 anos, possivelmente utilizando os primeiros hominídeos na África como hospedeiros.

1.2 Agente etiológico

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que pode ser causada por qualquer uma das espécies do *Complexo Mycobacterium tuberculosis*:

M. tuberculosis, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae*, *M. mungi*, *M. orygis* e *M. suricattae* (Brasil, 2019; Bespiatykh *et al.*, 2021).

Em saúde pública a espécie de maior importância é *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 1), uma bactéria aeróbica, em forma de bacilo e que não possui cápsula, nem esporos (Lawn e Zumla, 2011; Brasil, 2019). O envelope celular desta bactéria está localizado acima da parede de peptidoglicano, e é rica em lipídeos, glicolipídeos e polissacarídeos, que formam os ácidos micólicos e as lipoarabinomananas que contribuem para o crescimento lento da bactéria, resistência aos ácidos e desinfetantes, ativação das reações inflamatórias do hospedeiro e agem como fatores de virulência (Cole *et al.*, 1998).



Figura 1 – Microscopia Eletrônica do *Mycobacterium tuberculosis*. Foto: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). <https://www.niaid.nih.gov/news-events/nih-launches-large-tb-prevention-trial-people-exposed-multidrug-resistant-tb>.

1.3 Epidemiologia

Até a atualidade, a tuberculose permanece como um sério problema de Saúde Pública, pois em 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou cerca de 9,9 milhões de casos novos de tuberculose no mundo (WHO, 2021a).

Na maioria dos casos, a TB é uma doença vulnerável ao tratamento medicamentoso, mas ainda assim foi responsável por cerca de 1,3 milhões de mortes em 2020 (WHO, 2021a). Juntamente com o vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês Human Immunodeficiency Virus), em 2020, a TB foi responsável por cerca de 214.000 óbitos (WHO, 2021a).

Embora o número de mortes tenha diminuído entre 2000 e 2019, a TB é a principal causa de morte por um único agente infeccioso em todo o mundo em 2019 e está acima do HIV/AIDS (WHO, 2021a).

O Brasil é um dos 30 países priorizados pela OMS que concentram 90% da carga mundial de TB (WHO, 2021a). Em 2020, foram notificados 66.819 casos novos, correspondendo a um coeficiente de incidência de 31,6/100.000 habitantes. Destes casos, 58.106 (87%) são de TB pulmonar e 8.713 (13%) de TB extrapulmonar (Ministério da Saúde, 2021). Em 2019, foram registrados 4.532 óbitos por TB, resultando em um coeficiente de mortalidade igual a 2,2 óbitos/100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2021).

Em 2020 o Estado de São Paulo notificou 15.823 casos novos de tuberculose, com uma taxa de incidência de 34,2 por 100.000 habitantes, correspondendo a 23,68% da totalidade dos casos novos do Brasil (Ministério da Saúde, 2021). Em relação a TB pulmonar, foram notificados 13.382 casos novos, correspondendo a 23,03% dos casos do Brasil e 84,6% dos casos do Estado de São Paulo. Foram notificados 2.441 casos de TB extrapulmonar, correspondendo a 28% dos casos no Brasil e 15,4% dos casos notificados no Estado de São Paulo. A incidência de óbitos no Estado de São Paulo foi de 2,0 casos/ 100 mil habitantes, resultando em 901 óbitos (Ministério da Saúde, 2021).

1.4 Transmissão

A TB normalmente afeta os pulmões, chamada de TB pulmonar, mas também pode afetar outros locais e nestes casos denomina-se TB extrapulmonar. A transmissão da doença é por via aérea, quando as pessoas que estão doentes com TB pulmonar ou laríngea eliminam a bactéria no ar, como, por exemplo, tossindo e espirando (WHO, 2019).

Geralmente, uma pequena proporção (5-10%) das pessoas infectadas com *M. tuberculosis* irá desenvolver a forma ativa da doença. De acordo com a OMS, cerca de 1,7 bilhões de pessoas são infectadas no mundo. No entanto, a probabilidade de desenvolver tuberculose é muito maior entre as pessoas infectadas pelo HIV, e também é maior entre as pessoas com fatores de risco, como subnutrição, diabetes e consumo de álcool (WHO, 2019).

1.5 Manifestações Clínicas

Na tuberculose pulmonar, as manifestações clínicas apresentadas são: tosse, produtiva ou não (com muco e eventualmente sangue), febre vespertina (que não costuma ultrapassar 38.5°C), sudorese noturna e emagrecimento, embora alguns indivíduos possam não apresentar esta perda de peso e ainda assim ter TB pulmonar (BRASIL, 2019).

Na tuberculose extrapulmonar, as manifestações clínicas podem variar de acordo com o sítio de infecção, por exemplo: a tuberculose meningocefálica, que na forma subaguda apresenta cefaleia holocraniana, irritabilidade, alterações de comportamento, sonolência, anorexia, vômitos, dor abdominal, fotofobia e rigidez de nuca por tempo superior a duas semanas; a tuberculose óssea que normalmente afeta a coluna torácica baixa e a lombar e seu quadro clínico apresenta-se com a tríade dor lombar, dor à palpação local e sudorese noturna (BRASIL, 2019).

1.6 Diagnóstico

1.6.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico é realizado por meio de exame físico e dos sinais e sintomas apresentados pelo indivíduo, considerando diferentes apresentações clínicas de acordo com o órgão acometido (Brasil, 2019).

1.6.2 Diagnóstico por imagem

O diagnóstico da TB pode ser feito por meio de exames de imagem. O exame radiológico tem como objetivo avaliar a extensão de possíveis lesões pulmonares e sua evolução durante o tratamento e excluir outra doença pulmonar associada (Brasil, 2019).

A radiografia do tórax deve ser realizada em todos os pacientes com suspeita de tuberculose (Brasil, 2019).

A tomografia computadorizada por emissão de pósitrons 18F-fluorodeoxiglicose, que é um radiofármaco, pode ser utilizada em casos de TB pulmonar e de TB extrapulmonar e também identifica alterações bioquímicas como o aumento do consumo de glicose nos tecidos (Brasil, 2019).

Em casos de TB meningocefálica, a tomografia computadorizada e a ressonância nuclear magnética do sistema nervoso central podem identificar a doença precocemente (Brasil, 2019).

1.6.3 Diagnóstico bacteriológico

O diagnóstico bacteriológico é realizado por meio da baciloscopia da amostra clínica. O teste consiste em um esfregaço da amostra clínica em lâmina de microscopia corado pela metodologia de Ziehl Neelsen, padronizada pelo Ministério da Saúde para ser utilizada pelos laboratórios que realizam diagnóstico de tuberculose. Esta metodologia de coloração permite a visualização dos bacilos presentes na amostra devido a sua

característica de serem Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAAR). A lâmina é observada em microscópio de campo claro (Brasil, 2008).

O esfregaço pode ser feito de duas maneiras: pela baciloscopia direta que utiliza o escarro sem qualquer tratamento prévio ou pelo método da baciloscopia com concentração, que é realizada com amostra clínica após tratamento. A baciloscopia após tratamento possui uma etapa de centrifugação que concentra os bacilos e é muito útil para as amostras paucibacilares (poucos bacilos) e também é recomendada para o diagnóstico de tuberculose extrapulmonar, tuberculose infantil e em pacientes vivendo com HIV/AIDS (Brasil, 2008).

O resultado é interpretado de acordo com a quantidade de bacilos observados por campo da seguinte forma para amostras de escarro coradas pelo método de Ziehl Neelsen:

- 0 BAAR em 100 campos (negativo)
- 1 a 9 BAAR em 100 campos (relata-se a quantidade de bacilos encontrados)
- 10 a 99 BAAR em 100 campos (Positivo +)
- 1 a 10 BAAR nos primeiros 50 campos observados (Positivo ++)
- Mais de 10 BAAR por campo (Positivo +++)

Em outras amostras clínicas o resultado é interpretado de outra forma: amostras em que não encontrados BAAR são negativas e amostras onde são encontradas qualquer quantidade de BAAR são relatados o número de BAAR observados (Brasil, 2008).

Os resultados bacteriológicos confirmam a tuberculose ativa em pacientes com quadro clínico sugestivo de TB (Brasil, 2019).

A baciloscopia é realizada pelos laboratórios de saúde pública e privada que sejam tecnicamente habilitados e pode ser feita a partir de material pulmonar ou extrapulmonar. Se executada corretamente pode detectar de 60% a 80% dos casos de TB pulmonar em adultos devido ao número de bacilos (5.000 a 10.000 por mililitro) necessários para ser possível a sua visualização na baciloscopia. Em crianças a sensibilidade do

teste é reduzida devido à dificuldade de coleta de uma amostra com boa qualidade (Brasil, 2019; Brasil, 2008).

Este método diagnóstico pode ser também utilizado para o controle de tratamento para acompanhar sua eficácia por meio da redução ou negatização de bacilos da amostra (Brasil, 2008).

1.6.4 Teste Rápido Molecular

Em 2013, foi implantado no Brasil o teste rápido molecular (TRM-TB), o Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, Califórnia, EUA) com o objetivo de diagnosticar casos novos de tuberculose e simultaneamente a detecção da resistência a rifampicina após a recomendação da Comissão Nacional de incorporação de Novas Tecnologias no SUS (Conitec, 2012).

O objetivo de detectar precocemente a resistência à rifampicina é devido ao fato de ser o principal fármaco para o tratamento da tuberculose, com ação bactericida. Resistência a este fármaco é considerado como um marcador da tuberculose multirresistente, uma vez que, mais de 80% dos casos de resistência detectados pelo TRM-TB apresentam também resistência à isoniazida (Brasil, 2019).

É um teste baseado na amplificação dos ácidos nucleicos, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para detecção do DNA (Ácido desoxirribonucleico) dos bacilos do *M. tuberculosis* e a detecção da resistência a rifampicina utilizando 4 sondas do gene *rpoB* (Brasil, 2019; Cepheid, 2021).

A sensibilidade de detecção do *M. tuberculosis* pelo TRM-TB em escarro de adultos é de 90% e a sensibilidade da detecção de resistência à rifampicina é de 95%. O limite de detecção é de 131 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL (Brasil, 2019).

O resultado pode ser liberado em até duas horas e o processo é automatizado, tornando o diagnóstico mais rápido por ser realizado a partir de amostras clínicas (Brasil, 2019).

As amostras que podem ser utilizadas no TRM-TB são: escarro; escarro induzido; lavado broncoalveolar, lavado gástrico, líquido, gânglios linfáticos e outros tecidos. Em casos de TB extrapulmonar, a sensibilidade é mais baixa que nas amostras pulmonares e por isso um resultado negativo não exclui a tuberculose (Brasil, 2019).

Além da recomendação do TRM-TB para o diagnóstico dos casos novos de TB, o mesmo também é recomendado em casos de retratamento e recidivas, mas somente para a detecção da resistência a rifampicina (Brasil, 2019).

Com o objetivo de aprimorar o TRM-TB, foi lançado o Xpert MTB/ RIF Ultra. Nesta nova versão, o resultado pode estar disponível em menos tempo, cerca de 80 minutos e o limite de detecção do *M. tuberculosis* diminuiu para 11,8 UFC/mL porque foram acrescentadas duas sondas, a IS6110 e a IS1081 além do gene *rpoB*. Com isso a sensibilidade de detecção do *M. tuberculosis* que era de 90 %, passou a ser de 95% (Cepheid, 2021).

1.6.5 Cultura

A cultura permite a multiplicação e isolamento de BAAR a partir da semeadura de amostras clínicas em meios de cultura específicos para este tipo bacilo (Brasil, 2008).

O limite de detecção da cultura é de 100 bacilos por mililitro, podendo chegar a 10 bacilos por mililitro, o que torna esta metodologia mais sensível do que a baciloscopia e teste rápido molecular Xpert MTB/Rif, com limite de detecção de 5.000-10.000 e 131 bacilos por mililitro, respectivamente. Entretanto o Xpert MTB/Rif Ultra tem a mesma sensibilidade da cultura, 11,8 bacilos por mililitro (Brasil, 2008; Brasil, 2019; Cepheid, 2021).

A cultura pode ser realizada em meio sólido ou líquido. Os meios sólidos mais utilizados são à base de ovo, como o Lowenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh. A vantagem de se utilizar o meio sólido é o baixo índice de contaminação e a desvantagem é o tempo de detecção do crescimento

bacteriano, que pode variar de 14 a 60 dias. A leitura é feita a olho nu, pela visualização das colônias no meio (Brasil, 2008).

Com o objetivo de diminuir o tempo de detecção dos bacilos na cultura foi desenvolvido o meio MGIT (do inglês *Mycobacteria growth indicator tube*). É um método automatizado que utiliza meio de cultura líquido e o tempo para a obtenção de resultado positivo varia de 5 a 12 dias. Para o caso de resultado negativo o tempo é de 42 dias (Brasil, 2019).

De acordo com o Ministério da Saúde, a cultura é o padrão ouro para o diagnóstico da TB e deve ser realizada para todos os casos de TB com diagnóstico pelo TRM-TB (sensível ou resistente a rifampicina) e nos casos de TRM negativo com persistência dos sintomas. Caso não seja possível realizar o diagnóstico por meio do TRM-TB, o diagnóstico deve ser feito pela baciloscopia e a cultura, realizada independentemente do resultado da baciloscopia (Brasil, 2019).

1.6.6 Diagnóstico histopatológico

O diagnóstico da tuberculose pulmonar e extrapulmonar podem ser feitos a partir da análise histopatológica de fragmentos de tecidos obtidos por biópsia. A identificação histológica do granuloma com necrose e caseificação é compatível com o diagnóstico de tuberculose pulmonar (Brasil, 2019).

A análise histológica permite buscar o bacilo no fragmento de tecido em casos de indivíduos imunossuprimidos, uma vez que estes indivíduos apresentam baciloscopia negativa com maior frequência (Brasil, 2019).

1.6.7. Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve ser realizado em casos de pneumonia de resolução lenta, febre de origem indeterminada e tosse prolongada sem causa determinada (Brasil, 2019)

Para tuberculose pulmonar é importante realizar o diagnóstico diferencial com outros agravos, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1- Diagnóstico diferencial da tuberculose pulmonar

Neoplasias	Câncer de pulmão, Linfomas, Sarcoma de Kaposi e Carcinomatose metastática.
Outras Micobactérias	Micobacterioses não tuberculosas: <i>M. avium</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. abscessus</i> e <i>M. xenopi</i>
Infecções fúngicas	Histoplasmose, Paracoccidioidomicose, Aspergiloma e Criptococose.
Outras doenças bacterianas	Abscesso pulmonar, Pneumonia necrotizante. <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , Actinomicose e Nocardiose.

Fonte: Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil, Ministério da Saúde, 2019.

1.7 Prevenção e tratamento

A vacina Bacillus Calmette e Guérin (BCG) introduzida em 1921 tem sido utilizada em todo mundo para prevenir a TB em crianças, a TB disseminada (TB miliar) e meningite por tuberculose e é a única vacina disponível atualmente para prevenção da tuberculose. Os bebês recém-nascidos com >2 kg podem ser vacinados na maternidade logo após o nascimento. A indicação da vacina é para crianças de 0 a 4 anos, 11 meses e 29 dias. A BCG não protege indivíduos já infectados e a meta de cobertura vacinal no Brasil é de 90% em crianças menores de um ano (Brasil,2019).

Os desafios para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes que a atual, incluem a falta de informações sobre os antígenos da micobactéria, variações nos isolados de *Mycobacterium bovis* e as correlações ambíguas entre imunidade e a TB. Atualmente existem 14 candidatos à vacina que

estão em testes de fase clínica em adolescentes e adultos (Hawn *et al.*, 2014; Ahsan, 2015; Fletcher e Schrager, 2016; Fatima *et al.*, 2020).

No Brasil, os esquemas de tratamento da TB são padronizados desde 1979 pelo Ministério da Saúde, sendo recomendada uma associação de fármacos para diminuir a probabilidade de seleção de bacilos resistentes (Arbex *et al.*, 2010a; BRASIL, 2019). O esquema básico proposto era dividido em: fase de ataque ou intensiva que perdurava dois meses de tratamento e administração de três fármacos (rifampicina, isoniazida, pirazinamida); e fase de manutenção que consistia na administração de rifampicina e isoniazida por quatro meses (Arakaki *et al.*, 2010).

Em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose juntamente com o seu Comitê Técnico Assessor, revisaram o sistema de tratamento da TB no Brasil, modificaram a fase de ataque do esquema básico introduzindo o etambutol como quarto fármaco e reduziram as posologias da isoniazida e da pirazinamida. Além disso, os quatro fármacos (rifampicina, isoniazida, pirazinamida, etambutol) foram combinados em um só comprimido recebendo a denominação de dose fixa combinada (DFC). Este novo esquema básico se destina aos casos novos de TB pulmonar e extrapulmonar, assim como para todos os casos de recidiva ou retorno após o abandono (Arbex *et al.*, 2010b; a; Arakaki *et al.*, 2010).

