

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina de Lisboa



**Estudo de pró-fármacos derivados da pirazinamida e da sua
combinação com anti-inflamatórios não esteróides para o
tratamento de micobacterioses**

Marta Filipa Jesus de Freitas Simões

Mestrado em Microbiologia Clínica

2007/2008

A impressão desta dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 27/01/2009.

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina de Lisboa



**Desenvolvimento de pró-fármacos derivados da pirazinamida
para tratamento de micobacterioses e estudo do efeito
combinado com anti-inflamatórios não esteróides**

Marta Filipa Jesus de Freitas Simões

Mestrado em Microbiologia Clínica

Dissertação orientada pela Professora Doutora Elsa Anes

Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade da sua autora, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.

“Fazer o balanço final é como tentar empurrar num oceano uma só gota.”

Dimíter Ánguelov

Agradecimentos

Embora uma dissertação seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual; há contributos de natureza diversa que não podem nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Professora Doutora Elsa Anes pela sua orientação, disponibilidade e, pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Ao Professor Doutor Luís Constantino por toda a ajuda, apoio e incentivo.

À Doutora Maria Luísa Jordão pela amizade e generosidade, pelo seu interesse, auxílio e aconselhamento em oportunas discussões durante o meu trabalho.

Dra. Emília Alice Valente pela amizade, carinho e apoio constantes.

Ana Marta Calado e Maria Espírito Santo pelo calor humano, incansável apoio moral e ajuda incondicional.

Doutora Ana Margarida Madureira e Vicente que me mostraram mais uma forma de vencer.

À Rita Moura e Maria Teresa Dias por saber que posso sempre contar com vocês assim como vocês comigo.

Grupo da Professora Elsa Anes: David Tomás, Daniela Fabrino, Bibhuti Mishra e Paulo Bettencourt, pelas diversas perspectivas culturais e presença constante.

A todo o sub-grupo de Química Orgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, e aos investigadores do Centro de Estudos e Ciências Farmacêuticas: Dra. Ana Bela Santana, Doutora Ana Paula Francisco, Doutora Cláudia Valente, Dra. Rita Capela e Doutora Luísa Martins.

Às/aos colegas de mestrado: Cátia Caneiras, Paula Cerejo, Joana Diogo, João, André, Catarina Gouveia, Gilberto, Maria Eloy, Ana Rita Duarte, Suraya Diaz, pelo grupo incrível que acabámos por formar.

D. Ofélia e D. Vera por todo o apoio logístico.

Sr. Francisco, D. Helena Brito, D. Lurdes e D. Conceição, pela dedicação e prontidão com que sempre me auxiliaram durante o dia-a-dia de laboratório.

Aos meus pais, pela motivação, apoio, compreensão e sensatez com que sempre me ajudaram.

Ana Maria Policarpo, João Loureiro e Carlos Alberto Lourenço pelo apoio e paciência de sempre.

A todas as outras pessoas que não referenciei e que me dispensaram tempo e atenção, um muito obrigada.

Quero ainda expressar o meu agradecimento ao apoio financeiro que foi concedido para a realização do trabalho. A síntese dos compostos, formulação, ensaios de estabilidade e parte dos ensaios de actividade microbiológica foram suportados pelo Centro de Estudos de Ciências Farmacêuticas. Os ensaios de actividade microbiológica foram suportados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), com co-participação Feder POCI/BIA-BCM/55327/2004 e a Associação Para o Desenvolvimento do Ensino e Investigação em Microbiologia (ADEIM).

Resumo

No combate às doenças infecciosas, podemos actuar directamente contra o agente infeccioso e/ou manipular os mecanismos de defesa do hospedeiro. Esta foi a linha de base deste trabalho.

Para o primeiro ponto, a pirazinamida (PZA) tem sido um fármaco de primeira linha usado no tratamento da tuberculose (TB), embora seja activa contra várias espécies micobacterianas, não apresenta actividade contra *M. bovis* e *M. avium*. Além destas limitações têm-se detectado cada vez mais casos de resistência do bacilo da TB a este antibiótico. Isto deve-se ao facto de a PZA ser um pró-fármaco que necessita de ser activado por uma pirazinamidase da bactéria. No presente trabalho desenvolveram-se novos pró-fármacos derivados da PZA, ésteres que apresentam uma estabilidade significativa e uma boa actividade *in vitro* contra espécies micobacterianas, necessitando de concentrações inferiores à PZA para inibir o crescimento micobacteriano e apresentando actividade contra espécies naturalmente resistentes à PZA e com resistência adquirida. Os pró-fármacos também apresentaram actividade intracelularmente em macrófagos infectados. Os ensaios realizados permitem considerar estes pró-fármacos como bons candidatos na terapêutica de várias micobacterioses incluindo a TB.

Como fundamentos para estudar a resposta no hospedeiro, sabe-se que a capacidade de filamentar actina em membranas de fagossomas facilita a sua maturação em fagolisossomas. Em macrófagos infectados com micobactérias patogénicas esta capacidade está bloqueada sendo um dos factores que contribui para o nicho intracelular micobacteriano em fagossomas não maduros. A capacidade de filamentar actina pode ser modulada por sinalização intracelular com lípidos. Os lípidos que induzem a nucleação da actina (ácidos eicosanóicos da série 6, ácido araquidónico, AA) potenciam a eliminação intracelular de micobactérias, enquanto que os que inibem (da série 3, ácido eicosapentanoico, EPA) facilitam a sua sobrevivência. Tanto o EPA como o AA medeiam a resposta inflamatória que leva à produção de prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas. Neste trabalho estudaram-se três fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs): ibuprofeno, ácido acetilsalicílico (inibidores não-selectivos da ciclooxigenase (COX)) e rofecoxib (inibidor selectivo da COX). Todos os fármacos conseguem induzir directamente, *in vitro*, a morte de *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*. Em macrófagos infectados, a sinalização para morte varia ao longo do tempo de infecção. Contudo, após as 12 h de infecção, observou-se crescimento intracelular do *M. smegmatis*. O efeito bactericida foi detectado sempre na infecção pelo *M. tuberculosis*. Estes resultados vêm demonstrar que os AINEs podem ter uma acção tanto anti- como pró-inflamatória durante o curso da infecção micobacteriana.

Com base nos resultados obtidos estudou-se o efeito combinado de um dos pró-fármacos com os AINEs e notou-se que tanto a acção do pró-fármaco como a acção da PZA usada como termo comparativo, foram potenciadas.

Estes resultados vêm sugerir melhores soluções terapêuticas contra micobacterioses em especial a TB, e novas perspectivas para direccionar essas soluções terapêuticas simultaneamente para o agente infeccioso e para o hospedeiro de forma a permitir um melhor controlo das infecções.

Palavras-chave: pirazinamida, tuberculose, pró-fármacos, AINEs, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, rofecoxib.

Abstract

Pyrazinamide (PZA) is a first line agent for the treatment of human tuberculosis, though it is active against several mycobacterial strains, it does not have activity against *M. bovis* and *M. avium* which are natural resistant species furthermore resistance rates to this drug have been increasing. This is due to the fact that PZA requires activation by a single bacterial pyrazinamidase to form its active metabolite pyrazinoic acid (POA).

In the present work, new esters prodrugs were synthesized, that present a significative stability and *in vitro* activity against several mycobacterial strains, inhibiting mycobacterial growth with lower concentrations when compared to PZA, and presenting activity against species with primary and acquired resistance to PZA. The prodrugs also presented intracellular activity in infected macrophages. This may lead to candidate compounds with enhanced activity against both PZA-susceptible and PZA-resistant isolates suitable for clinical development.

To study the response in the host, it is known that phagosomes can nucleate the assembly of actin filaments, a process that facilitates phagosome-lysosome fusion within macrophages. In macrophages infected with pathogenic mycobacteria this capacity is blocked being one of the factors that contribute to the mycobacterial intracellular niche in non-mature phagosomes. The ability to polymerize actin can be modulated by lipids involved in signal transduction. The lipids that induce actin nucleation (eicosanoic acids of series 6, arachidonic acid, AA) potentiate the intracellular elimination of mycobacteria, whereas the ones that inhibit (of series 3, eicosapentanoic acid, EPA) facilitate its survival. Both EPA and AA mediate the inflammatory response that leads to the production of prostaglandins, leucotriens and lipoxins. In this work three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) were studied: ibuprofen, acetylsalicylic acid (non-selective inhibitor of cyclooxygenase (COX)) e rofecoxib (selective inhibitor of COX).

All the drugs can directly induce, *in vitro*, the killing of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*. In infected macrophages, the signalling for killing varies throughout the infection time. However, after 12 hours of infection, intracellular growth of the *M. smegmatis* was observed. The bactericidal effect was always detected for the *M. tuberculosis* infection. These results demonstrate that NSAIDs can have either a pro-inflammatory or anti-inflammatory action during the course of the mycobacterial infection. Based on these results, the combined effect of the prodrugs with the NSAIDs was studied, and was noticed that both the prodrugs as well as PZA, had their effect potentiated. These results suggest better therapeutical solutions against micobacteriosis in special to TB, and new perspectives to direct these therapeutical solutions simultaneously for the infectious agent and the host, in order to allow better control of the infections.