O tratamento possui diversos obstáculos, dentre eles: longa duração (seis meses); diversos efeitos colaterais (náuseas, vômitos, alterações visuais, dentre outros); falta de informação e de acompanhamento. Os fármacos utilizados para o tratamento são classificados em: primeira linha e segunda linha (Arbex *et al.*, 2010a; Arbex *et al.*, 2010b) e ainda podem ser distribuídos em cinco grupos. Todas as classificações estão descritas na tabela 2.

Tabela 2- Fármacos disponíveis para o tratamento de tuberculose

GRUPO	FÁRMACOS	CARACTERÍSTICAS GERAIS
1	Essenciais: isoniazida, rifampicina, pirazinamida Acompanhante: etambutol.	Fármacos orais de primeira linha, são potentes e mais bem toleradas.
2	Essenciais: Fluoroquinolonas: levofloxacino (altas doses) e moxifloxacino.	Fármacos orais de segunda linha. A levofloxacino é a mais utilizada em relação à moxifloxacino devido à maior experiência de uso.
3	Essenciais estreptomicina e amicacina.	Fármacos injetáveis administrados intramuscular ou por via endovenosa. Pela melhor eficácia, disponibilidade e menor preço o medicamento mais utilizado é a estreptomicina.
4	Acompanhantes: Etionamida, Cicloserina/Terizidona, PAS (ácido p-aminossalicílico).	Fármacos orais de segunda linha que podem fazer parte do esquema de tratamento dependendo do potencial de resistência, do histórico terapêutico, dos efeitos adversos e dos custos. A etionamida pode apresentar resistência cruzada com a isoniazida é mal tolerada pelos efeitos adversos. A terizidona é o medicamento selecionado pela experiência do seu uso no Brasil, tem boa tolerabilidade e baixa frequência de efeitos adversos.
5	Essenciais: Bedaquilina, Delamanida e Linezolida. Acompanhantes: Clofazimina, Carbapenem, Amoxicilina/clavulanato de potássio.	Fármacos que podem ser utilizados em esquemas especiais e individualizados para casos com multirresistência ou resistência extensiva.

Fonte: Brasil, 2019; Brasil,2021)

1.8 Teste de sensibilidade

O ministério da saúde preconiza a realização do teste de sensibilidade para adolescentes e adultos com maior vulnerabilidade como: pessoas em situação de rua, população privada de liberdade, usuários de droga, etilistas, diabéticos, indígenas, imigrantes, imunodeprimidos, pessoas vivendo com HIV/AIDS, profissionais da saúde, profissionais do sistema penitenciário, retratamento, recidiva, cultura positiva após o segundo mês de tratamento, TRM rifampicina resistente (Brasil, 2019).

Estes critérios são justificados pelo maior risco de adoecimento por TB destas populações, como exemplo as pessoas em situação de rua que podem apresentar 56x mais risco de adoecimento e pessoas vivendo com HIV/AIDS com 28x mais risco de adoecimento do que o restante da população (Brasil, 2019).

O teste de sensibilidade pode ser realizado por meio de métodos fenotípicos e moleculares (Brasil, 2019).

Métodos fenotípicos:

1.8.1 MGIT BACTEC 960 (Becton Dickinson, New Jersey, EUA)

O MGIT BACTEC 960 é um método automatizado que utiliza o meio líquido Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, 2021).

Os tubos utilizados para realização do teste contêm um composto fluorescente (rutênio), embebido por silicone que detecta a presença de oxigênio no meio. A grande quantidade de oxigênio dissolvido inicialmente reduz a emissão do composto, diminuindo a fluorescência emitida. Posteriormente, com o consumo de oxigênio pelos microrganismos, a emissão de fluorescência é aumentada e detectada pelo equipamento (Becton Dickinson, 2021).

A leitura da fluorescência é realizada simultaneamente em ciclos completados a cada 60 minutos. Os LEDs que são localizados abaixo dos tubos se iluminam e ativam os sensores de fluorescência dos mesmos e

detectores de luzes fazem a leitura. Os resultados são disponíveis de 5 a 13 dias após a incubação do teste (Becton Dickinson, 2021).

Os testes podem ser realizados a partir de culturas em meio sólido ou líquido. Os fármacos testados são: estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol (Becton Dickinson, 2021).

A análise da fluorescência nos tubos contendo os fármacos é feita em comparação com a fluorescência emitida pelo tubo controle que não contém fármaco (Becton Dickinson, 2021).

1.8.2 Método das proporções

O método das proporções pode ser realizado por meio de amostra clínica de escarro (método direto) ou da cultura (método indireto) (Brasil, 2008).

O teste é realizado em tubos de meio de cultura sólido para observação de unidades formadoras de colônia. O meio mais utilizado no Brasil e na América Latina para realização do teste é o Lowestein-Jensen (LJ). Este meio é à base de ovo, mas também pode ser realizado em meio de cultura à base de ágar como o Middlebrook 7H10, porém as concentrações padronizadas para cada fármaco diferem das utilizadas no Lowestein-Jensen (Brasil, 2008).

Os tubos de meio de cultura sem o fármaco são utilizados como controle de crescimento. Para um isolado ser considerado resistente, o tubo com o fármaco deve apresentar 1% ou mais do número de colônias do tubo controle. Os fármacos testados são a estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol e para casos de TB-MR são testados os fármacos de segunda linha (Brasil, 2008; Brasil, 2019).

A leitura do teste pode ser realizada com até 42 dias após a inoculação (Brasil, 2008).

1.8.3 Line Probe Assay (Teste de Sonda em Linha)

Genotype MTBDRplus (Hain LifeScience GmbH, Nehren, Alemanha) e Genotype MTBDRsl (Hain LifeScience GmbH, Nehren, Alemanha).

O Genotype MTBDR*plus* é um teste de sonda em linha, que utiliza um método qualitativo que pode ser realizado a partir de amostras de escarro ou de cultura positivas. Este teste identifica Complexo *Mycobacterium tuberculosis* como também identifica as mutações que conferem resistência à rifampicina e à isoniazida, dois fármacos importantes no tratamento da doença (Conitec, 2021; Hain LifeScience, 2015).

Numa primeira etapa é realizado a extração de DNA do bacilo, em seguida é realizada uma PCR para amplificação dos genes de interesse, que são o *rpoB*, *inhA* e *katG*. Mutações no gene *rpoB* conferem resistência à rifampicina e mutações nos genes *inhA* e *katG* conferem resistência à isoniazida. A última etapa é de hibridação em fitas de membrana de celulose, onde estão imobilizados fragmentos de DNA de cepas selvagens e com mutações (Conitec, 2021; Hain LifeScience, 2015).

As mutações que conferem resistência às fluoroquinolonas (levofloxacino e moxifloxacino), fármacos injetáveis (amicacina, canamicina e capreomicina) podem ser detectadas pelo Genotype MTBDR*sl*. As mutações nos genes *gyrA* e *gyrB* conferem resistência às fluoroquinolonas, o gene *rrs* resistência aos aminoglicosídeos e o gene *eis* baixa resistência à canamicina (Conitec, 2021; Hain LifeScience, 2017).

Em abril de 2021 a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (Conitec) recomendou à incorporação de testes comerciais de sonda em linha no Sistema Único de Saúde (SUS) (Conitec, 2021).

1.9. Resistência aos fármacos

A história da resistência do bacilo da TB inicia com a descoberta e uso da estreptomicina entre 1943 a 1945, resultando na seleção de

microrganismos resistentes. Em 1946, verificou-se que o ácido p-aminossalicílico eliminava as bactérias resistentes à estreptomicina, e os médicos da época adotaram a combinação das duas substâncias para o tratamento dos pacientes com TB. No início de 1950, a isoniazida mostrou alta eficácia no tratamento da doença e foi adicionada à combinação anterior. O uso destes fármacos associadas com as novas descobertas (etambutol, rifampicina e pirazinamida) no tratamento da TB promoveu um imediato declínio na incidência da doença no mundo, levando a acreditar, na década de 1960, que a TB não seria mais um problema de saúde pública e que logo seria erradicada. Porém, este otimismo decaiu nos anos 80, pois a incidência da TB voltou a aumentar devido à associação com a crescente epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, do inglês Acquired Immune Deficiency Syndrome), e a emergência de formas resistentes a um ou mais fármacos antituberculose (Iseman, 1994; Fox *et al.*, 1999; Minato *et al.*, 2015; Nguyen, 2016).

É consenso que o tratamento adequado leva à cura na maioria dos casos, mas a exposição contínua aos fármacos antituberculose durante longos períodos, aliada a não adesão dos doentes, promoveu a seleção de cepas resistentes. Além disso, o uso de terapias combinadas criou um processo constante de resistência nas cepas, tornando-as gradualmente resistentes aos fármacos existentes (Nguyen Liem, 2016). Diferente de outras bactérias, *M. tuberculosis* adquire resistência aos fármacos a partir de mutações pontuais espontâneas em genes cromossomais (Almeida da Silva e Palomino, 2011).

A resistência aos fármacos antituberculose é classificada em: **Resistência natural** que ocorre durante o processo de multiplicação do bacilo; **Resistência primária** que é observada em pacientes nunca tratados para TB, contaminados por bacilos já resistentes; **Resistência adquirida ou secundária** que é observada em pacientes com TB inicialmente com cepa sensível, tornando-se resistente após exposição aos fármacos (Brasil, 2019).

De acordo com o padrão de resistência identificado pelo teste de sensibilidade, a mesma pode ser classificada em: **Monorresistência** -

resistência a um fármaco; **Polirresistência** - resistência a dois ou mais fármacos, exceto à isoniazida e rifampicina; **Multirresistência (MR)** - resistência à isoniazida e a rifampicina, conjugada ou não a outro fármaco; **Resistência estendida ou extensivamente resistente (XDR)** - além da multirresistência, também apresenta resistência aos fármacos de segunda linha, as fluoroquinolonas, bedaquilina e/ou linezolida (Brasil, 2019; Brasil, 2021).

1.10. Tuberculose Multidroga resistente (TB -MR)

O uso indevido de fármacos antituberculose durante os regimes prolongados de tratamento criou uma pressão seletiva que impulsionou uma rápida evolução de cepas monorresistentes para multirresistentes (TB-MR e TB-XDR) (Nguyen, 2016). A frequência de doentes infectados com isolados resistentes aos fármacos de primeira linha utilizadas no tratamento da TB é uma ameaça mundial que caracteriza um importante problema de saúde pública no controle da TB em vários países. Em 2020, de acordo com a OMS foram notificados, no mundo, 132,222 casos novos de pacientes infectados com *M. tuberculosis* multidroga ou resistentes à rifampicina (RR-TB)..No Brasil foi estimado 2.600 casos de TB MR ou RR-TB, uma incidência de 1,2/100.000 habitantes (WHO, 2021).

1.11. Tratamento da TB – MR

Quando uma resistência é identificada é necessário adotar um novo esquema de tratamento que deve ser composto por pelo menos quatro fármacos com atividades efetivas e que não tenham sido utilizadas anteriormente, caso haja dúvidas sobre a efetividade e o padrão de resistência, é possível utilizar mais de quatro fármacos (Brasil, 2019). O tratamento para alguns casos de TB-MR pode ser individualizado, mas normalmente no Brasil o tratamento é padronizado pelo Ministério da Saúde e consiste em duas fases que podem durar de 18 a 21 meses. O período de tratamento dependerá da curva de negativação bacteriológica de no mínimo

12 meses, evolução clínica e radiológica (Brasil, 2019; Brasil, 2021). O esquema consiste em: fase intensiva (seis meses) e fase de manutenção (doze meses) (Brasil, 2019; Brasil, 2021). A tabela 3 informa o esquema de tratamento para a TB-MR.

Tabela 3— Esquema de tratamento indicado para casos de TB-MR

Resistência	Esquema indicado
Isoniazida, Rifampicina	Por 6 meses, o paciente, diariamente, receberá os comprimidos dos fármacos: bedaquilina, levofloxacino, linezolida e terizidona e 12 meses de levofloxacino, linezolida e terizidona.
Isoniazida, Rifampicina e Levofloxacino.	Por 6 meses, o paciente, diariamente, receberá os comprimidos dos fármacos: bedaquilina, clofazimina, linezolida e terizidona e 12 meses clofazimina, linezolida e terizidona.

*a concentração do fármaco é determinada de acordo com a faixa de peso do paciente Fonte: Brasil, 2019.

Existem recomendações neste tratamento (Brasil, 2019):

1) com a identificação dos efeitos adversos (anafilaxia, nefrotoxicidade, convulsão, etc) as condutas preconizadas pelo Ministério da Saúde devem ser prontamente instituídas para evitar risco de interrupção do tratamento;

2) a administração de cada medicamento deve ser supervisionada diariamente ou por um profissional responsável ou por algum familiar;

3) para maximizar a adesão ao tratamento, são viabilizados transporte e outros incentivos;

4) na medida do possível o paciente deve ser mantido internado na fase intensiva do tratamento em hospitais especializados ou gerais com adequada estrutura de biossegurança.

1.12. Tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR)

Em 2000, foram relatados os primeiros casos de tuberculose com resistência aos fármacos de segunda linha que são utilizadas no tratamento de TB-MR. Os Centros de controle de Doença e Prevenção (CDC, do inglês Centers for Disease Control and Prevention) e a OMS encontraram 347 pacientes no mundo todo, durante o período de 2000 a 2004 (CDC, 2006). Na África do Sul onde há alta prevalência de HIV, Gandhi N. R. e colaboradores identificaram 221 pacientes com TB-MR entre janeiro de 2005 a março de 2006, num hospital distrital em Tugela Ferry em KwaZulu Natal. Destes 221 pacientes, 53 possuíam TB-XDR, sendo que eram de várias regiões da província e não tinham contato conhecido uns com os outros antes dos cuidados de saúde realizados no hospital, e nenhum paciente tinha um membro da família que estivesse doente com TB antes da sua doença (Gandhi *et al.*, 2006).

O número de casos reportados no mundo todo de TB-XDR aumentou de 347 casos (2000-2004) para 12 350 casos em 2020 (WHO 2020). Este aumento se deve aos desafios relacionados à TB-XDR que incluem: dificuldade no diagnóstico, pois o teste padrão de susceptibilidade às drogas pode levar de 6 a 8 semanas; opções de tratamento severamente restritas; má gestão na oferta e na qualidade das drogas (WHO, 2014 b).

1.13. Tratamento da TB – XDR

O tratamento da tuberculose com resistência estendida depende de fármacos menos potentes e mais tóxicos do que as usadas em casos de cepas susceptíveis ao esquema de tratamento. O sucesso no tratamento é menor e a mortalidade é maior do que em casos de TB- MR (Matteelli *et al.*, 2014).

As principais recomendações e indicações para a composição dos esquemas individualizados são: 1) fármaco nunca utilizado anteriormente; 2) sensibilidade demonstrada pelo teste de susceptibilidade; 3) nunca usar um

fármaco com resistência detectada; 4) o esquema de tratamento deve ser composto com três ou quatro fármacos efetivos na fase de ataque e três fármacos na fase manutenção (Brasil, 2019).

1.14. Novos fármacos

Em 1910 foi comercializado o primeiro antimicrobiano, salvarsan, utilizado para *Treponema pallidum*, o agente etiológico da sífilis. Este fármaco foi descoberto por Paul Ehrlich, que recebeu em 1908 o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina por esta descoberta e, desde então, a expectativa de vida aumentou em 23 anos. Desde 1928, após a descoberta da penicilina, o desenvolvimento de novos antibióticos apresentou uma queda gradual e o aumento da resistência bacteriana a estes fármacos se tornou uma crise mundial (Hutchings, Truman e Wilkinson, 2019; Strebhardt e Ullrich, 2008). A resistência aos antimicrobianos é responsável por cerca de 700.000 mortes todos os anos no mundo, mas o grupo interagência das Nações Unidas estima que este número possa chegar a 10 milhões por ano em 2050, e se nenhuma medida for tomada. Este número será maior do que de pessoas que vão a óbito devido ao câncer a cada ano, mundialmente (Plackett, 2020).

Uma estimativa de 2017 mostra que o custo para o desenvolvimento de um novo antibiótico é de cerca de U\$ 1.5 bilhões, porém a estimativa de rendimento é de U\$46 milhões ao ano. Com base nos altos valores de investimentos e um retorno financeiro relativamente baixo, as grandes indústrias farmacêuticas deixaram de investir em pesquisa com esta classe terapêutica. Um exemplo deste novo cenário é o número de novos antimicrobianos aprovados pelos Estados Unidos que declinou desde 1980 em comparação com os fármacos aprovados contra o câncer (Towse *et al.*, 2017; Plackett, 2020).

Uma medida que pode ser utilizada é quando um antimicrobiano alcança níveis críticos, os médicos pararem de prescrever e passem a usar um alternativo, pois após 2-4 anos de pausa do uso, a bactéria resistente não

consegue sobreviver e então o antimicrobiano pode ser usado novamente (Plackett, 2020).

No caso da tuberculose, existem poucos medicamentos para o tratamento da TB-MR e muitas vezes, pelo fato das reações adversas, o clínico geralmente é forçado a optar pela descontinuação dos medicamentos. Em dezembro de 2012 a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos aprovou o uso da bedaquilina, uma diarilquinolina, como parte da terapia combinada (terapia mínima de quatro medicamentos) administrada por observação direta em adultos com idade ≥ 18 anos com diagnóstico de TB-MR pulmonar. Na ocasião este fármaco somente poderia ser administrado quando um regime de tratamento padronizado não estivesse sendo efetivo, como por exemplo, a resistência extensiva, intolerância aos fármacos ou interações medicamentosas (CDC, 2013; FDA, 2012).

Diante do número limitado de fármacos disponíveis para o tratamento da TB-MR, em 2016 a bedaquilina foi introduzida na Índia, em 2017 na China, em 2019 em Bangladesh, Indonésia, Myanmar, Papua-Nova Guiné, Filipinas, e em 2020 no Vietnã (Janssen, 2021).

No Brasil, o uso da bedaquilina no tratamento de TB-MR e TB-XDR foi aprovado em 25/02/2019 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Em agosto de 2020 a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (Conitec) aprovou o uso do protocolo de tratamento com o uso da bedaquilina em casos de TB-MR e TB-XDR (Anvisa, 2019; Conitec, 2020a). Recentemente, em outubro de 2021, o Ministério da Saúde passou a recomendar o uso da bedaquilina em casos de tuberculose multirresistente e extensivamente resistente (Brasil, 2021).

Em 2014, outro fármaco, a delamanida, também foi aprovado para uso pela *European Medicine Agency* como novo fármaco para o tratamento de tuberculose (EMA, 2014). Este fármaco está na mesma classe de fármacos que o metronidazol (os nitroimidazóis) que inibe a biossíntese do ácido micólico, um dos componentes da parede da micobacterina. Este

medicamento é indicado para o tratamento de TB-MR E TB -XDR e a OMS recomendou em 2014, o uso da delamanida a em combinação com três outros fármacos de eficácia comprovada, excluindo a bedaquilina. Neste mesmo ano, a OMS publicou uma recomendação de política provisória, que foi atualizada em 2016 com base na farmacocinética e farmacodinâmica da delamanida para estender o uso em crianças de 6-17 anos (WHO 2014 a; WHO, 2017a.)

No Brasil, o uso da delamanida foi recomendado em 2020 por um parecer da Conitec (Conitec, 2020 b). De acordo com o Ministério da Saúde, a partir de outubro de 2021 a delamanida também passou a ser incluída no tratamento da tuberculose multirresistente e extensivamente resistentes no Brasil (Brasil, 2021).

1.15. Estratégia de Reposicionamento de fármacos

Atualmente, apenas cinco fármacos e cinco novos regimes de tratamento estão na fase de “clinical trials”. Dentre os novos fármacos, apenas três estão na fase 1 e dois na fase 2. Quando se diz respeito de novos esquemas de tratamento, três estão na fase 3 e dois na fase 4. Este cenário é extremamente preocupante, uma vez que, o tratamento para tuberculose requer uma combinação de ao menos três antibióticos (WHO, 2017 b; TB ALLIANCE, 2021).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde publicou um relatório colocando como prioridade o desenvolvimento de novos fármacos para o combate à tuberculose. Esta prioridade se deve a alguns fatos: (i) atualmente a tuberculose é a doença infecciosa que mais mata no mundo, causando 250.000 mil mortes a cada ano; (ii) a quantidade limitada de alternativas para o tratamento com fármacos de segunda linha em casos de resistência aos fármacos de primeira linha; (iii) cerca de 50% dos pacientes com TB multidroga resistentes também apresentam resistência aos fármacos de segunda linha e o tratamento é bem sucedido em apenas 1 caso a cada três pacientes (WHO, 2017b).

Embora a OMS tenha publicada este relatório, o desenvolvimento de um novo fármaco requer um alto investimento econômico e mais de 10 anos de pesquisa até que o medicamento possa estar comercialmente disponível (Palomino e Martin, 2013). Com base nesta problemática, a busca por novas utilizações de fármacos para além das suas indicações terapêuticas aprovadas inicialmente, representa uma forma promissora na introdução de novas terapias. A estratégia de reposicionamento de fármacos ou “*drug repurposing, drug repositioning*” consiste em uma nova indicação de uso para um fármaco já aprovado (Ekins *et al.*, 2011).

Atualmente, empresas, universidades e instituições como o *Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi)*, vêm desenvolvendo grandes campanhas de triagens, como de quimiotecas de “*FDA-approved drugs*”; dirigidas para a doença de Chagas (Planer *et al.*, 2014), como para Ebola vírus (Johansen *et al.*, 2015; Yuan, 2015). Segundo a farmacêutica GlaxoSmithKline, a busca por um novo uso para os fármacos, pode ser considerada uma inovação incremental, ainda que não introduza uma nova entidade química no mercado. Além disso, permite a introdução de novas terapias em menor tempo, além de ser uma excelente estratégia custo-benefício (Grau e Serbedzija, 2015) para doenças negligenciadas.

Vários exemplos de fármacos reposicionados são descritos na literatura, e dentre esses se destacam: i) A talidomida (controle da náusea e insônia), um fármaco que foi retirado do mercado pelos seus graves efeitos adversos em recém-nascidos, vem sendo utilizado no tratamento de mieloma múltiplo (Ekins *et al.*, 2011). A talidomida também foi reposicionada para tratamento da hanseníase; ii) a finasterida (tratar aumento da próstata) e reposicionada para tratamento da calvície; iii) a clorpromazina (anti-histamínico), reposicionada em doses mais elevadas como um fármaco sedativo e anti-emético e no tratamento de psicose grave; iv) o milnacipran (antidepressivo) reposicionado para o tratamento da fibromialgia (Sleigh e Barton, 2010), entre outros. Outros exemplos bem sucedidos para o tratamento da leishmaniose incluem a pentamidina (hipoglicemiante), a

anfotericina B (antifúngico) (Croft *et al.*, 2006), e a miltefosina, desenvolvida para tratamento de câncer (Sundar *et al.*, 2002).

Outros exemplos de reposicionamento bem conhecidos incluem fármacos como: i) sildenafil utilizado no tratamento de angina foi reposicionado para o tratamento de disfunção erétil; ii) bupropiona, um antidepressivo que passou a ser utilizado na cessação do tabagismo; iii) fluoxetina, um antidepressivo que atualmente é também indicado para o transtorno disfórico pré-menstrual (Ashburn e Thor, 2004). Alguns exemplos de fármacos com potencial de reposicionamento encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4- Fármacos com potencial de reposicionamento em uso clínico e em estudos pré-clínicos.

Fármaco	Uso original	Novo uso	Referências
nitazoxanida	Infecções por <i>C. parvum</i> e <i>Giardia</i>	Tratamento da tuberculose; Anti- <i>Leishmania</i> .	(Oldfield, 2010)
aprepitant	Náusea: receptor antagonista NK-1	Cryptosporidiose em imunocomprometidos; Infecção resistente de HIV-1: induz regulação negativa de CCR5 em macrófagos.	(Wang <i>et al.</i> , 2007; Manak <i>et al.</i> , 2010)
amiodarona	Anti-arritmico classe III	Doença de Chagas: bloqueador da síntese de ergosterol.	(Oldfield, 2010)
dapoxetina	Analgésico e antidepressivo	Ejaculação prematura	(Ashburn e Thor, 2004)
galantamina	Anestésico	Alzheimer	(Ashburn e Thor, 2004)
trimetrexato	Antifolato usado em infecções de <i>P. carinii</i> em pacientes com HIV	Inibidor da DHFR de <i>T. cruzi</i>	(Ekins <i>et al.</i> , 2011)
raloxifeno	Câncer de próstata	Osteoporose	(Ashburn e Thor, 2004)

Na área de tuberculose, devido à elevada resistência aos fármacos atuais, várias abordagens de reposicionamento vêm sendo utilizadas

(Bloom, 2016; Maitra *et al.*, 2016; Rodrigues-Junior *et al.*, 2016; Almatar *et al.*, 2017; Brindha *et al.*, 2017). As fluoroquinolonas são exemplos de reposicionamento de fármaco para o tratamento de TB. Estes fármacos não foram inicialmente desenvolvidos para o tratamento desta doença e hoje são utilizados como fármacos de segunda linha contra os bacilos MR (Palomino e Martin, 2013).

Estudos com reposicionamento de fármacos para o tratamento de TB demonstraram que alguns fármacos já disponíveis no mercado têm atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*. Cavanaugh e colaboradores demonstraram em um estudo de 2017 a atividade dos fármacos trimetoprim/sulfametoxazol, meropenem/clavulanato, linezolida, clofazimina e nitazoxanida contra 228 isolados MRs utilizando a metodologia de microdiluição em placa. Os autores demonstraram que os isolados apresentaram valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) menores do que os níveis séricos ou um mecanismo de ação destes fármacos contra *Mycobacterium tuberculosis*. Neste estudo também foram testados os fármacos mefloquina, tioridazina, amoxicilina/clavulanato e oxifenbutazona e apresentaram CIM₉₀ com concentrações maiores do que as alcançadas a nível sérico, sendo então considerados como fármacos não ativos contra o *M. tuberculosis* (Cavanaugh *et al.*, 2017).

No estudo de Huang *et al.* (2012) foram testados o sulfametoxazol e o trimetoprim em 117 isolados. Os autores observaram que 80% dos isolados apresentaram sensibilidade, com um CIM₉₀ de 9,5 mg/L. A concentração que inibiu 99% do crescimento foi de 38 mg/L. Estes isolados foram considerados sensíveis devido a concentração em nível plasmático deste fármaco que varia de 30-60 mg/L na dose usual de 800 mg. Todos os isolados foram resistentes a trimetoprim > 8 mg/L, uma vez que esta concentração não é alcançada em nível plasmático após administração de 160 mg (Huang *et al.*, 2012).

A nitazoxanida foi testada em 50 isolados e H37Rv. Observou-se uma CIM₉₀ de 12-28 µg/mL com uma média de 16 µg/mL. O fármaco foi considerado ativo contra o *M. tuberculosis*, pois sua concentração

plasmática é de 30,7 µg/mL após administração de 1 g do fármaco duas vezes ao dia com mínimo de efeitos adversos (Shigyo *et al.*, 2013, Stockis , 2002).

Outra abordagem bastante utilizada na área de tuberculose são as associações terapêuticas (Chang *et al.*, 2018; Koch *et al.*, 2018; Pieterman *et al.*, 2018). Segundo a *European Medicines Agency (EMA- Guideline on The Non-Clinical Development of Fixed Combinations of Medicinal Products)*, o racional de uma combinação terapêutica baseia-se nas interações farmacológicas ou farmacocinéticas, levando a melhores perfis de eficácia ou de segurança, em comparação com os fármacos individuais. O principal objetivo de estudos pré-clínicos para o desenvolvimento clínico de uma combinação fixa é caracterizar o potencial aditivo, sinérgico ou antagônico dos compostos quando utilizados em conjunto, assim como caracterizar a farmacologia, a farmacocinética e a toxicologia da combinação em desenvolvimento (EMA, 2015).

A intenção de se associar fármacos para o tratamento de uma doença infecciosa tem como base a possibilidade se obter resultados favoráveis como o sinergismo e incluem: 1) o aumento da eficácia do efeito terapêutico, 2) diminuição da dosagem sem comprometimento da eficácia ou aumento da toxicidade, 3) minimizar ou atrasar o desenvolvimento da resistência. Estas condutas têm sido amplamente utilizadas no tratamento de doenças como câncer e doenças infecciosas, incluindo a AIDS (Cruciani e Malena, 2015), como também para doenças parasitárias (Van Griensven e Boelaert, 2011).

Desta forma, a identificação de um regime de administração combinado de curta duração, a preço acessível, regime bem tolerado e que possa ser administrado em atendimento ambulatorial, poderia oferecer grandes vantagens para os doentes e para o sistema de Saúde Pública.

1.16. Relevância do estudo

A estratégia de busca por um novo uso de um fármaco aprovado pode ser considerada uma inovação incremental, ainda que não introduza uma

nova entidade química no mercado. Atualmente existem poucos fármacos para o tratamento da Tuberculose Multirresistente, que é um problema de Saúde Pública mundial. Estudos com reposicionamento de fármacos para o tratamento de TB demonstraram que alguns fármacos já disponíveis no mercado têm atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*.

A estratégia de reposicionamento diminui o custo e o tempo de pesquisa quando comparado ao desenvolvimento de um novo fármaco e até que possa estar disponível no mercado. Essa redução de custo é extremamente relevante no cenário atual, porque apenas quatro das grandes indústrias farmacêuticas ainda fazem pesquisa para novos antibióticos. Este número reduzido de indústrias farmacêuticas interessadas no desenvolvimento de novos fármacos é devido ao alto custo para a realização da pesquisa e pouco retorno financeiro para o fabricante. A redução do tempo de pesquisa permite disponibilizar mais rapidamente um novo antimicrobiano e atender a população acometida por diferentes tipos de infecções bacterianas.

Com base nos dados expostos e no aumento da resistência do *M. tuberculosis* ao esquema terapêutico para o tratamento da doença, demonstra a necessidade imperiosa de pesquisa e desenvolvimento (P&D) em novos fármacos. Utilizando a estratégia como a técnica de reposicionamento de fármacos, a presente proposta visa identificar novos candidatos antituberculose que possam ser futuramente testados em modelos pré-clínicos.

O Instituto Adolfo Lutz possui um laboratório de Nível de segurança 3, próprio para trabalhar com isolados sensíveis e resistentes do complexo *M. tuberculosis*, permitindo assim a total possibilidade para a manipulação dos isolados. A Instituição também conta com o Laboratório de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas, onde foram realizados os ensaios de citotoxicidade dos fármacos em cultura de células de mamíferos.

2.0 Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial farmacológico *in vitro* de fármacos contra isolados do complexo *M. tuberculosis* utilizando a estratégia de reposicionamento de fármacos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Realizar a triagem *in vitro* de quimiotecas de fármacos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), Estados Unidos contra o isolado do Complexo *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294).
- 2- Determinar a Concentração Inibitória Mínima 90% dos fármacos ativos nas concentrações testadas na etapa de triagem *in vitro*.
- 3- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade dos compostos ativos contra isolados do complexo *M. tuberculosis* em células de cultura NCTC clone 929.
- 4- Determinar os respectivos índices de seletividade.
- 5- Realizar o estudo de permeabilidade de membrana plasmática do fármaco mais ativo contra o complexo *M. tuberculosis*.

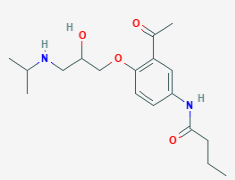
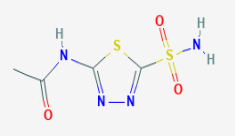
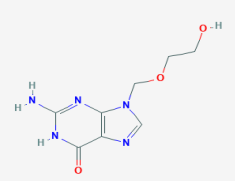
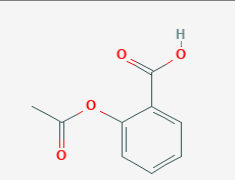
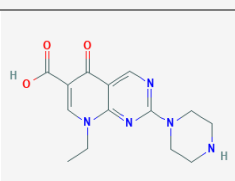
3.0 Metodologia

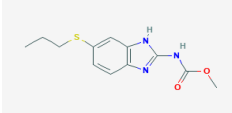
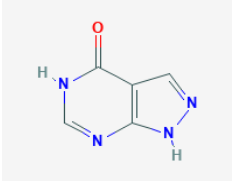
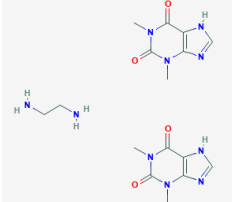
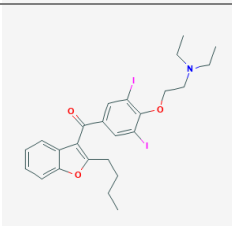
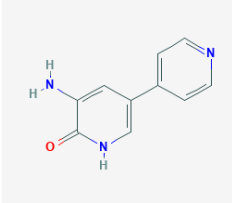
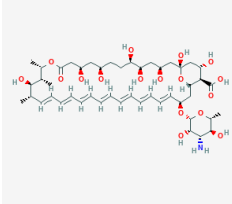
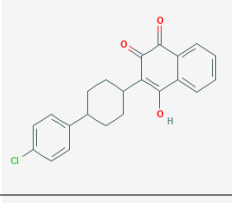
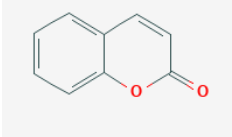
3.1. Modelo do estudo

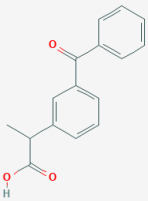
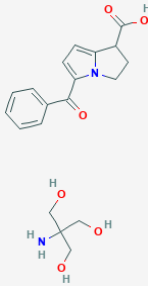
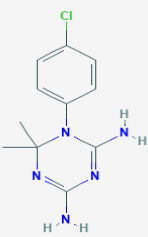
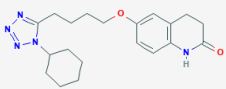
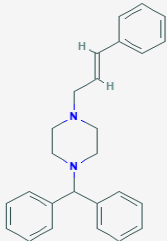
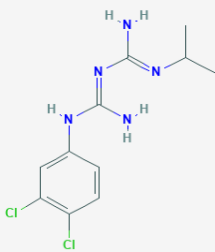
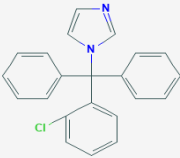
Trata-se de um estudo laboratorial para avaliar o potencial antituberculose de 89 fármacos para reposicionamento de fármacos.