Key words: pyrazinamide, tuberculosis, prodrugs, NSAIDs, ibuprofen, acetilsalicylic acid, rofecoxib.

Glossário de símbolos e abreviaturas

μM	Micromolar
AA	Ácido araquidônico
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ASA	Ácido acetil salicílico
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
C12	Pirazinoato de dodecanoílo
C14	Pirazinoato de tetradodecanoílo
C16	Pirazinoato de hexadecanoílo
CMI	Concentração mínima inibitória
COX	Ciclooxigenase
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOT	Tratamento observado, <i>Direct Observed Treatment</i>
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPG	Dipalmitoilfosfatidilglicerol
EE	Eficácias de encapsulação
EPA	Ácido eicosapentanóico
GI	Gastro-intestinal
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão, <i>High performance liquid chromatography</i>
HT	Homogenato total

IFN- γ	Interferão - γ
LBP	Fagossomas contendo pérolas de látex, <i>latex bead phagosome</i>
<i>M. tb.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ml	Mililitro
mM	Milimolar
moi	Multiplicidade de infecção, <i>multiplicity of infection</i>
NF-KB	Factor nuclear kB, <i>Nuclear Factor kB</i>
nM	Nanomolar
PAS	Ácido <i>para</i> -amino salicílico
PBS	Tampão fosfato
PG	Prostaglandina
POA	Ácido pirazinóico
PZA	Pirazinamida
PZase	Nicotinamidase/pirazinamidase
SFB	Soro fetal bovino
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
TB	Tuberculose
TNF- α	Factor de necrose tumoral α , <i>tumor necrosis factor α</i>
TXA2	Tromboxano pró-trombótico A2
UFC	Unidades formadoras de colónias
VIH	Vírus da imunodeficiência Humana

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	IV
Glossário de símbolos e abreviaturas	V
Índice	VII
Índice de figuras	X
Índice de tabelas	XI
1 - Introdução	1
1.1 - A epidemiologia da Tuberculose	1
1.2 - Fisiopatologia da infecção	3
1.3 - Interação hospedeiro-patógeno	6
1.4 - Quimioterapia para a TB	8
1.4.1 - Fármacos de primeira linha	8
1.4.2 - Outros fármacos	12
1.5 - Mediadores da inflamação	14
1.5.1 - Isoenzimas ciclooxigenase	16
1.5.2 - Anti-inflamatórios não-esteróides	17
1.5.2.1 - Anti-inflamatórios não-esteróides clássicos e os seus mecanismos de acção	17
1.5.2.1.A - Inibidor irreversível	17
1.5.2.1.B - Inibidor competitivo	19
1.5.2.2 - Inibidores selectivos da COX-2	20
1.5.2.3 - Limitações na terapia anti-inflamatória	20
1.5.3 - Terapêutica combinada para doenças por micobactérias	21
2 - Objectivos do presente trabalho	22
3 - Procedimento experimental	23
3.1 - Estudo da estabilidade dos compostos sintetizados	24
3.1.1 - Estudo da estabilidade em PBS com ACN a 20 % dos pró-fármacos	24

3.1.2 - Estudo da estabilidade em plasma dos pró-fármacos -----	24
3.1.3 - Estudo da estabilidade em homogenato total (HT) dos pró-fármacos -----	25
3.2 - Determinação das eficácias de encapsulação (EE) dos pró-fármacos nas suspensões lipossomais -----	25
3.3 - Estudo da estabilidade dos pró-fármacos encapsulados em lipossomas -----	26
3.3.1 - Estudo da estabilidade em plasma dos fármacos encapsulados em lipossomas -----	26
3.3.2 - Estudo da estabilidade em homogenato total (HT) dos fármacos encapsulados em lipossomas -----	26
3.4 - Estudos de actividade dos pró-fármacos -----	27
3.4.1 - Estirpes micobacterianas usadas -----	27
3.4.1.1 - Condições de crescimento das estirpes micobacterianas -----	27
3.4.2 - Ensaio <i>in vitro</i> para determinação de concentração mínima inibitória (CMI) para os pró-fármacos C12, C14 e C16 -----	28
3.4.2.1 - Preparação de inóculo de micobactérias -----	28
3.4.2.2 - Determinação das CMIs -----	28
3.4.3 - Ensaio <i>in vitro</i> para determinação de concentração mínima inibitória (CMI) para os AINEs: aspirina, ibuprofeno e viox - -----	29
3.4.3.1 - Determinação das CMIs -----	29
3.5 - Estudos <i>ex vivo</i> da actividade dos compostos em macrófagos infectados -----	30
3.5.1 - Linha celular -----	30
3.5.2 - Culturas de macrófagos -----	31
3.5.3 - Preparação do inóculo usado para a infecção celular -----	31
3.5.4 - Infecção dos macrófagos de ratinho J774A.1 -----	32
3.5.5 - Estudo da actividade antimicobacteriana dos vários compostos em macrófagos infectados -----	32
3.6 - Estudo da actividade antimicobacteriana da associação do Pró-fármaco C12 com os AINEs em macrófagos infectados com <i>M. tb.</i> H37Rv -----	33
3.7 - Análise estatística -----	33
4 - Resultados -----	34
4.1 - <u>Avaliação da estabilidade dos pró-fármacos</u> -----	34
4.1.1 - Estabilidade química dos pró-fármacos isolados -----	34
4.1.2 - Estabilidade enzimática dos pró-fármacos isolados -----	35

4.2 - <u>Avaliação da estabilidade das suspensões lipossomais com os pró-fármacos encapsulados</u> -----	36
4.2.1 - Capacidade de encapsulação das suspensões lipossomais -----	36
4.2.2 - Estabilidade enzimática dos pró-fármacos encapsulados em lipossomas -----	38
4.3 - <u>Actividade dos pró-fármacos: pirazinoato de dodecanoílo (C12), pirazinoato de tetradodecanoílo (C14) e pirazinoato de hexadecanoílo (C16)</u> -----	42
4.3.1 - Concentrações mínimas inibitórias -----	42
4.3.2 - Actividade dos pró-fármacos em macrófagos infectados -----	44
4.3.2.1 - Actividade dos compostos em macrófagos infectados com <i>M. avium</i> --	45
4.3.3 - Actividade antimicobacteriana dos vários compostos na sua forma encapsulada em lipossomas -----	46
4.4 - <u>Acção dos AINEs</u> -----	48
4.4.1 - Acção dos AINEs em <i>M. smegmatis</i> e em <i>M. tb.</i> H37Rv -----	48
4.5 - <u>Efeito combinado dos AINEs com os pró-fármacos na sobrevivência intracelular micobacteriana</u> -----	51
4.5.1 - Acção antimicobacteriana do efeito combinado em <i>M. tb.</i> H37Rv -----	51
 5 - Discussão e perspectivas -----	 52
5.1 – Discussão -----	53
5.2 – Perspectivas -----	56
 Bibliografia -----	 57
 Anexos -----	 64
Anexo I -----	65
Anexo II -----	67
Anexo III -----	69
Anexo IV -----	72
Anexo V -----	74

Índice de figuras

Figura 1 - Taxas estimadas de incidência de TB, por país, em 2006 -----	2
Figura 2 - Diferentes resoluções perante a infecção por <i>M. tb.</i> -----	5
Figura 3 - Activação da PZA -----	10
Figura 4 - Modo de acção da PZA -----	11
Figura 5 - Estrutura química da aspirina -----	18
Figura 6 - Estrutura química do ibuprofeno -----	19
Figura 7 - Estrutura química do vioxx ou rofecoxib -----	20
Figura 8 - Variação da EE ao longo do tempo para uma suspensão lipossomal com DPPC -----	38
Figura 9 - Comparação do efeito dos vários compostos na sobrevivência intracelular de <i>M. tb.</i> -----	44
Figura 10 - Efeito do éster C12 na sobrevivência intracelular de <i>M. avium</i> DZMC 44157 (I.) e <i>M. avium</i> DZMC 44156 (II.) -----	46
Figura 11 - Comparação do efeito dos pró-fármacos C12 (I.), C14 (II.) e C16 (III.) sob as formas livres e encapsuladas na sobrevivência intracelular de <i>M. tb.</i> H37Rv -----	47
Figura 12 - Efeito da presença de AINEs na sobrevivência intracelular de <i>M. smegmatis</i> -----	49
Figura 13 - Efeito da presença de AINEs, vioxx (I.), ibuprofeno (II.) e aspirina (III.) na sobrevivência intracelular de <i>M. tb.</i> H37Rv -----	50
Figura 14 - Efeito da presença de PZA combinada com AINEs na sobrevivência intracelular de <i>M. tb.</i> H37Rv -----	51
Figura 15 - Efeito do éster C12 combinado com os AINEs na sobrevivência intracelular de <i>M. tb.</i> H37Rv -----	52