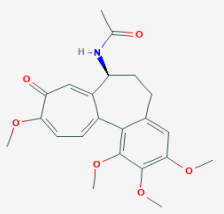
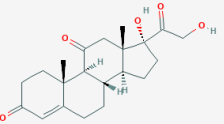
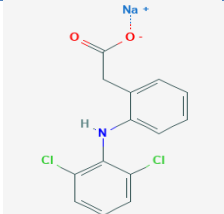
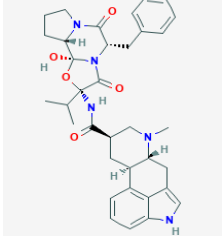
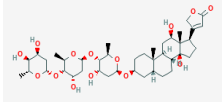
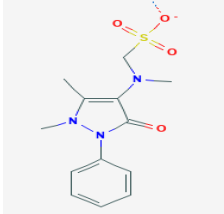
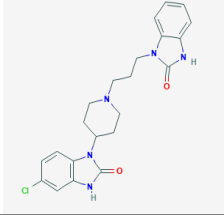
A tabela 5 apresenta a forma detalhada dos fármacos estudados, suas respectivas estruturas, classes terapêuticas, uso clínico, assim como um levantamento bibliográfico de suas possíveis atividades contra isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

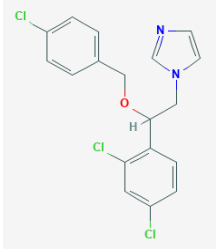
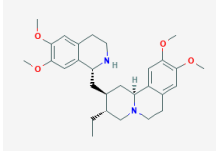
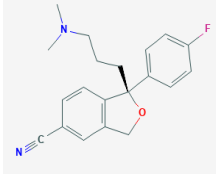
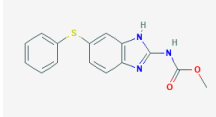
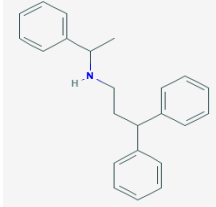
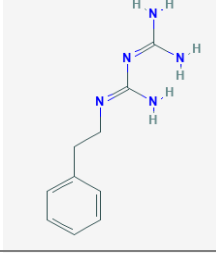
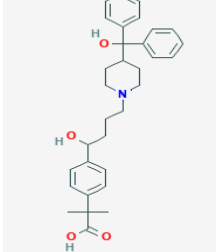
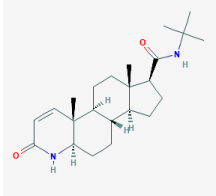
Tabela 5- Fármacos que foram avaliados.

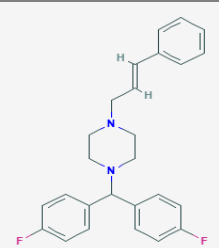
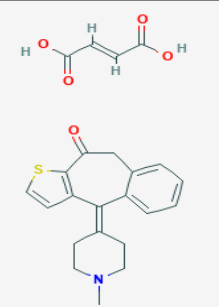
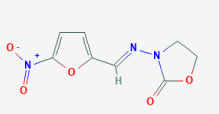
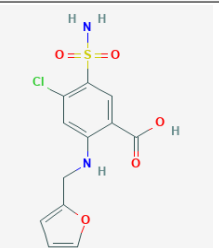
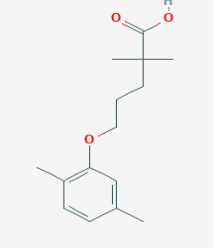
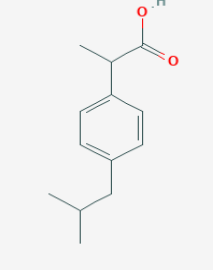
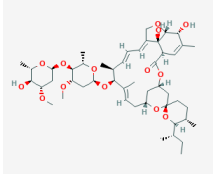
Fármaco	Estrutura Química	Classe Terapêutica	Uso Clínico	PubMED
acebutolol		Antiarrítmico, antihipertensivo	arritmias ventriculares, hipertensão arterial	NP
acetozolamida		anticonvulsivante, diurético, antiglaucoma	Glaucoma, epilepsias e promoção da diurese	NP
aciclovir		antiviral	Vírus da Varicela e Vírus da Herpes	NP
ácido acetilsalicílico		AINE	Analgésico, antitérmico	Byrne e Zhang, 2007 Mishra, 2020
ácido pipemídico		antimicrobiano	antimicrobiano	NP

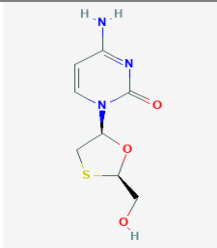
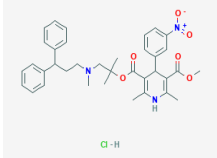
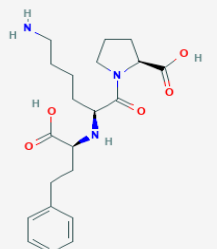
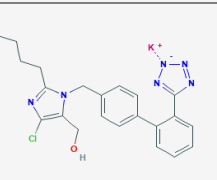
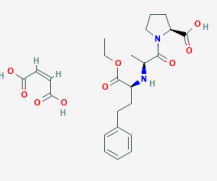
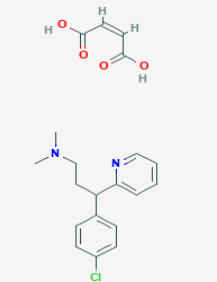
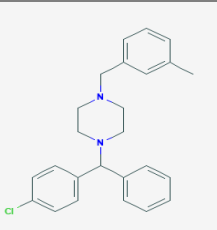
albendazol		antiparasitário	anti-helmíntico	NP
alopurinol		uricosúricos	Gota	NP
aminofilina		broncodilatador	asma	NP
amiodarona		antiarrítmico	arritmias e angina	NP
amrinona		vasodilatador	Inotrópico cardíaco	NP
anfotericina B		antifúngico	antifúngico	NP
atovaquona		antiparasitário	infecções causadas por protozoários	NP
benzopirona		anticoagulante	varizes, profilaxia de trombozes e hemorroidas	NP

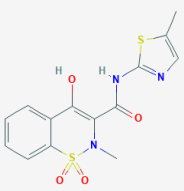
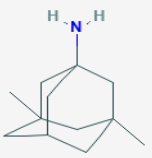
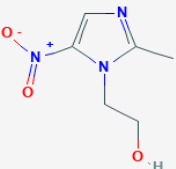
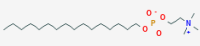
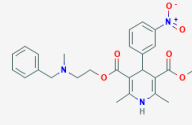
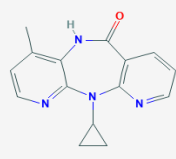
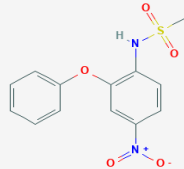
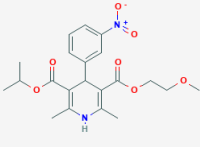
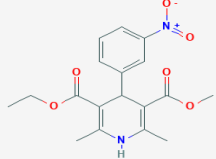
cetoprofeno		AINE	analgésico	NP
cetorolaco de trometamina		AINE	analgésico	NP
cicloguanil		antiparasitário	antiprotozoários, malária,	NP
cilostazol		vasodilatador	inibidor plaquetário	Maiga et al, 2013.
cinarizina		anti-histamínico/ antagonista H1	distúrbios circulatórios e de equilíbrio	NP
clorproguanil		antiprotozoário	malária	NP
clotrimazol		antifúngico	antifúngico	Colina- Vegas et al., 2016. Imperiale et al, 2017 Ahmad, 2005

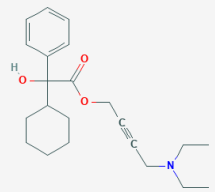
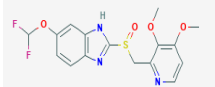
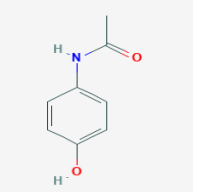
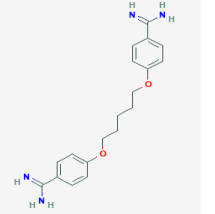
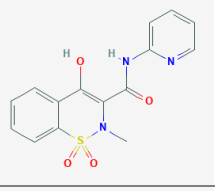
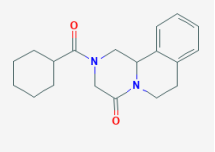
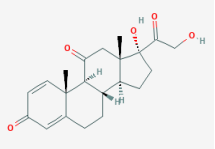
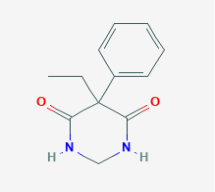
colchicina		AINE	gota	NP
cortisona		AIE	anti-inflamatório	NP
diclofenaco de sódio		AINE	analgésico anti-inflamatório	Dutta et al., 2004 Dutta, et al. 2007 Dutta, et al. 2007 Sirim et al., 2006 Sirim et al., 2006
diidroergocristina		vasodilatador	deterioração mental associada à insuficiência cerebrovascular e na doença vascular periférica	NP
digoxina		glicosídeos cardíacos	insuficiência cardíaca	NP
dipirona sódica		AINE	analgésico	NP
domperidona		antiemético, gastrocinético	má digestão, a náusea e os vômitos	Kaur et al., 2017

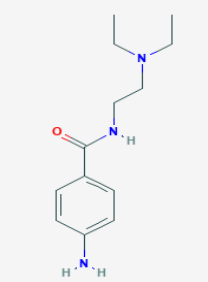
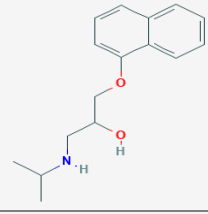
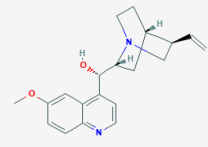
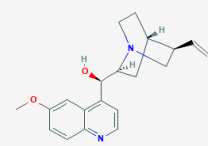
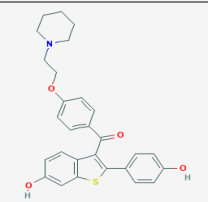
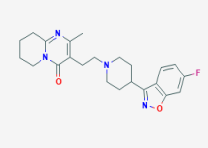
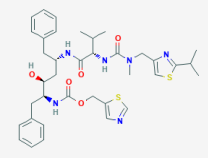
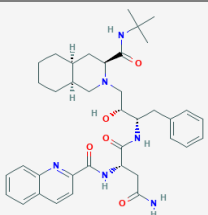
econazol		antifúngico	antifúngico	Milano et al, 2009 Imperiale et al, 2017 Gupta, 2015 Ahmad et al, 2005 Ahmad et al., 2006
emetina		Antiprotosoário, emético	malária	NP
escitalopram		antidepressivo	antidepressivo	NP
fembendazol		anti-parasitário	parasitas gastrointestinais	NP
fendilina		vasodilatador	arritmias e angina	NP
fenformina		hipoglicemiantes	antidiabético	NP
fexofenadina		anti-histamínico/ antagonista H1	antialérgico	NP
finasterida		antiheperplásico	hiperplasia prostática benigna	NP

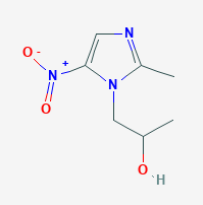
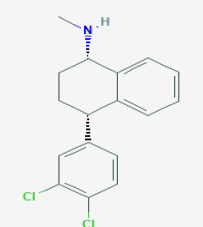
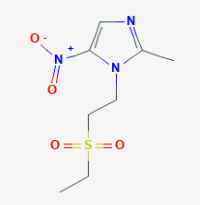
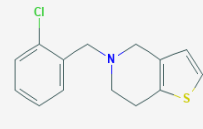
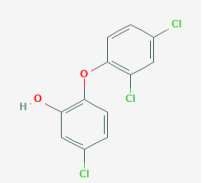
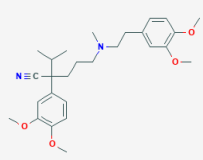
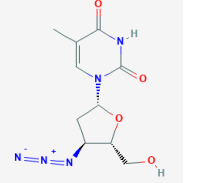
flunarizina		anticonvulsivante , bloqueador de canal de cálcio, antagonista H1	enxaqueca	NP
fumarato de cetotifeno		anti-histamínico	asma	NP
furazolidona		antiparasitária e antimicrobiana	Giardíase e diarreia infecciosa	NP
furosemda		diurético	tratamento de edema e hipertensão	ND
genfibrozila		antilipêmico	redução dos níveis lipídicos	Reich- Slotsky et al, 2009
ibuprofeno		AINE	analgésico	Byrne e Zhang, 2007 Eisen, 2013 Vilaplana, 2013
ivermectina		antiparasitário	tratamento para vermes e parasitas	Lim, 2013 Ramon- garcia, 2014 Muhameed, 2013 e 2014

lamivudina		antiviral	hepatite b e HIV	ND
lercanidipina		antihipertensivo	hipertensão	NP
lisinopril		antihipertensivo	hipertensão	NP
losartana potássica		Antihipertensivo	hipertensão	NP
maleato de enalapril		antihipertensivo	hipertensão	NP
maleato de clorfeniramina		anti-histamínico	rinites e urticárias	NP
meclizina		antiemético/ anti-histamínico/ antagonista H1	vertigem, náusea e vômito	NP

meloxicam		AINE	anti-inflamatória, analgésico e antipirético	NP
memantina		antiparkinsonian o	Parkinson	NP
metronidazol		antiparasitário	infecções causadas por protozoários	Imperiale et al. 2017., Iacobino, 2017 Lin, 2012 Wayne, 1994
miltefosina		antineoplásico, anti-protozoário, antifúngico, anti- inflamatório	Leishmaniose e amebíase	NP
nicardipina		vasodilatador	hipertensão	NP
nevirapina		antiviral	HIV	NP
nimeszulida		AINE	anti-inflamatório	NP
nimodipino		vasodilatador	hipertensão	NP
nitrendipino		vasodilatador	hipertensão	NP

oxibutinina		antiespasmódico	relaxante do trato urinário	NP
pantoprazol		anti-ulceroso	úlceras gástricas	NP
paracetamol		AINE	analgésico	NP
pentamidina		antiparasitário antimicrobiano antifúngico	Infecções causadas por parasitas, bactérias e fungos.	Garcia-Garcia 2005 Kanvatirth et al, 2019.
piroxicam		AINE	analgésico	NP
praziquantel		antiparasitário	anti-helmíntico	NP
prednisona		AIE	anti-inflamatório	NP
primidona		anticonvulsivante	epilepsia	NP

procainamide		antiarrítmico	arritmias	NP
propranolol		antiarrítmico	arritmias	VP
quinidina		antiarrítmico	arritmias	NP
quinino		antiprotzoário	malária	NP
raloxifeno		antiestrogênio	prevenção de osteoporose	NP
risperidona		antipsicótico	esquizofrenia	NP
ritonavir		antiviral	HIV	NP
saquinavir		antiviral	HIV	NP

secnidazol		antiparasitário	infecções causadas por protozoários	NP
sertralina		antidepressivo	depressão e TOC	Shump et al, 2017
teofilina		bronco dilatador	antiasmático	Mangasuli et al., 2018
tinidazol		antiparasitário	infecções causadas por protozoários	NP
triclopídina		antiparasitário	acidente vascular cerebral	NP
triclosan		antimicrobiano antifúngico	antimicrobiano antifúngico	Vosátka, Krátký e Vinšová, 2018.
verapamil		antiarrítmico	arritmias	Demitto et al., 2015
zidovudina		antiviral	HIV	Senthilkumar et al., 2009

NP: não publicado, AINE: anti-inflamatório não esteroidal, AIE: anti-inflamatório esteroidal. Fonte: PubChem Compound <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

3.2. Reagentes e compostos sintéticos

O meio Middlebrook 7H9 e o suplemento de OADC (Ácido Oléico, Albumina, Dextrose e Catalase) foram adquiridos da Becton Dickinson (San Jose, CA, EUA). Alamar Blue® (resazurina), meio 199 (M-199), SDS (Sodium dodecyl sulfate), Triton X-100, Sytox Green e Meio HBSS (Hank's Balanced Solution) foram adquiridos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Dimetilsulfóxido (DMSO) foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). O brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) foi obtido da Invitrogen (Carlsbad, Califórnia, EUA) Soro Fetal Bovino foi adquirido da GIBCO. Os fármacos utilizados no estudo foram obtidos de forma comercial, da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e foram cedidos pelo Professor Dr. André Gustavo Tempone do Centro de Parasitologia e Micologia (Laboratório de Novos Fármacos - Doenças Negligenciadas) do Instituto Adolfo Lutz.

3.3. Isolados clínicos

Em uma primeira fase do projeto, todos os fármacos descritos na tabela 5 foram testados com a cepa H37Rv (ATCC 27294- American Type Culture Collection) nas concentrações de 50 µM e 10 µM.