Índice de tabelas

Tabela 1 - Fármacos de 2ª linha e as suas características	13
Tabela 2 - Concentrações dos AINEs a testar	30
Tabela 3 - Valores de k e tempos de meia-vida determinados para os compostos C12 e C14 isolados, em PBS com ACN a 20%	35
Tabela 4 - Valores de k e tempos de meia-vida para os fármacos C12, C14 e C16 isolados, em plasma	35
Tabela 5 - Valores de k e tempos de meia-vida para os fármacos C12, C14 e C16 isolados, em HT	36
Tabela 6 - Valores de EE obtidos nas várias suspensões lipossomais	37
Tabela 7 - Valores de k e tempos de meia-vida determinados para as reacções de C12 sob a forma encapsulada, em plasma	39
Tabela 8 - Valores de k e tempos de meia-vida determinados para as reacções de C14 e C16 sob a forma encapsulada, em plasma	40
Tabela 9 - Valores de k e tempos de meia-vida determinados para as reacções dos ésteres sob a forma encapsulada em HT	41
Tabela 10 - Valores de CMIs dos pró-fármacos, POA e PZA, determinados <i>in vitro</i> contra a estirpe <i>M. tb.</i> H37rv, sensível à PZA	42
Tabela 11 - Valores de CMIs dos pró-fármacos (pirazinoato de dodecanoílo (C12), pirazinoato de tetradodecanoílo (C14) e pirazinoato de hexadecanoílo (C16)), POA e PZA, determinados <i>in vitro</i> contra várias estirpes resistentes à PZA	43
Tabela 12 - Valores de CMIs obtidos para todos os compostos em estudo	48

Introdução

1.1. A epidemiologia da Tuberculose

A Tuberculose (TB) é uma das doenças infecciosas que tem acompanhado a história do Homem ao longo do tempo. As provas da existência do agente causal desta doença, o bacilo da tuberculose, remontam ao início da civilização humana, como por exemplo ao tempo do antigo Egipto uma vez que foram encontradas lesões típicas desta doença em múmias (28).

A TB tornou-se epidémica na Europa, após a revolução industrial, durante o século XVIII, devido a factores como o aumento dos aglomerados populacionais, as precárias condições sócio-económicas que geraram situações de malnutrição, as más condições habitacionais e higieno-sanitárias, que possibilitaram a disseminação e transmissão da doença (65).

O *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*) é um patógeno particularmente bem-sucedido, que infecta de forma latente aproximadamente 2 biliões de pessoas, ou seja,

um terço da população mundial. A cada ano, são notificados cerca de 8 milhões de novos casos de TB e 2 milhões de mortes a nível mundial. Cinquenta milhões de pessoas já foram infectadas com estirpes que apresentam resistências aos fármacos antimicobacterianos. Só em 2006, foram estimados 9,2 milhões de novos casos, sendo a Índia, a China e a Indonésia os países com maiores taxas de incidência (figura 1) (86).

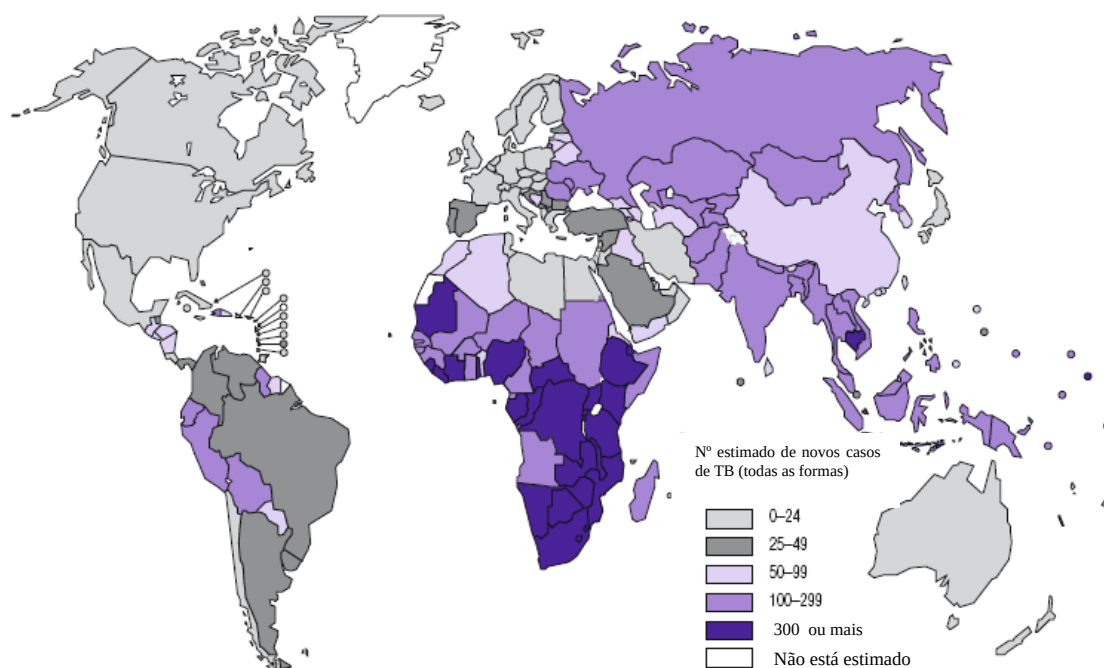


Figura 1- Taxas estimadas de incidência de TB, por país, em 2006 (86).

A TB já foi considerada uma doença tratável tendo sido prevista a sua erradicação aquando da introdução dos antibióticos, estreptomicina, isoniazida e pirazinamida (PZA) nas décadas de 40 e 50 do século XX. Contudo, nas últimas décadas desse século, notou-se uma alteração significativa nesta tendência assistindo-se a um ressurgimento da doença a nível mundial. A industrialização, os novos hábitos sociais, a intensa migração, o aumento da diversificação de dependências e a pandemia do vírus da imunodeficiência humana (VIH) e da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), juntamente com a ineficaz ou fraca resposta dos sistemas de saúde, geraram grupos de risco mais vastos e alargados, responsáveis pelo aumento dos casos de TB (9, 23, 42).

A relação entre SIDA e TB, principal infecção oportunista associada à SIDA, deve-se ao facto de o VIH ser um vírus que debilita o sistema imunitário do hospedeiro

promovendo a reactivação de infecções latentes (10). As principais células alvo da infecção por VIH são os linfócitos CD4⁺ e os macrófagos. Como uma das respostas imunitárias do hospedeiro contra o *M. tb.* é a imunidade mediada por células, as defesas do hospedeiro ficam então comprometidas (51).

Ainda, devido ao facto dos tratamentos existentes serem muito longos e acompanhados de efeitos secundários, tornou-se difícil garantir a adesão dos pacientes à terapêutica (86). No caso dos doentes com SIDA, o tratamento é pouco eficaz por estes apresentarem uma capacidade de absorção intestinal dos antibióticos muito reduzida (43). Estes são alguns dos factores que têm contribuído para o aumento das taxas de resistência aos fármacos usados. A resistência em *M. tb.* desenvolve-se por mutações no ácido desoxirribonucleico (ADN), e resulta da pressão selectiva exercida por um tratamento, que pode ser devido à fraca adesão dos doentes, monoterapia, doseamento inadequado, e fraca absorção dos compostos (51). Todos estes factores, no seu conjunto, têm agravado o impacto da TB na Humanidade potenciando elevadas taxas de incidência (38). Actualmente, a estratégia de tratamento supervisionado (DOT *Direct Observed Treatment*) tem por fim garantir a adesão ao tratamento, reduzindo o risco de transmissão na comunidade, no entanto, garantir uma política global de luta contra a TB é um desafio constante (86).

1.2. Fisiopatologia da infecção

A TB é principalmente transmitida por via aérea. Os bacilos são libertados para o meio nas secreções broncopulmonares expelidas quando um doente com TB pulmonar tosse, espirra ou expectora, sendo a tosse a manifestação clínica mais comum. Ao tossir, os doentes libertam aerossóis (gotículas 1-5 µm) contendo bacilos infecciosos que, uma vez dispersos no ar circundante podem ser inalados por outros indivíduos (61).

Após inalação, os bacilos que conseguem ultrapassar as diversas barreiras do tracto respiratório e alcançar os alvéolos pulmonares, entram em contacto com os macrófagos alveolares. Nesta fase, a resposta imunitária do hospedeiro pode ser completamente eficaz e eliminar todos os bacilos (ponto I da figura 2), ou a infecção pode transformar-se em TB, o que ocorre frequentemente em indivíduos imuno-comprometidos, como no caso de infecção por VIH em que o risco de TB aumenta exponencialmente (ponto II da figura 2) (49).