Os fármacos que foram capazes de inibir o crescimento da cepa H37Rv nas duas concentrações da triagem foram avaliados em concentrações menores de 10 – 0,07 µM. Estes fármacos foram submetidos à avaliação de eficácia com 23 isolados do complexo *M. tuberculosis*, dos quais cinco sensíveis aos fármacos de primeira e segunda linha do tratamento da TB, cinco isolados monorresistentes à isoniazida, cinco monorresistentes à rifampicina, quatro multidroga resistentes e quatro isolados extensivamente resistentes. Estes isolados foram incluídos no estudo com o critério de uma prévia caracterização fenotípica (BACTEC MGIT 960) e molecular (Genotype MTBDR*plus* 2.0 e Genotype MTB MTBDRs/ 2.0) para os fármacos de primeira e segunda linha. Como controle dos ensaios a cepa H37Rv (ATCC 27294) foi incluída em todas as etapas do

estudo. Estes isolados estavam congelados a -70°C e estocadas no Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses.

3.4. Definição de resistência

Os isolados foram previamente caracterizados quanto à identificação do Complexo *M. tuberculosis* e a resistência aos fármacos antituberculose na rotina do Núcleo de Tuberculose e Micobacteriose do Instituto Adolfo Lutz. Isolados resistentes são aqueles que cresceram nas seguintes concentrações dos fármacos por meio do método “in vitro” automatizado BACTEC MGIT 960: isoniazida 0,1 µg/mL; rifampicina 1,0 µg/mL; capreomicina 2,5 µg/mL; amicacina 1,0 µg/mL; canamicina 2,5 µg/mL e levofloxacino 2,0 µg/mL. No método molecular Genotype MTBDR_{plus} v 2.0, os isolados que apresentaram mutações nos genes *inhA* e/ou *katG* são resistentes à isoniazida e os que apresentam mutações no gene *rpoB* são resistentes a rifampicina. No Genotype MTBDR_s/ v2.0 os isolados que apresentaram mutações no gene *rrs* são resistentes aos aminoglicosídeos (capreomicina, amicacina e canamicina), mutação no gene *eis* apresentam baixa resistência a canamicina e mutação nos genes *gyrA* e/ou *gyrB* são resistentes as fluoroquinolonas (levofloxacino).

3.5. Cultivo dos isolados

Os isolados foram reativados em meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com OADC e incubados em estufa a 37°C. Para a realização dos testes o tempo de incubação dos isolados foi de 4 a 6 semanas.

3.6 Triagem dos fármacos

Os 89 fármacos foram submetidos a uma triagem utilizando duas concentrações: 50 µM e 10 µM, concentrações estas que estão dentro do intervalo das concentrações críticas dos fármacos utilizados para o tratamento da TB, como a isoniazida 0,1 µg/mL (0,7 µM), rifampicina 1,0

$\mu\text{g/mL}$ (1,2 μM), etambutol 5,0 $\mu\text{g/mL}$ (24 μM), amicacina 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (1,7 μM), levofloxacino 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (2,7 μM) e moxifloxacino 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (2,3 μM) (WHO 2018; WHO, 2021b).

Os fármacos foram dissolvidos em DMSO em uma concentração de 30 mM (solução estoque) e armazenados a -20°C . A partir da solução estoque foram realizadas duas diluições de 1:20 e de 1:100 em meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC. Estas diluições foram consideradas como soluções de uso.

Para a determinação da atividade dos fármacos foram utilizadas placas de 96 poços com fundo chato e tampa para baixa evaporação.

Em toda a borda da placa foi adicionado 200 μL de água destilada estéril para evitar evaporação do meio de cultura durante a incubação do ensaio. Para a triagem foi adicionado 100 μL de meio de Middlebrook 7H9 acrescido de OADC e os fármacos nas concentrações de 50 μM e 10 μM .

Os orifícios apenas com meio de Middlebrook 7H9 acrescido de OADC e o inóculo foi utilizado como controle positivo de crescimento microbiano e como controle negativo foi utilizado o meio de Middlebrook 7H9 acrescido de OADC sem o inóculo. O ensaio foi realizado em duplicata. (Palamino *et al.*, 2002; Gallo *et al.* 2017).

Para o preparo das suspensões bacterianas para a inoculação, foram aspirados 2 mL do precipitado bacteriano e transferido para um frasco contendo pérolas de vidro. Com auxílio de um swab a cultura foi agitada vigorosamente até dissolução do precipitado. Após 10 minutos de repouso foi coletado 2 mL do sobrenadante e transferido para outro tubo para igualar a turbidez com a escala número 1 de MacFarland, adicionando-se água destilada estéril. A partir desta turbidez foi realizada uma diluição 1/20 (3 mL + 57 mL de 7H9-OADC) e foram inoculados 100 μL desta suspensão em cada poço com fármaco. Para controle de pureza do inóculo, uma gota do mesmo foi semeada numa placa de Petri com meio BHI (Brain Heart Infusion) e incubada em estufa a 37°C por 7 dias.

As placas foram incubadas a 37°C pelo período de 10 dias. Após este período foi realizada a revelação dos testes, inoculando-se em cada poço

30µL da solução de resazurina a 0,01%, preparada com água destilada estéril. As placas foram novamente incubadas a 37°C e duas leituras foram realizadas, a primeira com 24h e a segunda com 48h. O resultado foi determinado pela observação visual da mudança de coloração da resazurina de azul para rosa, comparando com os controles positivos e negativos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	C+	
C		Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	C+	
D		Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	C+	
E		Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	CN	
F		Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	CN	
G		Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	CN	
H												

Figura 2 - Modelo da placa de triagem dos fármacos.

 H₂O; CN- controle negativo; C+- Controle positivo.

3.7. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀)

A determinação da CIM₉₀ foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo Middlebrook 7H9 acrescido de OADC. As concentrações testadas foram de 10 – 0,07 µM, utilizando 23 isolados do complexo *M. tuberculosis* citados no item 3.3.

A preparação do inóculo, a inoculação, incubação e leitura da resazurina foram realizadas como descrito no item 3.6 Triagem dos fármacos (Palamino *et al.*, 2002; Gallo *et al.* 2017).

3.8. Cultura de Células

Fibroblastos de camundongos NCTC (National Collection of Type Cultures - L929 ATCC), American Type Culture Collection (ATCC CCL1) foram fornecidos pela Seção de Cultura Celulares do Instituto Adolfo Lutz, SP e armazenadas em nitrogênio líquido ou freezer à -70°C. Posteriormente as células foram cultivadas em frascos de cultivo celular de 75 cm em meio M-199, suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidos à temperatura de 37°C em estufa a 5% de CO₂ (Ferreira *et al.*, 2018).

3.9 Ensaio de Citotoxicidade.

A citotoxicidade foi avaliada para os fármacos ativos nas concentrações de 10 µM e 50 µM contra o complexo *M. tuberculosis*.

Foram utilizadas células de mamíferos NCTC clone 929, cultivadas conforme descrito anteriormente e aplicadas na concentração de 6x10⁴/poço em placas de 96 poços, contendo os diferentes compostos diluídos serialmente em meio M-199 e 10% de soro fetal bovino. As concentrações testadas foram de 200 – 1,562 µM. As células foram mantidas incubadas durante 48 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e em seguida, adicionou-se 20 µL de MTT e a placa foi incubada novamente por quatro horas. Foi adicionado 80 µL de solução SDS. Como controle (100% de células vivas) utilizou-se células não tratadas. Os ensaios foram realizados em duplicatas (Ferreira *et al.* 2018; Mesquita *et al.* 2020; Pinto e Tempone, 2018; Tada *et al.*, 1986). Ao final do ensaio, a leitura foi realizada por absorbância em espectrofluorímetro de placas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Reader) a 570 nm (Pinto e Tempone, 2018).

Com o objetivo de se determinar a seletividade dos compostos com comprovada atividade antituberculose em células de mamíferos, foi determinado o Índice de Seletividade dos mesmos, através da seguinte expressão de acordo com Pinto e Tempone (2018).

I.S.= Toxicidade (CC₉₀ em células de mamíferos) / CIM₉₀ do complexo
Mycobacterium tuberculosis

3.10 Avaliação da Permeabilidade de Membrana com Sytox Green

A cepa de *M. tuberculosis* ATCC 27294 H37Rv e um isolado MR do complexo *M. tuberculosis* foram utilizadas neste ensaio. Em uma placa 96 poços, preta e com tampa para leitura de fluorescência foi adicionado o meio HBSS, Sytox Green e 100 µL do inóculo do CMT. Como controle máximo de fluorescência foi adicionado Triton X-100 a 0.1% e como controle negativo foi utilizado o meio HBSS com o inóculo bacteriano. Para controle de pureza do inóculo, uma gota do mesmo foi semeada numa placa de Petri com meio BHI (Brain Heart Infusion) e incubada em estufa a 37°C por 7 dias. A amiodarona foi utilizada em diferentes concentrações: para a cepa H37Rv (ATCC 27294), as concentrações da amiodarona foram de 20 e 40 µM e para um isolado do complexo *Mycobacterium tuberculosis* MR, as concentrações da amiodarona foram de 10 e 20 µM. A cepa ATCC 27294 foi selecionada para estar em todas as etapas do estudo e o isolado MR foi selecionado dentre os isolados MRs em que a amiodarona foi ativa. Essas concentrações correspondem a CIM₉₀ e a concentração 2X o CIM₉₀.

Para o preparo da suspensão bacteriana para inoculação, foi aspirado 1 mL do precipitado bacteriano e em um microtubo de centrifugação rosqueável com tampa e anel de vedação de 2 ml foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e adicionado 1 mL de água destilada estéril. O conteúdo foi aspirado e transferido para outro tubo para ajustar a escala 1 de McFarland. A partir desta turbidez, foi realizada uma diluição de 1:20 (50 µL do inóculo e 950 µL do meio HBSS). Foram inoculados 100 µL desta suspensão em cada poço. A placa foi incubada em estufa a 37° C por 15 minutos.

A intensidade da fluorescência foi determinada utilizando o leitor de placa fluorimétrico (FilterMax™ F5 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, USA) com excitação e emissão de 485 e 520 nm respectivamente. Foram realizadas duas leituras, a primeira antes da adição de Triton X-100 e amiodarona. A segunda leitura foi feita a cada 20 minutos, por um período

de 240 minutos após a adição do Triton X-100 e amiodarona (Mesquita *et al.*, 2014; Hendon-Duun *et al.*, 2016)

3.11 Análise Estatística

A determinação dos valores de CC_{50} e CC_{90} foi realizada por meio de curvas sigmoidais dose-resposta. A significância estatística das amostras do ensaio de permeabilidade membrana foi avaliada através dos valores de p pelo método One-way ANOVA, aplicando o teste Tukey's Multiple Comparion. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 5.0.

4.0 Resultados

4.1 Triagem da biblioteca de fármacos

A etapa de triagem da biblioteca de fármacos foi realizada em duas concentrações, 50 μ M e 10 μ M com a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* ATCC H37Rv 27264, uma cepa sensível aos fármacos utilizados no tratamento da TB.

E os resultados demonstraram que dentre os 89 fármacos testados, 20,22% (18 fármacos) apresentaram atividade contra cepa do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* a 50 μ M. Os fármacos ativos foram: amiodarona, bepridil, bifonazol, buparvaquona, carvedilol, clorproguanil, clotrimazol, diidroergocristina, domperidona, econazol, fendilina, flunarizina, ivermectina, meclizina, pentamidina, saquinavir, sertralina e triclosan.

Na triagem dos fármacos a 10 μ M, 4,49% (quatro fármacos) apresentaram atividade contra cepa do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Os fármacos ativos foram: amiodarona, flunarizina, ivermectina e pentamidina.

Para os fármacos que foram ativos nas duas concentrações testadas na triagem, 50 μ M e 10 μ M foi determinada a Concentração Inibitória Mínima 90%.

4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima 90% dos fármacos ativos na etapa da triagem

Os fármacos com atividade a 10 μ M contra isolados do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* foram: amiodarona, flunarizina, ivermectina e pentamidina. Os detalhamentos dos valores de CIM₉₀ observados estão demonstrados na tabela 6.

Tabela 6-Concentração inibitória mínima dos fármacos pelo método da resazurina.

Isolado	Fenotípico	Amiodarona	Flunarizina	Pentamidina	Ivermectina
		μM	μM	μM	μM
1	Sensível	>10	>10	10	>10
2	Sensível	>10	>10	>10	>10
3	Sensível	10	>10	10	>10
4	Sensível	10	>10	10	1,25
5	Sensível	>10	>10	10	>10
6	Mono Rif	>10	>10	10	10
7	Mono Rif	>10	>10	10	10
8	Mono Rif	10	>10	1,25	1,25
9	Mono Rif	>10	>10	10	2,5
10	Mono Rif	10	10	10	10
11	Mono INH	>10	>10	10	1,25
12	Mono INH	>10	>10	10	10
13	Mono INH	>10	>10	10	2,5
14	Mono INH	10	10	10	0,62
15	Mono INH	>10	>10	10	1,25
16	XDR	>10	>10	10	5
17	XDR	>10	>10	10	1,25
18	XDR	>10	>10	2,5	0,15
19	XDR	>10	>10	10	10
20	MDR	>10	>10	10	2,5
21	MDR	>10	>10	2,5	2,5
22	MDR	5	>10	10	2,5
23	MDR	10	>10	10	>10
H37	Sensível	>10	>10	>10	1,25

Mono Rif: Monorresistência à Rifampicina; Mono INH: Monorresistência a Isoniazida; XDR: Extensivamente resistente; MR: Multirresistência.

Os fármacos que apresentaram maior atividade contra os isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis* foram a pentamidina, ivermectina e amiodarona, apresentando valores de CIM₉₀ no intervalo entre 0,62 a 10 µM.

4.3 Avaliação da Citotoxicidade em células de mamífero

A citotoxicidade dos fármacos que apresentaram maior atividade antituberculose foi avaliada entre 200 e 1,562 µM em fibroblastos de camundongo (células NCTC, ATCC®) por um período de 48 horas. Os fármacos amiodarona, flunarizina, pentamidina e ivermectina, apresentaram valores de Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀) entre 12 a 99 µM e Concentração Citotóxica 90% (CC₉₀) entre 11 a 144 µM (Tabela 7).

Tabela 7- Resultado da concentração citotóxica 50% e concentração citotóxica 90% dos fármacos ativos contra isolados do complexo *M. tuberculosis*.

Fármacos	CC ₅₀ (µM)	CC ₉₀ (µM)
amiodarona	31,42 ± 2,1	42,15 ± 8,97
flunarizina	84,13 ± 3,8	>200 ± 0,0
pentamidina	99,8 ± 5,7	144,0 ± 0,0
ivermectina	12,1 ± 3,0	11,77 ± 0,5

CC₅₀- Concentração citotóxica 50%, CC₉₀ – Concentração citotóxica 90%.

Para a avaliação da citotoxicidade foi determinado o Índice de Seletividade dos fármacos. O fármaco com maior índice de seletividade foi a pentamidina (14,40- 115,2), ivermectina (1,17 – 78,47), flunarizina (>20) e amiodarona (4,21 – 8,43). Os índices de seletividade estão descritos na tabela 8.

Tabela 8- Índice de seletividade dos fármacos que foram ativos contra isolados complexo *M. tuberculosis*.

Isolado	Fenotípico	amiodarona	flunarizina	pentamidina	ivermectina
1	Sensível	-	-	14,40	-
2	Sensível	-	-	-	-
3	Sensível	4,21	-	14,4	-
4	Sensível	4,21	-	14,40	9,42
5	Sensível	-	-	14,40	-
6	Mono Rif	-	-	14,40	1,17
7	Mono Rif	-	-	14,40	1,17
8	Mono Rif	4,21	-	115,2	9,42
9	Mono Rif	-	-	14,40	4,7
10	Mono Rif	4,21	>20	14,40	1,17
11	Mono INH	-	-	14,40	9,42
12	Mono INH	-	-	14,40	1,17
13	Mono INH	-	-	14,40	4,7
14	Mono INH	4,21	>20	14,40	19,0
15	Mono INH	-	-	14,40	9,42
16	XDR	-	-	14,40	2,35
17	XDR	-	-	14,40	9,42
18	XDR	-	-	57,60	78,47
19	XDR	-	-	14,40	1,17
20	MR	-	-	14,40	4,7
21	MR	-	-	57,60	4,7
22	MR	8,43	-	14,40	4,7
23	MR	4,21	-	14,40	-
H37Rv	Sensível	-	-	-	9,42

INH: isoniazida; Rif: rifampicina; Mono INH: monorresistente à isoniazida; Mono Rif: Monorresistente à rifampicina; XDR: Extensivamente resistente; MR: Multirresistência; - isolados com CIM₉₀ maior que a concentração máxima testada não foi possível calcular o índice de Seletividade.

4.4 Estudo da permeabilidade de membrana

Utilizando a cepa H37Rv (ATCC 27294) e um isolado MR, a amiodarona foi incubada por 240 minutos com a sonda fluorescente Sytox Green® para avaliar a permeabilidade da membrana. Após 240 minutos de incubação pôde-se verificar que o fármaco não induziu alterações significativas quando comparadas com o controle negativo, uma vez que o valor de P observado foi > 0.05 (Figuras 3 e 4).