Os fagócitos podem não conseguir eliminar totalmente os bacilos, possibilitando que estes se multipliquem intracelularmente e lisem a célula hospedeira (61). Neste caso (ponto III da figura 2), os bacilos são contidos no local por acção da imunidade celular, um dos mecanismos de defesa mais eficazes contra o *M. tb.*. Os linfócitos T CD4⁺ iniciam a resposta aos antígenos micobacterianos, e estes activam os macrófagos através da libertação de interleucinas. Os macrófagos uma vez activados adquirem maior capacidade bactericida e envolvem o foco de infecção primária e os focos de disseminação. O granuloma é então formado, e no caso da TB, forma-se no centro deste uma área de necrose de aspecto caseoso, podendo resultar na destruição dos tecidos envolventes ou na destruição dos bacilos com a contenção da infecção. No interior dos granulomas permanecem alguns bacilos na forma latente que são possíveis focos de reactivação (52). Muitas infecções ficam contidas nesta fase durante um período de latência que pode durar toda a vida do indivíduo infectado. Apenas uma pequena percentagem dos indivíduos infectados desenvolvem a doença activa (2, 52).

Na maioria dos casos, após uma primo-infecção, as lesões calcificam e o indivíduo mantém apenas reservatórios residuais nos tecidos, que perante desequilíbrio entre o agente patogénico e a imunidade do hospedeiro podem levar à reactivação (ponto IV da figura 2). Se a barreira imunológica for superada pelos bacilos, então estes multiplicam-se e disseminam-se e o indivíduo evolui para a doença activa. A localização pulmonar da infecção é a mais comum, no entanto a disseminação pode levar à infecção de outros tecidos e órgãos (36).

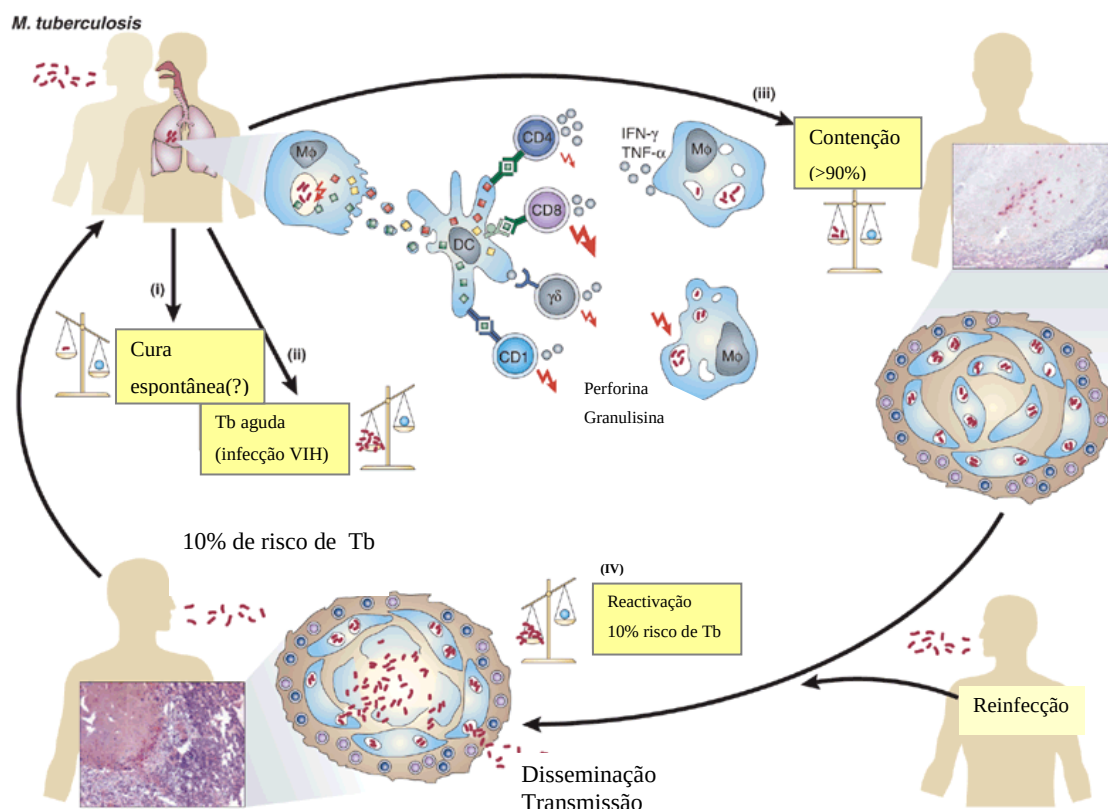


Figura 2 – Diferentes resoluções perante a infecção por *M. tb.*. Adaptado de Kaufmann *et al.* (49).

O desenvolvimento da TB como doença, depende da capacidade de resposta do sistema imunitário do hospedeiro. O *M. tb.* não exerce qualquer acção lesiva directa sobre os tecidos circundantes, uma vez que não produz quaisquer substâncias com acção lítica para as células e tecidos. É o sistema imunológico que ao tentar conter a infecção, produz fenómenos inflamatórios e destruição dos tecidos. Perante uma elevada concentração micobacteriana, a resposta imunológica tende a ser exacerbada para tentar destruir e inactivar os bacilos, acabando por formar mais focos granulomatosos e caseosos. Não sendo esta resposta eficaz, a consequência é a progressão da lesão inflamatória e a formação de grandes focos de necrose caseosa (36, 52).

O pH ácido e a baixa concentração de oxigénio no interior do granuloma são os principais factores que permitem a contenção do processo infeccioso. No entanto, se a necrose caseosa evoluir para um estado de liquefação devida à libertação pelos macrófagos activados de grandes quantidades de proteases, lipases e nucleases, gera-se um ambiente favorável ao crescimento e proliferação micobacteriana. Assim, em

condições extracelulares e em contacto com maiores concentrações de oxigénio os bacilos proliferam e disseminam-se tornando o hospedeiro numa fonte de contágio (52).

1.3. Interacção hospedeiro-patogénio

A interacção patogénio-hospedeiro pode ser influenciada por inúmeros factores. Esses factores podem estar associados ao hospedeiro: à competência do sistema imunitário, idade, constituição física, hábitos alimentares e de consumo de álcool ou tabaco e à infecciosidade do doente que expõe os aerossóis bacilíferos (4); ou associados ao agente etiológico, determinando a transmissão da infecção: a virulência da estirpe, concentração bacilar de infecção, o tempo de exposição ao bacilo e o contacto com pessoas infectadas. A progressão da infecção por *M. tb.* depende ainda da existência de uma exposição prévia ou não ao bacilo e da vacinação (61).

O sistema imunitário humano é muito eficaz na detecção e destruição de potenciais agentes patogénicos, mas alguns microrganismos têm desenvolvido e recorrido a inúmeros mecanismos para garantirem a sua sobrevivência e replicação escapando aos mecanismos de destruição (50).

Durante a infecção primária do hospedeiro, os primeiros fagócitos profissionais que o *M. tb.* encontra são os macrófagos que representam a primeira forma de resposta inata contra o bacilo (54). As interacções entre bacilos e macrófagos são mediadas por receptores. Os receptores do tipo “toll-like” são proteínas transmembranares que reconhecem os patogénios bacterianos e induzem uma forte resposta inflamatória, induzindo a activação dos macrófagos (50). Uma vez activados internalizam os bacilos e a sua activação induz vários mecanismos de defesa como a fusão dos fagossomas com os lisossomas que é facilitada por um processo inflamatório e pela capacidade do fagolisossoma polimerizar actina que permite estabelecer interacções entre a sua membrana e o citoesqueleto (46, 74).

Os mecanismos de fusão e consequente maturação, estão associados a uma acidificação no lúmen do fagossoma que gera um aumento da actividade hidrolítica das enzimas lisossomais incluindo as catepsinas e a uma potenciação dos intermediários reactivos de azoto, factores importantes na morte intracelular dos patogénios (7, 31, 46, 74).

À medida que os bacilos se vão replicando, o macrófago hospedeiro inicial é destruído e outros macrófagos e monócitos são infectados. Sabe-se actualmente que a apoptose pode ser induzida pela presença de factor de necrose tumoral alfa (TNF- α) (37) ou inibida em algumas interacções hospedeiro-patógeno, podendo ser vista como um mecanismo para abrandar a disseminação da doença (50, 55).

A virulência micobacteriana deve-se à capacidade dos bacilos sobreviverem intracelularmente em macrófagos, nos fagossomas precoces, induzindo o bloqueio da maturação em fagolisossoma (7).

Estudos recentes demonstraram que é possível ultrapassar o bloqueio induzido pelo *M. tb.* modulando o sistema pela sinalização para a nucleação da actina com lípidos. Por exemplo, o ácido araquidónico (AA), lípido polinsaturado essencial da série 6 (eicosanóide ómega 6) é um forte efector que após ser convertido em prostaglandinas (PG) promove a nucleação da actina nos fagossomas, induzindo um aumento de filamentação de actina em fagossomas contendo o *M. tb.*, levando a um aumento da maturação do fagossoma, e consequentemente da morte intracelular das micobactérias, gerando uma resposta pró-inflamatória. No entanto, lípidos anti-inflamatórios como a fosfatidilcolina e o ácido eicosapentanóico (EPA) que é eicosanóide da série ómega 3, inversamente bloqueiam a nucleação da actina em fagossomas contendo partículas inertes, pérolas de látex (LBP_latex bead phagosome) ou micobactérias, *in vitro*, e facilitam a sobrevivência e multiplicação intracelular do *M. tb.* num modelo murino de infecção gerando uma resposta anti-inflamatória (7, 34, 46, 73). Ainda, elevados níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) inibem a polimerização de actina, a fusão do fagossoma com o lisossoma e a acidificação nas células, contrariamente baixos níveis de AMPC estimulam o processo (34, 48).

Os fagossomas contendo micobactérias não patogénicas como *M. smegmatis*, filamentam actina de forma semelhante aos LBP e as micobactérias são mortas em cerca de 48 horas (46). Mas para micobactérias patogénicas como o *M. tb.* este processo é inibido (47). A adição de lípidos pró-inflamatórios a macrófagos infectados estimula este processo e a maturação do fagossoma em geral, levando à morte intracelular do *M. tb.* Para além dos efeitos intracelulares, também a adição de lípidos a fagossomas *in vitro* afecta a nucleação da actina pelos mesmos, notando-se a relação entre a capacidade de nucleação com a maturação dos fagossomas, que quanto mais maduros menos capacidade de filamentação têm. Consequentemente, estes efectores parecem ultrapassar a capacidade do agente patogénico prevenir a fusão fago-lisossoma. A

manipulação das vias de sinalização na membrana do fagossoma permite controlar funções chave na propensão inata dos macrófagos para matar invasores (25, 31).

Neste contexto, a filamentação da actina pelas membranas pode ser considerada como parte das respostas pro-inflamatórias dos macrófagos. Mediadores pro-inflamatórios promovem a fagocitose, a associação de fagossomas com a actina e a fusão do fagolisossoma; mas factores anti-inflamatórios inibem esses processos. A exploração destas vias de sinalização poderá levar a terapias alternativas aos antibióticos para o tratamento da TB.

1.4. Quimioterapia para a TB

A história da quimioterapia antituberculosa é apenas uma pequena parte da história da quimioterapia para infecções. Na primeira metade do século XX a problemática da TB parecia irresolúvel, acreditava-se que a rica composição lipídica da parede micobacteriana tornava a quimioterapia ineficaz. Esta crença parecia ter fundamento quando, após o desenvolvimento dos primeiros antibióticos como as sulfonamidas e penicilina, estas não tinham qualquer efeito no *M. tb*. Assim é possível entender todo o entusiasmo que rodeou a descoberta da estreptomicina e do ácido *para*-amino salicílico (PAS). No entanto, estas descobertas não se revelaram uma solução para a TB (40).

1.4.1. Fármacos de primeira linha

A estreptomicina descoberta em 1949, foi o primeiro antibiótico efectivo contra a TB. Também nesta década foi introduzido o PAS e em 1952 foi introduzida a isoniazida, tendo surgido posteriormente a pirazinamida (PZA) (40).

Devido ao aparecimento de estirpes resistentes à estreptomicina iniciou-se a combinação de estreptomicina com outros fármacos.

Em geral, um doente com TB deve fazer uma terapia combinada de três tipos de fármacos semanalmente, por um período de seis a nove meses. Daí os efeitos adversos

causados pelo tratamento representarem a maior dificuldade, e a maior causa de abandono do tratamento pelo doente. Em diversos casos, pode ocorrer, por exemplo, o comprometimento hepático e renal, sem contar o mal-estar, a imunodepressão e os enjoos constantes (57).

Com a terapia combinada tornou-se possível erradicar o agente infeccioso ou reduzi-lo o mais possível numa primeira fase. A isoniazida foi um dos primeiros antibióticos introduzidos na primeira linha de tratamento combinado pois é um potente fármaco que inibe duas enzimas necessárias para a síntese do ácido micólico (componente da parede celular micobacteriana) (17). Outro antibiótico de primeira linha é a rifampicina, que foi introduzida na década de 60 do século XX, que interfere especificamente com a polimerase de ácido ribonucleico (ARN) do bacilo quando este é reactivado, inibindo a sua actividade e impedindo com isso a transcrição do ADN. A introdução de rifampicina permitiu reduzir a duração da terapia de dois anos para seis meses, pois esta actua tanto para bacilos em multiplicação rápida como lenta, intracelular ou extracelularmente. No entanto, quando usado em monoterapia, a resistência surge rapidamente (26, 40, 58, 63).

Actualmente, nos tratamentos de curta duração, são adoptados esquemas de terapêuticos em que se combinam três ou quatro fármacos de forma a eliminar eficientemente o maior número possível de bacilos (40).

O etambutol é outro fármaco introduzido no início do tratamento da TB para evitar a emergência específica de resistência à rifampicina. É um quelante de zinco, que interfere na síntese da parede micobacteriana tal como a isoniazida. Mas este (o etambutol) inibe as arabinosiltransferases, responsáveis pela biosíntese do arabinano, componente do arabinogalactano que constitui grande parte da parede celular micobacteriana. Como consequência, há uma acumulação de ácidos micólicos e eventualmente ocorre morte celular (40).

A isoniazida é um derivado sintético do ácido isonicotínico; que inibe várias enzimas micobacterianas envolvidas na síntese do ácido micólico, impedindo desta forma a síntese da parede celular. Este fármaco apresenta uma potente acção bactericida nas micobactérias em fase de replicação; contudo, nas micobactérias latentes apresenta apenas um efeito bacteriostático. Não ocorre resistência cruzada da isoniazida com outros antituberculostáticos (26).

Devido à prevalência de resistência à estreptomicina em muitas partes do mundo, esta não é muito usada na terapêutica da TB. Mas pode ser útil na fase inicial do

tratamento, uma vez que é um aminoglicosídeo que se liga à subunidade 30S do ribossoma, inibindo a tradução das proteínas. No entanto, por não atravessar as membranas celulares, não é útil contra bacilos intracelulares (40, 63).

A PZA é um análogo da nicotinamida, que é um precursor da vitamina B3 (ácido nicotínico, também designado de niacina). É usada no tratamento da TB para bacilos latentes ou semi-latentes internalizados ou não em macrófagos (80), e apresenta um importante papel na diminuição do tempo de tratamento de 9-12 meses para 6 meses, em terapia combinada com isoniazida e rifampicina (13). A capacidade da PZA para encurtar o tempo de terapia da TB está relacionada com a sua actividade contra uma população de bacilos persistentes em estado não-replicativo que residem num ambiente fagossomal com pH ácido perante o qual a maioria dos antibióticos não apresenta actividade bactericida (24). O seu mecanismo de acção ainda não se encontra devidamente esclarecido, mas sabe-se que a PZA é um pró-fármaco que é transformado em ácido pirazinóico (POA), a sua forma activa, através da enzima bacteriana, a nicotinamidase/pirazinamidase (PZase) como apresentados (figura 3).

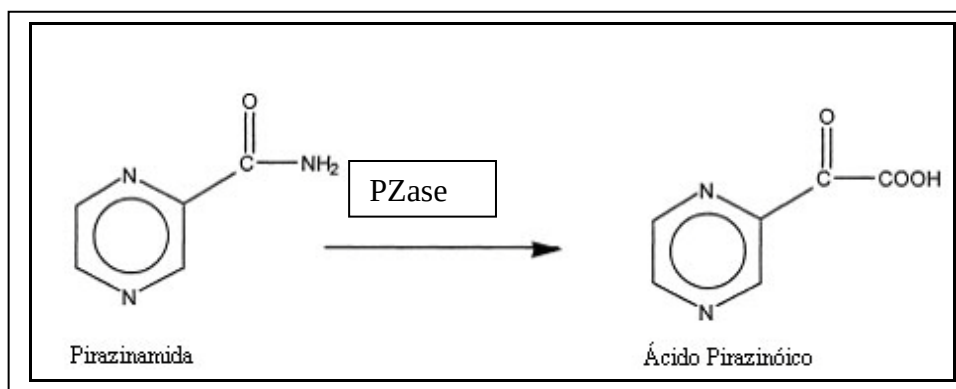


Figura 3 – Activação da PZA (83).

A PZA, de acordo com o modelo proposto por Zhang *et al*, é internalizada pelos macrófagos por difusão passiva e transporte activo, acumulando-se no seu interior (figura 4) (80, 83).

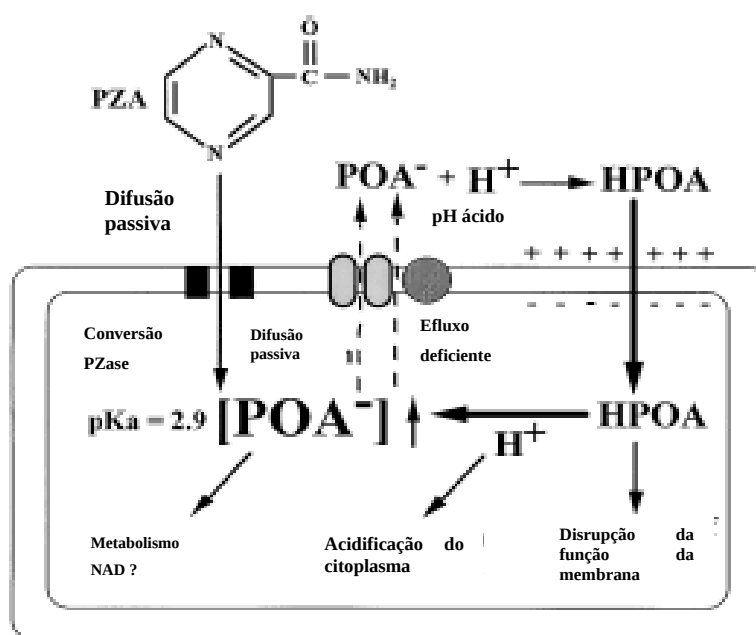


Figura 4 – Modo de acção da PZA (83).