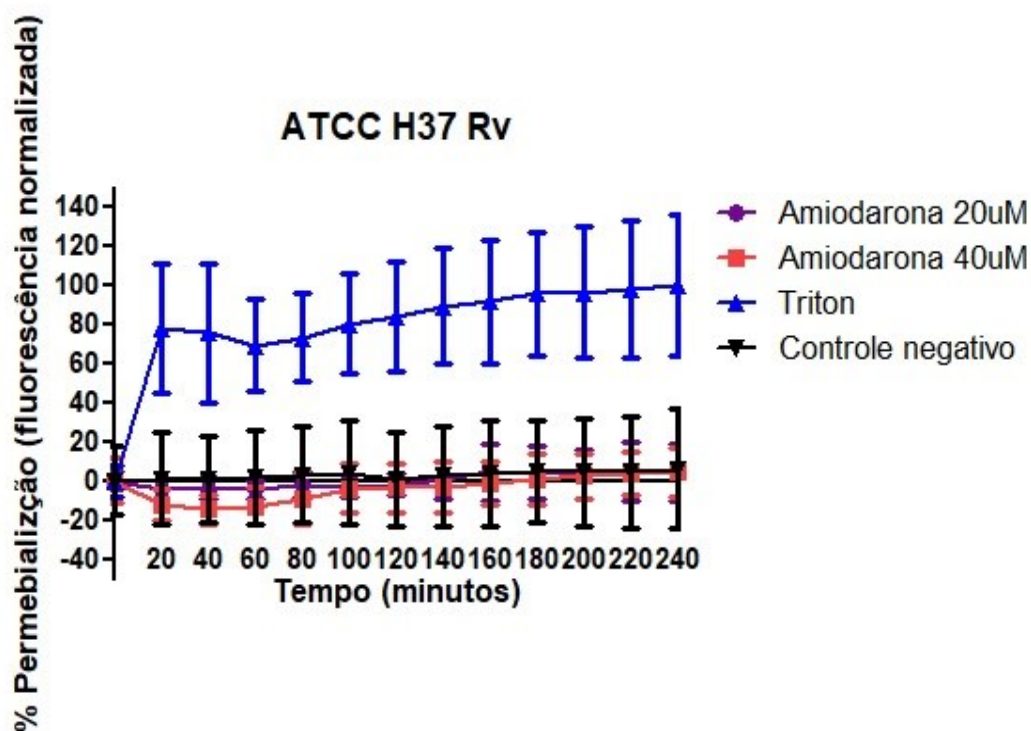


Figura 3- Avaliação por espectrofluorimetria da permeabilidade da membrana do Complexo *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) tratado com amiodarona no CIM₉₀ (20 μ M) e 2X o CIM₉₀ (40 μ M) utilizando o fluoróforo Sytox Green® (excitação 485 nm e emissão 520 nm).

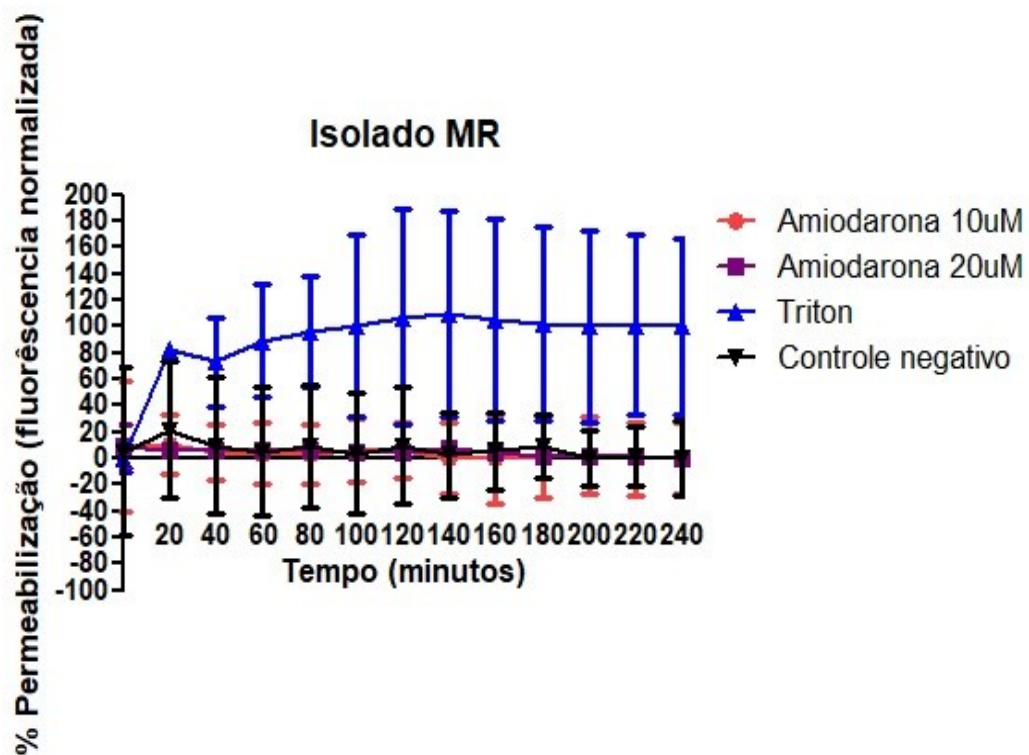


Figura 4- Avaliação por espectrofluorimetria da permeabilidade da membrana plasmática do complexo *M. tuberculosis* MR tratado com o amiodarona no CIM₉₀ (10 μ M) e 2X CIM₉₀ (20 μ M) utilizando o fluoróforo Sytox Green® (excitação 485 nm e emissão 520 nm).

5.0 Discussão

A tuberculose é uma doença tratável e curável, porém, atualmente existe um número limitado de fármacos disponíveis para o tratamento e, além disso, é necessária uma associação de fármacos para que o tratamento seja eficaz. Outro fator muito preocupante é o aumento da resistência bacteriana a estes fármacos. Por estes motivos, a estratégia de reposicionamento de fármacos é uma opção muito viável para disponibilizar novas opções para o tratamento da tuberculose, diminuindo o tempo e custos de pesquisas que visam disponibilizar no mercado fármacos contra isolados do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

Dentre os 89 fármacos testados neste estudo, a amiodarona foi um dos quatro que apresentou atividade contra isolados do complexo *M. tuberculosis in vitro* e este é o primeiro relato na literatura da atividade deste fármaco contra este microrganismo.

A efetividade da amiodarona contra isolados do complexo *M. tuberculosis* foi observada em concentrações de CIM₉₀ de 5-10 µM (3,2 - 6,4 µg/mL). Estas concentrações são menores quando comparadas a concentração plasmática deste fármaco, que é 0,4 a 11,99 µg/mL se administrado em dose padronizada (Latini *et al.*, 1984). Um fármaco que apresente atividade em concentrações menores do que a alcançada em níveis plasmáticos permite que a sua administração seja realizada em doses menores ou iguais as já padronizadas, com efeitos colaterais e reações diversas já conhecidas.

Acerca da citotoxicidade, foi observado que a amiodarona apresenta uma CC₅₀ na concentração de 31,42 µM, o que corrobora os resultados do estudo de Pinto e Tempone (2018) que observaram CC₅₀ de 30,9 µM em células NCTC 929. Nossos resultados indicam que a amiodarona é menos seletiva contra o complexo *M. tuberculosis* quando comparado a *Leishmania infantum* (Pinto e Tempone, 2018), porém os dados se mostraram promissores também em *M. tuberculosis*.

Ainda em relação à citotoxicidade da amiodarona, foi observado que a (CC₅₀) de 31,42 µM é maior do que a relatada para isoniazida, 466 µM

(64µg/mL) e rifampicina 155 µM (128 µg/mL), ambos resultados em células de hamster chinês e etambutol 861,4 µM (176 µg/mL) em células Raw 264.7 (Ding, Hou e Liu, 2019; Oliveira, 2017; Zitko et al, 2013). Apesar de apresentar uma citotoxicidade maior do que a observada para os fármacos de primeira linha, os tipos de células utilizados nos estudos citados acima diferem em relação ao presente estudo, onde foi utilizada a célula NCTC 929.

No que diz respeito a seletividade da amiodarona, neste estudo foi observado um índice de 8,43 a 4,21. Este valor é menor do que o observado para isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, 256, 1.024, 775 e 88.3, respectivamente (Ding, Hou e Liu, 2019; Oliveira, 2017; Zitko et al., 2013). Diante disso, pode-se observar que este fármaco é menos seletivo contra isolados do complexo *M. tuberculosis* quando comparado aos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose, porém os tipos de células utilizadas nestes estudos diferem da utilizada no presente estudo.

A amiodarona é um fármaco antiarrítmico de classe III e a sua administração pode ser feita por via intravenosa ou oral (Drug Bank, 2021). A dose utilizada para o tratamento de arritmias é de 800-1200/mg/dia (dose de ataque) no período de uma a duas semanas e 200 a 400 mg/dia como dose de manutenção (Ancoron, 2015). O fármaco se acumula nos tecidos, e sua eliminação é lenta e seu metabólito pode ser detectado no plasma e nos tecidos por semanas ou meses após a interrupção do uso (Roden, 1993). A concentração plasmática deste fármaco pode variar entre 0.4 a 11.99 µg/mL e se mantém em 1.0 a 2.5 µg/mL em paciente com arritmias e o tempo para alcançar o pico plasmático é de 3-7 horas. A meia vida plasmática após a administração de uma única dose é de 3.2 – 79.7 horas e após a interrupção do tratamento a meia vida plasmática é de até 100 dias (Latini et al., 1984; Roden, 1993).

Ante ao exposto, a amiodarona apresentou uma atividade antituberculose em concentrações menores do que a observada em níveis plasmáticos, pode ser administrada por via oral e possui uma meia vida

plasmática longa, tornando-a um fármaco promissor para reposicionamento. Outros estudos devem ser realizados para comprovar a eficácia e segurança deste fármaco para o seu uso no tratamento da tuberculose.

Nosso estudo também revelou a atividade antituberculose da flunarizina, sendo este dado o primeiro relato na literatura. A flunarizina foi ativa contra isolados do complexo *M. tuberculosis* na concentração de 10 μ M. Esta concentração é maior do que a alcançada em nível plasmático de 39 – 115 ng/mL quando administrado em dose padrão (Holmes *et al.*, 1984) e, portanto, seria necessário aumentar a dose utilizada da flunarizina para alcançar uma concentração plasmática capaz de matar isolados do complexo *M. tuberculosis*, porém, neste caso, a toxicidade do fármaco também poderia ser aumentada.

De acordo com o nosso estudo, a citotoxicidade observada para flunarizina foi um CC₅₀ na concentração de 84,13 μ M e este resultado corrobora com os achados no estudo de Pinto (2016). O autor observou um CC₅₀ de 77,1 μ M em células NCTC 929 (Pinto, 2016).

Ainda acerca da citotoxicidade da flunarizina, este fármaco apresentou uma citotoxicidade menor do que a observada para a pirazinamida, cuja CC₅₀ é de 79 μ M (Zitko *et al.*, 2013). Uma citotoxicidade menor do que a observada para os fármacos de primeira linha é uma característica almejada para um fármaco com potencial de reposicionamento, uma vez que este fármaco poderá ser administrado possivelmente com menos efeitos colaterais, aumentando a adesão do paciente ao tratamento.

Em relação ao índice de seletividade da flunarizina, foi observado um valor maior do que 20. Ante ao exposto, constata-se que a flunarizina apresenta uma seletividade menor contra isolados do complexo *M. tuberculosis* quando comparado aos fármacos de primeira linha. Entretanto de acordo com Garcia *et al.* 2012 e Lenta *et al.*, 2007 um índice de seletividade maior do que 10 é mais adequado para reposicionamento de um fármaco. No presente estudo, o valor apresentado para flunarizina foi maior do que 20, portanto este apresenta um bom índice de seletividade e

podemos considerar que este fármaco é promissor para futuros estudos de associação terapêutica.

A flunarizina é um fármaco de administração por via oral e atinge um nível plasmático de 39 – 115 ng/mL. O pico plasmático ocorre entre 2-4 horas após administração do fármaco com uma dose de 10 mg/dia em adultos e a meia vida plasmática de 18 dias. (Holmes *et al.*, 1984). O fármaco possui interação com a rifampicina e amiodarona, que diminui sua concentração sérica e que pode tornar o ritmo sinusal mais lento respectivamente (Vitapan, 2015). Apesar de apresentar uma interação com a rifampicina, caso reposicionada, a flunarizina seria utilizada para o tratamento de casos de tuberculose multirresistentes e extensivamente resistentes, portanto, este fármaco não seria administrado juntamente com a rifampicina e esta interação não afetaria sua eficácia contra o complexo *M. tuberculosis*.

Diante ao exposto, a flunarizina apresentou atividade contra o complexo *M. tuberculosis* na concentração de 10 μ M, uma citotoxicidade menor do que a observada para a pirazinamida, um índice de seletividade maior do que 20. Estas características são interessantes e poderiam ser consideradas para futuros estudos de reposicionamento deste fármaco para o tratamento da tuberculose, assim como para estudos de associação terapêutica.

A pentamidina também apresentou atividade contra isolados do complexo *M. tuberculosis in vitro* com CIM₉₀ nas concentrações de 1,25 – 10 μ M (0,851 – 3,404 μ g/mL). Esta atividade já foi observada no estudo de Kanvatirth *et al.* (2019), que testou este fármaco com a cepa H37Rv utilizando o ensaio com resazurina (Alamar Blue), cujo o resultado de CIM₉₀ foi de 10,51 μ M (3,57 μ g/mL). Garcia-Garcia *et al.* (2005) estudaram 32 isolados de *M. tuberculosis*, sendo que quatro destes eram resistentes a pelo menos um fármaco de primeira linha (um resistente a estreptomicina, dois resistentes a isoniazida e um multidroga resistente) utilizando o método da resazurina. Os valores de CIM₉₀ encontrados foram de 1-47 μ M (0,3404 – 16 μ g/mL). Ambos os estudos corroboram os resultados encontrados no

presente trabalho, demonstrando a atividade deste fármaco contra isolados do complexo *M. tuberculosis* tanto em isolados sensíveis quanto nos resistentes.

Acerca da citotoxicidade, neste estudo foi observado que o CC₅₀ da pentamidina foi de 99,8 (33,97 µg/mL) e no estudo de Bernuci *et al.* (2016) foi de 5,03 µg/mL (14,8 µM). Esta diferença nos resultados dos dois estudos se deve possivelmente aos diferentes tipos de células de mamíferos utilizadas nos experimentos.

Ainda no que se refere a citotoxicidade da pentamidina, a concentração de CC₅₀ observada neste presente estudo foi maior do que a observada para a pirazinamida, 79 µM (Zitko *et al.* 2013). A pentamidina apresentou menor citotoxicidade quando comparada a pirazinamida e esta é uma característica desejada para um fármaco com potencial de reposicionamento, porém é conhecidamente um fármaco com bastante efeitos adversos. Futuros estudos de associação terapêutica poderão avaliar o potencial deste fármaco contra *M. tuberculosis*.

O índice de seletividade deste fármaco foi de 14,40 – 115,2, um valor maior do que o observado para o etambutol, 88,3 (Oliveira, 2017). Este índice de seletividade maior demonstra que a pentamidina é mais seletiva contra isolados do complexo *M. tuberculosis* quando comparada com o etambutol, um dado bastante promissor para futuros estudos.

A pentamidina é um fármaco anti-protozoário utilizado para pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii*, leishmaniose e tripanossomíase africana. A sua atividade anti-protozoária foi descoberta em 1938 (Pearson *et al.* 1985). A dose utilizada na clínica é de 3 a 4 mg/kg/dia, sendo que a concentração plasmática deste fármaco na dose padronizada é de 0.3-1.4 µg/mL. O fármaco parece ser metabolizado no fígado e tem níveis detectáveis até oito semanas após a interrupção do tratamento (Sands *et al.*, 1985).

Quanto às formas de administração da pentamidina, pode ser realizada por via intravenosa, intramuscular e aerossol e quando administrada por meio de aerossol, a pentamidina é encontrada quase que

exclusivamente nos pulmões, sendo pouco distribuída extrapulmonar e o efeito colateral observado é uma irritação bronquial (Salamone e Cunha, 1998). As vias intravenosa e intramuscular são seguras e eficazes na profilaxia de *Pneumocystis jirovecii*, quando administradas em adultos e crianças. Os efeitos adversos mais observados nestas vias são: dores locais, hipoglicemia, hipotensão ou alteração nas concentrações de uréia, creatinina, ácido úrico e proteínas, no sangue, soro ou plasma (Salamone e Cunha, 1998; Curi *et al.*, 2016; Solodokin *et al.*, 2016, Cheung *et al.* 1993). Ante ao exposto, fica evidenciado que a atividade da pentamidina contra isolados do complexo *M. tuberculosis*, já demonstrada anteriormente na literatura, a citotoxicidade menor quando comparada com a pirazinamida e o índice de seletividade maior do que o observado para o etambutol são características favoráveis para futuros estudos sobre reposicionamento.