Tendo sido já demonstrado que um ambiente ácido, como o que existe nos fagossomas tardios ou nas zonas necróticas inflamadas, é necessário para a sua actividade (40). O *M. tb.* apresenta um pH interno aproximado de 7, e consegue manter este valor mesmo sob condições de stress ácidas, mas a acumulação de POA diminui o pH intracelular e inactiva enzimas vitais ao bacilo (68). Além disso, como esta espécie não possui bombas de efluxo para o POA, apresenta uma susceptibilidade única à PZA, visto os sistemas de efluxo regular a concentração citoplasmática de vários compostos (85). Pensa-se que a acumulação de POA inibe a síntese de ácidos micólicos por diminuição do pH para níveis sub-óptimos de actividade de uma enzima envolvida na síntese dos ácidos micólicos, como poderá ser o caso da sintase dos ácidos gordos I (FAS I) (26, 68, 85). Noutro mecanismo de acção proposto para a PZA, esta actua sobre o potencial de membrana e armazenamento de energia em bacilos envelhecidos com uma baixa actividade metabólica. Tal, é suportado pelo facto da actividade da PZA diminuir quando é fornecido nitrato como receptor alternativo de electrões para produção de energia em situações de anaerobiose como acontece nos tecidos granulomatosos (80).

O gene *pncA* codifica para a PZase e mutações neste gene estão associadas com resistência à PZA, uma única mutação pontual gera a perda de actividade da PZase (56, 70). Para além das formas de resistência adquirida à PZA, existem espécies naturalmente resistentes como é o caso do *M. bovis* e do *M. bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG), cujo gene *pncA* existe mutado naturalmente (70).

O *M. avium* possui uma PZase activa (69), no entanto é resistente à PZA devido à existência de bombas de efluxo efectivas para o POA (65). A resistência de *M. kansasii* à PZA é similar, e embora possua uma PZase, esta tem uma baixa actividade (70). *M. smegmatis* possui duas PZases, conseguindo converter a PZA em POA mas não existe acumulação de POA devido a um mecanismo de efluxo muito activo (84). Existem ainda formas de resistência natural ao derivado da PZA, o POA, em *Escherichia coli*, que têm um mecanismo muito activo de efluxo de POA que não permite acumulação de POA mesmo em pH ácido (13, 66). Para além do pH ácido, a actividade da PZA é potenciada em condições anaeróbias ou de hipóxia, e ainda na presença de ferro (80).

A observação de que o *M. tb.* resistente à PZA ainda é susceptível ao POA proporcionou esforços no sentido de desenvolver ésteres de POA como anti-TB (30). A vantagem destes compostos é devida à abundância de esterases em micobactérias que possibilita a activação dos pró-fármacos *in situ*. Infelizmente, como as esterases também existem no plasma humano, estes compostos são facilmente hidrolisados antes de atingirem a célula-alvo, impedindo a actividade dos compostos (29).

1.4.2. Outros fármacos

Os fármacos de 2ª linha são: etionamida, cicloserina, PAS, amicacina, canamicina, capreomicina e tiosemicarbazona apresentados na tabela seguinte:

Tabela 1-Fármacos de 2ª linha e as suas características (12, 26, 33).

Fármaco:	Características:
etionamida	Derivado do ácido isonicotínico que inibe o desenvolvimento de bacilos resistentes, actuando por inibição da síntese proteica, impedindo assim a biosíntese do ácido micólico por parte do <i>M. tb.</i> , no entanto induz uma hepatotoxicidade significativa.
cicloserina	Actua como bacteriostático, por competição com a D-alanina, impede a formação do peptidoglicano essencial para a síntese da parede celular inibindo o crescimento da micobactéria e apresenta neurotoxicidade.
ácido para-aminosalicílico	Bacteriostático. Não se conhece em detalhe o seu mecanismo de acção, mas é-lhe atribuída a inibição da síntese do ácido fólico necessário à síntese de ácidos nucleicos.
amicacina e a canamicina	Aminoglucósidos que possuem actividade antimicobacteriana. Ligam-se irreversivelmente à subunidade ribossomal 30S impedindo a síntese proteica do bacilo.
capreomicina	Antibiótico polipeptídico semelhante à estreptomicina e aos outros aminoglucósidos. É um fármaco nefro e ototóxico.
tiosemicarbazona	É um dos fármacos menos potentes e mais tóxicos usados contra a TB.

Inúmeras outras moléculas têm apresentado actividade no tratamento da TB.

Fluorquinolonas como a ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina e esparfloxacina, são compostos com actividade sobre o *M. tb.*, pois inibem a ADN girase, enzima responsável pela replicação do ADN micobacteriano; apresentam uma boa distribuição tecidual e celular e efeitos adversos escassos (26).

Os análogos da rifampicina são outro grupo de compostos com actividade antimicobacteriana. A rifapentina e a rifabutina têm actividade inibitória similar à rifampicina (26, 44).

A clofazimina apresenta actividade antimicobacteriana contra micobactérias intracelulares de macrófagos isolados, que é superior quando comparada à actividade da canamicina (44, 45).

As oxazolidinonas são uma nova família de antimicrobianos que actuam inibindo a síntese proteica ao se fixarem à subunidade ribossomal 50 S (26).

Os macrólidos são derivados semi-sintéticos (roxitromicina, azitromicina e claritromicina) que apresentam actividade contra o *M. tb.* que diminui quando estes são administrados em associação com outros antibacilares (44).

1.5. Mediadores da inflamação

A infecção micobacteriana é um processo complexo, que tanto se pode manifestar como infecção latente ou gerar TB activa. Durante todo o processo, as micobactérias vão actuando de várias formas, em alguns casos escapando e sobrevivendo aos sistemas de defesa do hospedeiro. No entanto, é possível modular as respostas inflamatórias pela adição de lípidos como o AA que induz uma resposta pró-inflamatória estimulando os mecanismos bactericidas dos macrófagos, ou como o EPA que possui um efeito anti-inflamatório e leva à sobrevivência intracelular de bacilos (6, 22).

Os leucócitos que chegam à zona inflamada, produzem mediadores químicos para recrutar mais leucócitos para o local e remodelam o tecido afectado através de fagocitose, libertando produtos tóxicos incluindo intermediários reactivos de oxigénio.

A resposta inflamatória é controlada por vários mediadores químicos como os prostanóides, que incluem PGs e prostaciclina (PGI₂), e leucotrienos produzidos pelas células locais ou pelos leucócitos infiltrados (11, 22). No caso dos macrófagos alveolares, estes podem ser induzidos a libertar AA que se torna um substrato da ciclooxigenase e outras enzimas que levam à formação de prostanóides e leucotrienos. Estes eicosanóides podem contribuir para a imunoregulação e funções de defesa exercidas pelos macrófagos alveolares (6).

As PGs são sintetizadas pela maioria das células no organismo humano. A biosíntese de PGs através da via da ciclooxigenase (COX) é iniciada pela libertação de AA vindo da hidrólise de fosfolípidos membranares, principalmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, pelas fosfolipases, seguindo-se a conversão do AA em PGG₂ pelas enzimas COX (COX-1, COX-2 e COX-3 uma variante da COX-1) (20). A PGG₂ é depois convertida em PGH₂ pela actividade hidroxiperoxidase da COX (11).

O AA libertado serve de substrato para duas vias enzimáticas distintas: a via das COX, que leva à produção das PGs e dos tromboxanos, e a via das lipoxigenases, responsáveis pela síntese dos leucotrienos, lipoxinas e outros compostos (11, 20).

Devido às suas curtas meias-vidas, as PGs actuam no local ou próximo do local da sua síntese, através da ligação a receptores específicos na superfície celular, o que leva a efeitos biológicos como relaxamento ou contracção dos vasos sanguíneos, agregação de plaquetas, assim como dor e febre, logo as PGs são prostanóides cruciais para a regulação da pressão sanguínea (39). Os eicosanóides, compostos derivados de ácidos gordos essenciais de vinte carbonos esterificados em fosfolípidos da membrana celular, são os responsáveis por muitos dos processos que decorrem durante a inflamação aguda (6). A resposta inflamatória gere a resposta adaptativa através da secreção de vários mediadores como a interleucina 1 β , TNF- α , PGE2 e leucotrieno B4. PGE2 e leucotrieno B4 são produtos finais da conversão de AA pela COX e pela 5-lipoxigenase respectivamente (6, 20).