No presente estudo também foi observada a atividade *in vitro* da ivermectina contra o complexo *M. tuberculosis* com CIM₉₀ nas concentrações de 0,15 – 10 µM (0,1 – 8,7 µg/mL), o que corrobora com o estudo de Lim *et al.* (2013). Os autores utilizaram 27 isolados MR e XDR e os valores de CIM₉₀ foram obtidos por meio do ensaio de Alamar Blue. Os valores de CIM₉₀ foram de 1-16 µg/mL e apenas cinco isolados apresentaram CIM₉₀ entre 24 - >128 µg/mL, indicando a atividade antituberculose deste fármaco (Lim *et al.*, 2013). Entretanto essas concentrações são menores do que a concentração plasmática deste fármaco, que é de 23.1 – 50 ng/mL, variando as doses de 6 mg a 18 mg em indivíduos saudáveis (González *et al.*, 2008). Para se alcançar o nível plasmático necessário para eliminar o complexo *M. tuberculosis*, a dose administrada deve ser maior do que a já padronizada, podendo aumentar a toxicidade do fármaco.

Em relação à citotoxicidade, a ivermectina apresentou uma CC₅₀ de 12,1 µM, corroborando com os resultados do estudo de Kongmanas *et al.* (2020) onde os autores observaram uma CC₅₀ de 11,28 µM em células do hepatocarcinoma humano (HepG2). Apesar dos diferentes tipos de células utilizados nos dois estudos, os resultados da citotoxicidade do fármaco não se diferenciaram.

A citotoxicidade da ivermectina foi maior do que a observada para isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida, entretanto os tipos de células utilizados nos estudos diferem.

Quanto ao índice de seletividade da ivermectina, foram observados valores entre 1,17 a 78,47. Estes valores são menores dos que os relatados para os fármacos antituberculose de primeira linha, e em vista disso, a ivermectina é menos seletiva contra isolados do complexo *M. tuberculosis* quando comparada a isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. Entretanto o índice de seletividade considerado ideal para o reposicionamento de um fármaco é maior do que 10 (Garcia et al. 2012 e Lenta et al., 2007), portanto, a ivermectina apresenta uma seletividade adequada para o reposicionamento para o tratamento da tuberculose.

A ivermectina é um fármaco antiparasitário utilizado para o tratamento de doenças como estrogiloidíase, oncocercose, filariose linfática, ascaridíase, enterobíase, tricuriase e tem sido utilizado em humanos desde 1987. A sua descoberta foi em 1970 a partir da purificação das avermectinas extraídas de uma espécie até então desconhecida de *Streptomyces*, que posteriormente foi denominada de *Streptomyces avermitilis* (Drug Bank, 2021; González et al., 2008; Burg et al., 1979).

Em relação à dosagem da ivermectina, pode variar de acordo com a doença a ser tratada e sua administração é feita por via oral. Para o tratamento de estrogiloidíase, filariose, ascaridíase, escabiose e pediculose é uma dose única de 3 mg (15 a 25 kg), 6 mg (26-44 kg), 9 mg (45-64 kg), 12 mg (65-84 kg) e 2000 µg/kg acima de 80 kg. Para o tratamento de oncocercose a dose única é de 3 mg (15 a 24kg), 6 mg (25-35 kg), 9 mg (36-50 kg), 12 mg (51-65 kg), 15 mg (66-79 kg) e 150 µg/kg acima de 84 kg. O intervalo usual entre as doses é de 12 meses, mas de acordo com avaliação médica, uma nova dose pode ser administrada após três meses. (Vitamedic, 2017).

A atividade da ivermectina contra o complexo *M. tuberculosis* foi observada nas concentrações de 0,15 – 10 µM. Apesar de a citotoxicidade ser maior quando comparada aos fármacos de primeira linha, o índice de

setividade deste fármaco foi de 1,17 a 78,47 e como discutido anteriormente, o índice considerado adequado para o reposicionamento de um fármaco é um valor maior do que 10. Portanto, outros estudos como associação de fármacos e atividade antituberculose da ivermectina *in vivo* devem ser realizados para comprovar a sua eficácia e segurança.

Estudos de mecanismo de ação são extremamente valiosos para se conhecer a ação letal de um novo fármaco. A amiodarona foi o único fármaco deste estudo que apresentou CIM₉₀ em concentrações menores do que a concentração plasmática deste fármaco, por este motivo e com o objetivo de determinar o mecanismo de ação da amiodarona, foi avaliada a permeabilidade de membrana. Foi observado que o fármaco não alterou a permeabilidade da membrana quando comparada com as células do complexo *M. tuberculosis* tratadas com Triton-X 100, concluindo então que a alteração de permeabilidade de membrana não é o mecanismo de ação da amiodarona contra o complexo *M. tuberculosis*.

As micobactérias possuem uma membrana plasmática formada por uma bicamada fosfolipídica e proteínas de membrana. Esta bicamada modifica a fluidez da membrana e sua integridade, que é essencial para as células bacterianas, uma vez que atua na permeabilidade de solutos, é responsável pela manutenção energética, transportando nutrientes, transdução de sinais e turgescência das células. Por esses motivos, a perda de integridade da membrana é irreversível, inviabilizando a célula (Sikkema, Bont e Poolman, 1995; Strauber e Muller, 2010).

O Sytox Green apenas pode ser detectado em células cuja membrana celular apresenta alteração da permeabilidade, sendo estas características de células em processo de morte (Staruber e Muller, 2010). A clofazimina, utilizado como antimicrobiano de segunda linha para o tratamento de TB, é um exemplo de fármaco que altera a permeabilidade da membrana plasmática das micobactérias, interferindo na cadeia respiratória e de transportadores de íons. (Conitec, 2018).

Além da membrana plasmática, as micobactérias possuem parede celular que é diferente das bactérias gram-positivas e gram-negativas,

apresentando uma espessa camada de ácidos micólicos, que funciona como uma barreira. Esta densa camada lipídica confere a parede celular uma baixa permeabilidade a fármacos e os outros solutos e protege a célula de danos externos, como por exemplos, os desinfetantes (Ducati *et al.*, 2006; Jankute *et al.*, 2015; Nikaido, 1994; Jarlier e Nikaido, 1994).

Considerando-se toda a problemática em relação ao tratamento da tuberculose e resistência aos fármacos já citada, a amiodarona, flunarizina, ivermectina e pentamidina apresentam atividade antituberculose e tem um potencial de reposicionamento para o tratamento da tuberculose MDR.

6.0 Conclusões

1- Dentre os 89 fármacos testados, 18 apresentaram atividade contra isolados do complexo *M. tuberculosis* ATCC 27294 H37Rv a 50 µM, quatro apresentaram atividade a 10 µM (amiodarona, flunarizina, pentamidina e ivermectina), sendo os dados em relação à amiodarona e a flunarizina, inéditos.

2- O fármaco que apresentou os menores valores de CIM₉₀ foi a ivermectina.

3- A flunarizina e a pentamidina apresentaram a menor citotoxicidade *in vitro*.

4- A amiodarona foi o composto com menor índice de seletividade em célula de mamífero NCTC L929.

5- A flunarizina e a pentamidina apresentaram os maiores índices de seletividade.

6- A amiodarona não alterou a permeabilidade de membrana plasmática, exercendo ação letal por outros mecanismos na bactéria.

6.1 Conclusão geral:

Os fármacos amiodarona, flunarizina, pentamidina e ivermectina apresentam potencial farmacológico *in vitro* contra isolados do complexo *M. tuberculosis*. Futuros estudos podem ser realizados para comprovar a eficácia e segurança em associações terapêuticas *in vitro* com outros fármacos já utilizados no tratamento da tuberculose.

7.0 Bibliografia

Ahsan MJ. Recent advances in the development of vaccines for tuberculosis. *Ther Adv Vaccines*. 2015;3(3):66-75.

Almatar M, AlMandea H, Var I, Kayar B, Köksal F. New drugs for the treatment of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Biomed Pharmacother*. 2017;91:546-58.

Almeida da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(7):1417-30.

Ahmad Z, Sharma S, Khuller GK. In vitro and ex vivo antimycobacterial potential of azole drugs against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;251(1):19-22.

Ahmad Z, Sharma S, Khuller GK, Singh P, Faujdar J, Katoch VM. Antimycobacterial activity of econazole against multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;28(6):543-4.

Ancoron, 2015- Disponível em: <https://www.libbs.com.br/wp-content/uploads/2015/11/Bula-Ancoron-100mg-Profissional-ampliada.pdf>

Arakaki D., G. Oliveira, D. Barreiar, F. Moherdau, S. Codenotti, P. Bartholomay, 2010, Informe técnico de tuberculose, julho de 2010. Secretaria de vigilância da saúde.

Arbex MA, Varella MeC, Siqueira HR, Mello FA. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: first-line drugs. *J Bras Pneumol*. 2010;36(5):626-40. (a)

Arbex MA, Varella MeC, Siqueira HR, Mello FA. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. *J Bras Pneumol*. 2010;36(5):641-56.(b)

Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(8):673-83.

Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg*. 2017;58(1):E9-E12.

Barnes DS. Historical perspectives on the etiology of tuberculosis. *Microbes Infect*. 2000;2(4):431-40.

Becton Dickinson. MGIT BACTEC 960. Disponível em :

<https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/mycrobiology-testing/bactec-mgit-960-and-320>

Bernuci KZ, Iwanaga CC, Fernadez-Andrade CM, Lorenzetti FB, Torres-Santos EC, Faiões VD, et al. Evaluation of Chemical Composition and Antileishmanial and Antituberculosis Activities of Essential Oils of Piper Species. *Molecules*. 2016;21(12).

Bespiatykh D, Bespyatykh J, Mokrousov I, Shitikov E. A Comprehensive Map of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Regions of Difference. *mSphere*. 2021;6(4):e0053521

Bloom BE. The trials and tribulations of repurposing metformin and other generic drugs for tuberculosis. *Pharm Pat Anal*. 2016;5(2):101-5.

Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979;15(3):361-7

Brasil, Ministério da Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, Brasília; 2008.

Brasil, Ministério da Saúde. Manual de recomendações para controle da tuberculose no Brasil. Brasília; 2019.

Brasil, Ministério da Saúde. Nota Informativa N°9/2021-CGDR/DDCI/SVS/MS. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/legislacao/2021/notas_informativas/nota_informativa_no_9-2021-cgdr.pdf

Brindha S, Vincent S, Velmurugan D, Ananthakrishnan D, Sundaramurthi JC, Gnanadoss JJ Bioinformatics approach to prioritize known drugs towards repurposing for tuberculosis. *Med Hypotheses*. 2017;103:39-45.

Byrne ST, Denkin SM, Zhang Y. Aspirin and ibuprofen enhance pyrazinamide treatment of murine tuberculosis. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(2):313-6

Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(3):196-201

Cavanaugh JS, Jou R, Wu MH, Dalton T, Kurbatova E, Ershova J, et al. Susceptibilities of MDR *Mycobacterium tuberculosis* isolates to unconventional drugs compared with their reported pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(6):1678-87.

CDC . Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs--worldwide, 2000-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2006;55(11):301-5.

CDC . Provisional CDC guidelines for the use and safety monitoring of bedaquiline fumarate (Sirturo) for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. MMWR Recomm Rep. 2013;62(RR-09):1-12.

Chang KC, Nuernberger E, Sotgiu G, Leung CC. New drugs and regimens for tuberculosis. Respiriology. 2018.

Cepheid. Xpert MTB/RIF e Xpert MTB/Rif Ultra. Disponível em: <https://cepheid.widen.net/view/pdf/caxvi6dx3c/Cepheid-Xpert-MTB-RIF-Ultra-Comparison-Flyer-CE-IVD-3094-Portuguese.pdf?t.download=true&u=escyfu>

Chen R, Zhang H, Ma T, Xue H, Miao Z, Chen L, et al. Ciprofloxacin-1,2,3-triazole-isatin hybrids tethered via amide: Design, synthesis, and in vitro anti-mycobacterial activity evaluation. Bioorg Med Chem Lett. 2019;29(18):2635-7.

Cheung TW, Matta R, Neibart E, Hammer G, Chusid E, Sacks HS, et al. Intramuscular pentamidine for the prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 1993;16(1):22-5.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998;393(6685):537-44.

Colina-Vegas L, Dutra JL, Villarreal W, de A Neto JH, Cominetti MR, Pavan F, et al. Ru(II)/clotrimazole/diphenylphosphine/bipyridine complexes: Interaction with DNA, BSA and biological potential against tumor cell lines and *Mycobacterium tuberculosis*. J Inorg Biochem. 2016;162:135-45.

Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice. Butter Worth-Heinemann. Oxford, 2nd edition; 1997. 139 p.

Conitec, 2012 – Proposta de incorporação do Xpert MTB-RIF como teste para diagnóstico de tuberculose e para indicação de resistência à rifampicina. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Incorporados/TesteXpert--final.pdf>.

Conitec 2018 – Relatório de recomendação de medicamento; Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Recomendacao/Relatorio_AplicacaoClofazimina-Hanseníase_CP64_2018.pdf

Conitec, 2020 a – Relatório de recomendação de medicamento. Disponível em:

http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2020/Relatorio_Bedaquilina_TB_RR_MDR_XDR_546_2020_final.pdf

Conitec 2020 b – Relatório de recomendação de medicamento. Disponível em:

http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2020/Relatorio_delamanida_TB_MDR_XDR_547_33_2020_final.pdf

Conitec 2021 – Relatório de recomendação de equipamento. Disponível em :

http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2021/20210423_PTC_teste_em_linha_deteccao_resistencia_tuberculose_CP_31.pdf

Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. Indian J Med Res. 2006;123(3):399-410.

Cruciani M, Malena M. Combination dolutegravir-abacavir-lamivudine in the management of HIV/AIDS: clinical utility and patient considerations. Patient Prefer Adherence. 2015;9:299-310.

Curi DA, Duerst RE, Badke C, Bell J, Chaudhury S, Kletzel M, et al. IV pentamidine for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia prophylaxis in pediatric allogeneic stem cell transplant patients. Bone Marrow Transplant. 2016;51(10):1394-6.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. “Alexandre Vranjac”. Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria Estadual da Saúde - 2016

http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/tb/mat_tec/TB15_Cronograma.pdf Apresentações Dia Mundial TB março/2016 – Notícias_D_Mundial_2016 – disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose/>

Darling MI, Donoghue HD. Insights from paleomicrobiology into the indigenous peoples of pre-colonial America - a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(2):131-9.

Ding Z, Hou P, Liu B. Gatifloxacin-1,2,3-triazole-isatin hybrids and their antimycobacterial activities. Arch Pharm (Weinheim). 2019;352(10):e1900135.

Drancourt M, Raoult D. Palaeomicrobiology: current issues and perspectives. Nat Rev Microbiol. 2005;3(1):23-35.

DrugBank, 20121. Disponível em: <https://go.drugbank.com/>

Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption -- a review on tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(7):697-714.

Dutta NK, Kumar KA, Mazumdar K, Dastidar SG. In vitro and in vivo antimycobacterial activity of antiinflammatory drug, diclofenac sodium. Indian J Exp Biol. 2004;42(9):922-7.

Dutta NK, Mazumdar K, Dastidar SG, Park JH. Activity of diclofenac used alone and in combination with streptomycin against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Int J Antimicrob Agents. 2007;30(4):336-40.

Eisen DP, McBryde ES, Walduck A. Low-dose aspirin and ibuprofen's sterilizing effects on *Mycobacterium tuberculosis* suggest safe new adjuvant therapies for tuberculosis. J Infect Dis. 2013;208(11):1925-7.

Ekins S, Williams AJ, Krasowski MD, Freundlich JS. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. Drug Discov Today. 2011;16(7-8):298-310.

EMA 2014. European Medicines Agency - Human medicines - Deltaba Disponível em: <
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002552/WC500166235.pdf >.

EMA 2015. European Medicines Agency- Disponível em : <
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003975.pdf >.

Fatima S, Kumari A, Das G, Dwivedi VP. Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. Life Sci. 2020;252:117594.

Ferreira DD, Mesquita JT, da Costa Silva TA, Romanelli MM, da Gama Jaen Batista D, da Silva CF, et al. Efficacy of sertraline against. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2018;24:30

FDA 2012. US Food & Drugs Administration New Drug Attacks Resistant TB. Disponível em: <<https://blogs.fda.gov/fdavoce/index.php/2012/12/new-drug-attacks-resistant-tb> >.

Fletcher HA, Schrager L. TB vaccine development and the End TB Strategy: importance and current status. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2016;110(4):212-8.

Fox W, Ellard GA, Mitchison DA. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. Int J Tuberc Lung Dis. 1999;3(10 Suppl 2):S231-79.

Gallo JF, Pinhata JMW, Saraceni CP, de Oliveira RS. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 system and the resazurin microtiter assay for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to second-line drugs. J Microbiol Methods. 2017;139:168-71.

Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo U, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. Lancet. 2006;368(9547):1575-80.

García-García A, Gálvez J, de Julián-Ortiz JV, García-Domenech R, Muñoz C, Guna R, et al. Search of chemical scaffolds for novel antituberculosis agents. J Biomol Screen. 2005;10(3):206-14.