O Factor nuclear kB (NF-KB) é um regulador de genes envolvidos no processo inflamatório, cuja activação pode ser feita pelo TNF- α , ou ainda por lípidos como é o caso do AA em células Caco-2 (73). Quando existe sinalização pró-inflamatória através da sinalização de receptores da superfície celular como os receptores “toll-like”, há libertação das proteínas que regulam a transcrição de muitos dos genes envolvidos na inflamação. Por exemplo, há activação do NF-KB em macrófagos activados pela infecção com *M. smegmatis*, e quando o NF-KB é bloqueado há sobrevivência do *M. smegmatis*. Um dos papéis do NF-KB neste processo é a indução da síntese de uma família de enzimas lisossomais e potenciais reguladores da fusão fago-lisossomal. Em macrófagos infectados por micobactérias patogénicas o AA potencia a activação do NF-KB enquanto que o EPA não consegue activar este processo. A sinalização por TNF- α envolve uma série de receptores e recrutamento de proteínas que activam vários mecanismos: o do NF-KB e de cinases que levam à modulação da expressão de genes por diferentes factores de transcrição (78). As micobactérias patogénicas tendem a inibir estes mecanismos. Sabe-se que algumas cinases são activadas após infecção micobacteriana e que micobactérias patogénicas inibem essa activação. Em macrófagos infectados com *M. tb.* foi estimulada a secreção de TNF- α pelo tratamento com AA, mas quando usado EPA houve inibição deste processo. O AA activou uma cinase, a MAP cinase p38, em células não infectadas. Contudo, em células infectadas com *M. tb.* o AA não apresentou este efeito (6, 47).

A modulação das respostas imunitárias pode ser regida por inúmeros factores como a sinalização lipídica que pode influenciar os mecanismos bactericidas dos macrófagos, interferindo na maturação fagossomal (64). Considerando a possibilidade de modular as interacções patogénio-hospedeiro através de factores pró e anti-inflamatórios, é de suma importância esclarecer estas relações em casos de infecções como micobacterioses e em especial a TB.

1.5.1. Isoenzimas ciclooxigenase

A enzima limitante do mecanismo de síntese das PGs, a COX, é o principal alvo no tratamento com anti-inflamatórios não-esteróides, devido ao papel central das PGs na resposta inflamatória.

Os eicosanóides são importantes mediadores de inflamação nos organismos, por mecanismos dependentes da COX que levam à produção de PGs, leucotrienos e lipoxinas (8, 21). Por exemplo a PGE₂, está envolvida na produção do AMP cíclico (AMPc) e na activação da proteína cinase dependente do AMPc (23, 41). Estes importantes mediadores do processo inflamatório deixam de ser libertados quando a COX é inibida. O bloqueio da síntese do AMPc favorece a filamentação da actina e a morte intracelular do *M. tb.* (48). Por outro lado, a inibição da COX bloqueia a libertação do AA das membranas. O AA pode ser convertido pela COX em PGE₂ ou PGF₂. Enquanto o primeiro induz a filamentação da actina, o segundo bloqueia. Com a inibição da COX e da consequente formação de prostanóides inflamatórios deixa de haver formação de PGE₂, não havendo produção de AMPc nem activação da proteína cinase dependente do AMPc (41, 75). Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) possuem, assim, vários mecanismos de acção descritos, de entre os quais a inibição da COX.

Existem várias isoformas da COX, expressas por dois genes diferentes: COX-1, encontrada na maioria dos tecidos e expressa em níveis constantes durante o ciclo celular; COX-2, dificilmente detectada na maioria dos tecidos mas regulada positivamente de forma rápida após indução por estímulos inflamatórios (15); e COX-3, recentemente identificada no tecido do cérebro, derivada de um “splicing” alternativo no gene da COX-1 (14).

Estudos mais recentes mostraram que as funções da COX-1 e COX-2 não estão totalmente separadas. Por exemplo, a COX-2 já foi encontrada em tecidos normais, como os do cérebro e rins, e também está associada com o processo de recuperação nos casos de úlceras gastro-intestinais (81).

Experiências com ratinhos “knock-out” para a COX-2, levadas a cabo por Darling *et al* (32) mostraram que a COX-1 também está envolvida na resposta inflamatória. E também já foram demonstrados mecanismos compensatórios entre a COX-1 e a COX-2 (15).

As diferentes funções biológicas das isoenzimas COX ainda não se encontram devidamente elucidadas (15, 39).

1.5.2. Anti-inflamatórios não-esteróides

1.5.2.1. Anti-inflamatórios não-esteróides clássicos e os seus mecanismos de acção

Os AINEs têm sido usados como forma terapêutica no tratamento da dor febre e inflamação. O primeiro AINE, o ácido acetilsalicílico ou aspirina, foi introduzido na terapêutica no final do século XIX.

Os AINEs actuam inibindo a actividade das COX, e por conseguinte reduzindo a produção de prostaglandinas pro-inflamatórias. Têm efeito analgésico, anti-pirético e anti-inflamatório.

A primeira geração de AINEs, ou os AINEs clássicos inibem inespecificamente a COX-1 e COX-2, embora alguns destes apresentem uma preferência pela isoforma 1 (39).

1.5.2.1.A. Inibidor irreversível

A aspirina ou ácido acetyl salicílico (ASA) é o único AINE conhecido que actua como um inibidor competitivo e irreversível da COX, enzima necessária para a síntese de PGs e tromboxano, por modificação covalente do local activo da enzima (39, 72). John Vane demonstrou em 1971 que a ASA inibe o mecanismo de produção de PGs e tromboxano (76, 77).

Por adição de um grupo acetil à cadeia de aminoácidos adjacente ao local activo da COX, a ASA previne que o AA se ligue correctamente no local activo. A ASA faz a acetilação do canal catalítico da COX-1 com maior eficiência que no local activo da COX-2, sendo por isso 10 a 100 vezes mais activa contra a COX-1 (39). A ASA inibe irreversivelmente a COX-1 e altera a actividade enzimática da COX-2. Normalmente, a COX-2 produz prostanóides que na sua maioria são pró-inflamatórios. Mas, a COX-2 modificada pela ASA produz lipoxinas, que na sua maioria são anti-inflamatórias (11).

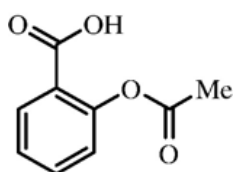


Figura 5 – Estrutura química da aspirina.

A ASA é também descrita como um precursor de sideróforos em *M. smegmatis*, e como indutor do bloqueio da nucleação da actina em fagossomas formados durante a infecção com *M. smegmatis*, pelo que se espera que facilite a sobrevivência micobacteriana por facilitar o acesso intracelular ao ferro e evitar a formação de fagolisossomas (1).

A ASA tem ainda sido usada em pequenas doses na prevenção a longo prazo de doenças cardiovasculares. Crê-se que devido à acção inibitória irreversível contra a COX-1 nas plaquetas, que resulta na redução da produção de tromboxano pró-trombótico A2 (TXA2), a ASA tenha efeitos protectores a nível cardiovascular, uma vez que tem efeitos anti-coagulantes.

Os tromboxanos são responsáveis pela agregação de plaquetas que permitem a coagulação do sangue. No entanto, quando essa capacidade é reduzida, pode haver sangramento excessivo devido ao uso de ASA (39, 72).

Sabe-se que a ASA tem propriedades análgésicas, anti-inflamatórias, antipiréticas e trombolíticas. Os níveis tóxicos de ASA dependem do grau de metabolismo e dos níveis de salicilato, o metabolito activo da ASA. Encontra-se no entanto estimado que para os adultos a dose aguda fatal é de 500 mg/Kg, sendo que nas crianças e idosos a susceptibilidade é maior (19, 79). E, há muito que se demonstrou

que a ASA leva a um aumento da concentração de oxigénio no crescimento micobacteriano (71).

Dados recentes sugerem que a ASA e os seus derivados têm a capacidade de modular a sinalização através de NF- κ B, que é um dos mediadores de inflamação (53). E existem ainda outros estudos que sugerem mecanismos de acção independentes da COX (3, 16).

1.5.2.1.B. Inibidor competitivo

Este grupo consiste em fármacos que competem com o AA pelo local activo da COX. Os fármacos deste grupo mostram normalmente uma fraca potência devido à sua ligação cinética reversível.

Exemplo deste tipo de AINEs é o ibuprofeno.

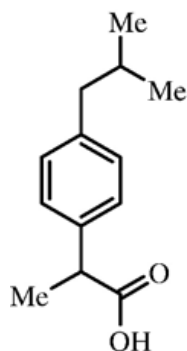


Figura 6 – Estrutura química do ibuprofeno.

O ibuprofeno liga-se reversivelmente ao local activo da COX, seguindo-se uma simples reacção cinética competitiva de enzima-inibidor. Como resultado, a sua acção é independente do tempo.

O ibuprofeno mostra uma cinética semelhante para a COX-1 e para a COX-2 (39).