García A, Bocanegra-García V, Palma-Nicolás JP, Rivera G. Recent advances in antitubercular natural products. Eur J Med Chem. 2012;49:1-23.

Grau D; Serbedzija, G. Innovative Strategies for Drug Repurposing <http://www.dddmag.com/articles/2007/09/innovative-strategies-drug-repurposing>. Acessado em 05/11/2020.

González Canga A, Sahagún Prieto AM, Díez Liébana MJ, Fernández Martínez N, Sierra Vega M, García Vieitez JJ. The pharmacokinetics and interactions of ivermectin in humans--a mini-review. AAPS J. 2008;10(1):42-6.

Gupta UD, Vemuri N, Gupta P, Kumar V, Tanushree P, Khuller GK. Efficacy of moxifloxacin & econazole against multidrug resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* in murine model. Indian J Med Res. 2015;142(3):323-9.

Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. 2005;1(1):e5

Hain LifeScience, 2015. Genotype MRDplus v2.0 – Instruções de uso. Disponível em: https://www.biometrix.com.br/wpcontent/uploads/2017/07/MTBDRplusV2_06_15_304A-06-06.pdf

Hain LifeScience, 2017. Genotype MRDplus v2.0 – Instruções de uso. Disponível em: <https://mobiuslife.com.br/wp-content/uploads/2019/05/IU-GENOTYPE-MTBDR-SL-2.0.pdf>

Hawn TR, Day TA, Scriba TJ, Hatherill M, Hanekom WA, Evans TG, et al. Tuberculosis vaccines and prevention of infection. Microbiol Mol Biol Rev. 2014;78(4):650-71.

Hayman J. *Mycobacterium ulcerans*: an infection from Jurassic time? Lancet. 1984;2(8410):1015-6.

Hendon-Dunn CL, Doris KS, Thomas SR, Allnutt JC, Marriott AA, Hatch KA, et al. A Flow Cytometry Method for Rapidly Assessing *Mycobacterium tuberculosis* Responses to Antibiotics with Different Modes of Action. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(7):3869-83.

Huang TS, Kunin CM, Yan BS, Chen YS, Lee SS, Syu W. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to sulfamethoxazole, trimethoprim and their combination over a 12 year period in Taiwan. J Antimicrob Chemother. 2012;67(3):633-7.

Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. Curr Opin Microbiol. 2019;51:72-80

Iacobino A, Piccaro G, Giannoni F, Mustazzolu A, Fattorini L. Fighting tuberculosis by drugs targeting nonreplicating. Int J Mycobacteriol. 2017;6(3):213-21.

Imperiale BR, Cataldi Á, Morcillo NS. In vitro anti-tuberculosis activity of azole drugs against *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Rev Argent Microbiol. 2017;49(4):332-8.

Iseman MD. Evolution of drug-resistant tuberculosis: a tale of two species. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(7):2428-9.

Jankute M, Cox JA, Harrison J, Besra GS. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. Annu Rev Microbiol. 2015;69:405-23.

Janssen. Taking Action Together to Tackle TB. Disponível em : <https://www.janssen.com/blogs/taking-action-together-to-fight-tb>.

Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiol Lett. 1994;123(1-2):11-8

Johansen LM, DeWald LE, Shoemaker CJ, Hoffstrom BG, Lear-Rooney CM, Stossel A, et al. A screen of approved drugs and molecular probes identifies therapeutics with anti-Ebola virus activity. Sci Transl Med. 2015;7(290):290ra89.

Juárez E, Carranza C, Sánchez G, González M, Chávez J, Sarabia C, et al. Loperamide Restricts Intracellular Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in Lung Macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol. 2016;55(6):837-47.

Kanvatirth P, Jeeves RE, Bacon J, Besra GS, Alderwick LJ. Utilisation of the Prestwick Chemical Library to identify drugs that inhibit the growth of mycobacteria. PLoS One. 2019;14(3):e0213713.

Kaur D, Mathew S, Nair CGS, Begum A, Jainanarayan AK, Sharma M, et al. Structure based drug discovery for designing leads for the non-toxic metabolic targets in multi drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Transl Med. 2017;15(1):261.

Koch A, Cox H, Mizrahi V. Drug-resistant tuberculosis: challenges and opportunities for diagnosis and treatment. Curr Opin Pharmacol. 2018;42:7-15.

Kongmanas K, Punyadee N, Wasuworawong K, Songjaeng A, Prommool T, Pewkliang Y, et al. Immortalized stem cell-derived hepatocyte-like cells: An alternative model for studying dengue pathogenesis and therapy. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(11):e0008835.

Latini R, Tognoni G, Kates RE. Clinical pharmacokinetics of amiodarone. Clin Pharmacokinet. 1984;9(2):136-56.

Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. Lancet. 2011;378(9785):57-72.

Lim LE, Vilchèze C, Ng C, Jacobs WR, Ramón-García S, Thompson CJ. Anthelmintic avermectins kill *Mycobacterium tuberculosis*, including multidrug-resistant clinical strains. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(2):1040-6.

Maiga M, Ammerman NC, Maiga MC, Tounkara A, Siddiqui S, Polis M, et al. Adjuvant host-directed therapy with types 3 and 5 but not type 4 phosphodiesterase inhibitors shortens the duration of tuberculosis treatment. J Infect Dis. 2013;208(3):512-9.

Maitra A, Bates S, Shaik M, Evangelopoulos D, Abubakar I, McHugh TD, et al. Repurposing drugs for treatment of tuberculosis: a role for non-steroidal anti-inflammatory drugs. Br Med Bull. 2016;118(1):138-48.

Manak MM, Moshkoff DA, Nguyen LT, Meshki J, Tebas P, Tuluc F, et al. Anti-HIV-1 activity of the neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant and synergistic interactions with other antiretrovirals. AIDS. 2010;24(18):2789-96.

Mangasuli SN, Hosamani KM, Devarajegowda HC, Kurjogi MM, Joshi SD. Synthesis of coumarin-theophylline hybrids as a new class of anti-tubercular and anti-microbial agents. Eur J Med Chem. 2018;146:747-56.

Matteelli A, Roggi A, Carvalho AC. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management. Clin Epidemiol. 2014;6:111-8.

Mesquita JT, da Costa-Silva TA, Borborema SE, Tempone AG. Activity of imidazole compounds on *Leishmania (L.) infantum chagasi*: reactive oxygen species induced by econazole. *Mol Cell Biochem*. 2014;389(1-2):293-300.

Mesquita JT, Romanelli MM, de Melo Trinconi Trinconi Cm C, Guerra JM, Taniwaki NN, Uliana SRB, et al. Repurposing topical triclosan for cutaneous leishmaniasis: Preclinical efficacy in a murine *Leishmania (L.) amazonensis* model. *Drug Dev Res*. 2020

Milano A, Pasca MR, Provvedi R, Lucarelli AP, Manina G, Ribeiro AL, et al. Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the MmpS5-MmpL5 efflux system. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009;89(1):84-90.

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico do Ministério da saúde, 2021. Disponível em:
https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/24/boletim-tuberculose-2021_24.03

Minato Y, Thiede JM, Kordus SL, McKlveen EJ, Turman BJ, Baughn AD. *Mycobacterium tuberculosis* folate metabolism and the mechanistic basis for para-aminosalicylic acid susceptibility and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(9):5097-106.

Mishra R, Krishan S, Siddiqui AN, Kapur P, Khayyam KU, Sharma M. Potential role of adjuvant drugs on efficacy of first line oral antitubercular therapy: Drug repurposing. *Tuberculosis (Edinb)*. 2020;120:101902.

Muhammed Ameen S, Drancourt M. Ivermectin lacks antituberculous activity. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(8):1936-7.

Muhammed Ameen S, Drancourt M. Comment on: measurements of the in vitro anti-mycobacterial activity of ivermectin are method-dependent. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(6):1724-5.

Ndjakou Lenta B, Vonthron-Sénécheau C, Fongang Soh R, Tantangmo F, Ngouela S, Kaiser M, et al. In vitro antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2007;111(1):8-12.

Nguyen L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Arch Toxicol*. 2016;90(7):1585-604

Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*. 1994;264(5157):382-8.

Oldfield E. Targeting isoprenoid biosynthesis for drug discovery: bench to bedside. *Acc Chem Res*. 2010;43(9):1216-26.

Oliveira, MEFAG. Utilização da Quitosana como adjuvante as drogas antituberculose e sua avaliação *in vitro* contra o *M. tuberculosis*. [DISSERTAÇÃO]. Recife: Universidade federal de Pernambuco, 2017.

Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(8):2720-2.

Palomino JC, Martin A. Is repositioning of drugs a viable alternative in the treatment of tuberculosis? J Antimicrob Chemother. 2013;68(2):275-83.

Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. Int J Syst Evol Microbiol. 2020;70(11):5607-12. Acesso em 01/02/2022.

Pearson RD, Hewlett EL. Pentamidine for the treatment of Pneumocystis carinii pneumonia and other protozoal diseases. Ann Intern Med. 1985;103(5):782-6.

Pieterman ED, Te Brake LHM, de Knecht GJ, van der Meijden A, Alffenaar JC, Bax HI, et al. Assessment of the additional value of verapamil to a moxifloxacin and linezolid combination regimen in a murine tuberculosis model. Antimicrob Agents Chemother. 2018.

Pinto, EG. Estudo do potencial terapêutico de fármacos e compostos sintéticos ou incluídos em nanolipossomos: uma abordagem *in vitro* e experimental na leishmaniose visceral [tese]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2016.

Pinto EG, Tempone AG. Activity of the antiarrhythmic drug amiodarone against *Leishmania (L.) infantum*: an *in vitro* and *in vivo* approach. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2018;24:29.

Plackett B. No money for new drugs. Nature, 2020, 586:50-52

Planer JD, Hulverson MA, Arif JA, Ranade RM, Don R, Buckner FS. Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(7):e2977.

PUBMED. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Reich-Slotky R, Kabbash CA, Della-Latta P, Blanchard JS, Feinmark SJ, Freeman S, et al. Gemfibrozil inhibits *Legionella pneumophila* and *Mycobacterium tuberculosis* enoyl coenzyme A reductases and blocks intracellular growth of these bacteria in macrophages. J Bacteriol. 2009;191(16):5262-71.

Ramón-García S, Vilchère C, Lim LE, Ng C, Jacobs WR, Thompson CJ. Measurements of the in vitro anti-mycobacterial activity of ivermectin are method-dependent. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(6):1723-4.

Rodrigues-Junior VS, Villela AD, Gonçalves RS, Abbadi BL, Trindade RV, López-Gavín A, et al. Mefloquine and its oxazolidine derivative compound are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and in a murine model of tuberculosis infection. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;48(2):203-7.

Roden DM. Pharmacokinetics of amiodarone: implications for drug therapy. *Am J Cardiol.* 1993;72(16):45F-50F

Rosemberg J. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. *Bol. Pneumol. Sanit.* 1999 ,7(2): 6-29.

Sakula A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax.* 1982;37(4):246-51.

Salamone FR, Cunha BA. Update on pentamidine for the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Pharm.* 1988;7(7):501-10.

Sands M, Kron MA, Brown RB. Pentamidine: a review. *Rev Infect Dis.* 1985;7(5):625-34.

Schump MD, Fox DM, Bertozzi CR, Riley LW. Subcellular Partitioning and Intramacrophage Selectivity of Antimicrobial Compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(3).

Schultz MG. Robert Koch. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(3): 547-9.

Senthilkumar P, Long J, Swetha R, Shruthi V, Wang RR, Preethi S, et al. Synthesis of zidovudine derivatives with anti-HIV-1 and antibacterial activities. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2009;28(2):89-102.

Shigyo K, Ocheretina O, Merveille YM, Johnson WD, Pape JW, Nathan CF, et al. Efficacy of nitazoxanide against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2834-7.

Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* 1995;59(2):201-22.

Sleigh SH, Barton CL. Realizing the potential of therapeutic stem cells with effective delivery. *Ther Deliv.* 2010;1(1):11-5.

Solodokin LJ, Klejmont LM, Scipione MR, Dubrovskaya Y, Lighter-Fisher J, Papadopoulos J. Safety and Effectiveness of Intravenous Pentamidine for

Prophylaxis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Pediatric Hematology/Oncology Patients. J Pediatr Hematol Oncol. 2016;38(6):e180-5

Sriram D, Yogeeswari P, Devakaram RV. Synthesis, in vitro and in vivo antimycobacterial activities of diclofenac acid hydrazones and amides. Bioorg Med Chem. 2006;14(9):3113-8.

Stockis A, De Bruyn S, Gengler C, Rosillon D. Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man during 7 days dosing with 0.5 g and 1 g b.i.d. Int J Clin Pharmacol Ther. 2002;40(5):221-7.

Sträuber H, Müller S. Viability states of bacteria--specific mechanisms of selected probes. Cytometry A. 2010;77(7):623-34.

Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. Nat Rev Cancer. 2008;8(6):473-80.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. N Engl J Med. 2002;347(22):1739-46.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. J Immunol Methods. 1986;93(2):157-65.

TB ALLIANCE 2021. Disponível em : <https://www.tballiance.org/portfolio>

Towse A, Hoyle CK, Goodall J, Hirsch M, Mestre-Ferrandiz J, Rex JH. Time for a change in how new antibiotics are reimbursed: Development of an insurance framework for funding new antibiotics based on a policy of risk mitigation. Health Policy. 2017;121(10):1025-30.

van Griensven J, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. Lancet. 2011;377(9764):443-4.

Vilaplana C, Marzo E, Tapia G, Diaz J, Garcia V, Cardona PJ. Ibuprofen therapy resulted in significantly decreased tissue bacillary loads and increased survival in a new murine experimental model of active tuberculosis. J Infect Dis. 2013;208(2):199-202.

Vitamedic, 2017. Disponível em:
<http://www.vitamedic.ind.br/public/bula/BULA%20IVERMECTINA%20PROFISSIONAL.pdf>

Vitapan, 2015. Disponível em:
<https://www.vitamedic.ind.br/public/bula/BULA%20VERTIZAN%20PACIENTE.pdf>

Vosátka R, Krátký M, Vinšová J. Triclosan and its derivatives as antimycobacterial active agents. Eur J Pharm Sci. 2018;114:318-31.

Wang X, Douglas SD, Lai JP, Tuluc F, Tebas P, Ho WZ. Neurokinin-1 receptor antagonist (aprepitant) inhibits drug-resistant HIV-1 infection of macrophages in vitro. J Neuroimmune Pharmacol. 2007;2(1):42-8.

Wayne LG, Sramek HA. Metronidazole is bactericidal to dormant cells of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 1994;38(9):2054-8.

WHO 2014 a. World Health Organization. The use of delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Interim policy guidance. Disponível em: < http://apps.who.int/iris/bitstream.23_eng.pdf >.

WHO 2014 b. World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/137094/9789241564809_eng.pdf?sequence=1

WHO 2017a. World Health Organization. Report of the Guideline Development Group Meeting on the use of bedaquiline in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis). Disponível em: < <http://apps.who.int/iris/bitstream.01-eng.pdf> >.

WHO 2017b. World Health Organization. Antibacterial agents in clinical development, an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. Disponível em: < <http://apps.who.int/iris/bitstream.11-eng.pdf?ua=1> >.

WHO 2018. World Health Organization. Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260470>.

WHO 2019 . World Health Organization. Global tuberculosis report 2019 Disponível em :<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf>

WHO 2020 World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020. Disponível em : <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240013131>

WHO 2021a. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2021. Disponível em : <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>

WHO 2021b. World Health Organization. Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). Disponível em: <https://www.who.int/news/item/05-02-2021-who-announces-updated-critical-concentrations-for-susceptibility-testing-to-rifampicin>

Yuan S. Possible FDA-approved drugs to treat Ebola virus infection. *Infect Dis Poverty*. 2015;4:23.

Zitko J, Paterová P, Kubíček V, Mandíková J, Trejtnar F, Kuneš J, et al. Synthesis and antimycobacterial evaluation of pyrazinamide derivatives with benzylamino substitution. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(2):476-9.

Anexo I



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO – CTC / IAL



São Paulo, 22 de Agosto de 2019

Projeto: CTC 55-K / 2018

“Prospecção de novos candidatos a fármacos antituberculose: Uma abordagem *in vitro*”

Coordenação: Rosângela Siqueira de Oliveira

Projeto de
Pós-Graduação:
Mestrado

Prezado(s) Coordenador(es),

Comunicamos que o projeto foi aprovado quanto ao Mérito Científico pelo Conselho Técnico Científico do IAL com Ciência da Direção Geral e cadastro CTC-IAL 55-K/2018.

Por tratar-se de projeto que *não envolve, direta ou indiretamente, a pesquisa com seres humanos, e que não envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (não humano) segundo a Lei nº 11794/2008, não exige* a avaliação quanto aos aspectos éticos pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação do Instituto Adolfo Lutz (CEUA/IAL).

Atenciosamente,

ADRIANA BUGNO
Presidente do CTC/IAL

1ª Via: Coordenador
2ª Via: Diretor de Núcleo
3ª Via: Diretor de Centro
4ª Via: CTC