Contrariamente à ASA e ao paracetamol, o ibuprofeno não apresenta evidências de mecanismos tóxicos. Os sintomas de sobredosagem, embora raros, podem ser atribuídos à inibição da síntese de PGs ou à natureza acídica do fármaco e dos seus metabolitos. Não existem dados de quaisquer efeitos tóxicos para concentrações

inferiores a 100mg/Kg, mas para concentrações superiores a 400 mg/Kg o mesmo já não se verifica (79).

1.5.2.2. Inibidores selectivos da COX-2

Desde a descoberta da COX-2 e da sua associação com a inflamação, os inibidores selectivos da COX-2 (Coxibs) tornaram-se muito populares, pois supunha-se que estes inibidores tivessem efeitos terapêuticos sem causarem efeitos secundários a nível gastro-intestinal (GI).

O rofecoxib ou vioxx foi um dos primeiros inibidores deste tipo introduzidos na terapêutica.

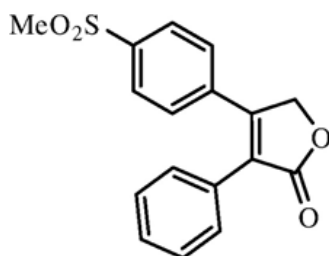


Figura 7 – Estrutura química do vioxx ou rofecoxib.

A selectividade destes inibidores é normalmente atribuída às diferenças estruturais nos locais catalíticos das isoformas 1 e 2 da COX. O mecanismo de acção dos inibidores selectivos da COX-2 é semelhante ao dos inibidores competitivos. Neste mecanismo, os compostos têm que se translocar para o canal catalítico, associando-se depois ao local activo antes de formarem um complexo enzima-inibidor fortemente ligado. Os fármacos deste tipo são fracos inibidores da COX-1, mas têm efeitos analgésicos e anti-inflamatórios comparáveis aos AINEs clássicos (39).

1.5.2.3. Limitações na terapia anti-inflamatória

Apesar dos seus benefícios, controlar a inflamação, a analgesia e combater a hipertermia; os AINEs estão associados a vários efeitos secundários como: danos no fígado, aumento dos sintomas de asma e danos no tracto GI superior.

Estes efeitos no tracto GI vão desde a dispécia à ulceração. Embora estes mecanismos não se encontrem devidamente esclarecidos, sabe-se que há uma inibição na produção de prostaglandinas.

Devido ao conceito convencional de que as PGs produzidas pela via da COX-1 seriam responsáveis pela manutenção das funções fisiológicas e as PGs produzidas pela via da COX-2 mediarão a inflamação; foi proposto que os inibidores da COX-2 teriam efeitos anti-inflamatórios sem provocar os efeitos secundários no tracto GI.

Mas, enquanto os efeitos no tracto GI são discutíveis, uma série de eventos de toxicidade a nível cardiovascular devidos à toma de inibidores selectivos da COX-2 foi relatado. Foi devido a efeitos secundários a nível cardiovascular que o viox foi retirado do mercado (39).

1.5.3. Terapêutica combinada para doenças por micobactérias

Como referido anteriormente, a TB é acompanhada por um forte quadro clínico inflamatório. Neste contexto, a terapia combina vários antibióticos e anti-inflamatórios para diminuição da morbilidade do doente. A combinação de vários antibióticos, muitos deles com citotoxicidade e por longos períodos de tempo, leva a uma elevada hepatotoxicidade dos compostos utilizados nos tratamentos, como a isoniazida e o surgimento de espécies de micobactérias que apresentam multi-resistências aos fármacos, reduzem as perspectivas de tratamentos realmente eficazes. Aquando da administração de um fármaco, este não se dirige apenas aos órgãos alvo, mas distribui-se também por outros tecidos, resultando daí muitas vezes o aparecimento de efeitos secundários e toxicidade elevada. Entre as possibilidades para solucionar esse problema encontram-se o desenvolvimento de novos fármacos e modificação, por vários métodos, da biodistribuição dos compostos actualmente disponíveis como é o caso das suspensões lipossomais, e ainda a associação de vários compostos com o objectivo de equilibrar todos os efeitos e respostas imunitárias, recorrendo a fármacos já existentes mas indicados para outras terapêuticas. Estas constituem algumas das ferramentas mais promissoras no tratamento da TB.

No estudo de fármacos já existentes, Byrne *et al* estudaram os efeitos da ASA e do ibuprofeno em ratinhos infectados com *M. tb*. concluindo que nem a ASA nem o ibuprofeno apresentam efeitos relevantes no desenvolvimento da doença. No entanto a

baixas concentrações de administração, a ASA diminui ligeiramente o número de bacilos no baço dos ratinhos, mas quando associada com isoniazida, leva a um aumento do número de bacilos viáveis no baço e pulmões dos ratinhos (19). Existem também referências da redução do efeito antibiótico para *Escherichia coli* (62).

Mas, assim como pode existir diminuição dos efeitos dos fármacos quando combinados, também pode haver potenciação desses efeitos. É este o caso da ASA e do ibuprofeno quando associados com PZA na fase inicial de tratamento de ratinhos infectados com *M. tb.* (18). Impõe-se a dúvida de até que ponto é que a combinação de AINEs com antibióticos é benéfica ou prejudicial para a continuação das terapêuticas.

Perceber as interacções entre micobactérias e macrófagos, entender todas as respostas pró-inflamatórias que geram a TB activa e modular essas mesmas respostas são objectivos que permitiram encarar a possibilidade de usar AINEs para o tratamento de micobacterioses e de estudar a possibilidade de os incluir de forma benéfica nos esquemas terapêuticos actuais. A expectativa deste trabalho é contribuir para o aumento de conhecimento nessa área para que se melhorem as terapêuticas actuais.

2. Objectivos do presente trabalho

O tratamento das infecções por micobactérias, incluindo as multirresistentes, é passível de várias abordagens. Entre estas encontra-se a manipulação da distribuição e estabilidade dos fármacos existentes de forma a torná-los mais eficazes na terapêutica ou a manipulação da resposta do hospedeiro potenciando os seus mecanismos bactericidas. Com base nestes pressupostos, este trabalho tem por objectivos:

- 1) estudar os efeitos bactericidas de novos pró-fármacos derivados da PZA;
- 2) aumentar a estabilidade dos pro-fármacos por encapsulamento em lipossomas e comparar a acção das formas livres com as formas encapsuladas;
- 3) estudar o efeito de AINEs na sobrevivência de micobactérias;
- 4) testar o efeito da combinação entre os diferentes AINES com os pró-fármacos, e avaliar se uma terapia conjunta para a inflamação e infecção apresenta vantagens ou se se torna prejudicial.

Procedimento experimental

3. Procedimento experimental

Todos os procedimentos envolvendo estirpes potencialmente patogénicas ou patogénicas, foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical no laboratório com nível de segurança biológica 3, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, de acordo com as respectivas normas de segurança.

Nos ensaios de estabilidade enzimática foi utilizado plasma humano e homogenato de fígado preparados nos laboratórios de análises clínicas e de investigação da Faculdade de Farmácia, respectivamente.

A síntese dos pró-fármacos usados neste trabalho foi elaborada de acordo com o processo descrito em patente (27), e de acordo com o processo apresentado no Anexo I.

As suspensões lipossomais usadas foram preparadas como descrito no Anexo II.

3.1. Estudo da estabilidade dos compostos sintetizados

Os compostos pirazinoato de dodecanoílo (C12), pirazinoato de tetradodecanoílo (C14) e pirazinoato de hexadecanoílo (C16) foram testados quanto à estabilidade em plasma humano, homogenato de fígado de ratinho e tampão fosfato, pela técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), visto esta ser uma técnica muito selectiva, rápida e sensível para quantificação dos compostos. Os estudos elaborados em HPLC, foram realizados num sistema Merck constituído por uma bomba Merck-Hitachi L-7100, com injector automático (Merck), detector de ultra-violeta (UV) Merck-Hitachi L-7400, um integrador Merck-Hitachi D-7500 e uma coluna Merck-RP8 de 12 cm. O detector foi regulado para um comprimento de onda de 267 nm e o fluxo usado foi de 1,0 ml/min.

Elaboraram-se rectas de calibração, apresentadas no Anexo I, preparando diversas soluções com concentrações específicas, em acetonitrilo (ACN) (Sigma-Aldrich), que foram injectadas no HPLC em autosampler (função de injeções automáticas pré-programáveis de um volume injectado de 50 µl), usando como eluente uma solução de ACN em água, a 75% (v/v).

3.1.1. Estudo da estabilidade em PBS com ACN a 20 % dos pró-fármacos

Para cada um dos compostos, juntou-se num balão volumétrico de 50 ml: 347 µl de uma solução-mãe (3,6 mM), 2,5 ml de ACN e perfez-se o volume final de 50 ml com PBS. Os seis balões foram a incubar a 37°C. Em tempos específicos e após agitação, foram retiradas alíquotas que foram directamente injectadas em HPLC.

3.1.2. Estudo da estabilidade em plasma dos pró-fármacos

Para cada um dos compostos, juntou-se num tubo de ensaio de vidro: 750 µl de plasma, 700 µl de PBS e 50 µl da solução-mãe do composto com uma concentração de 3,6 mM.

Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C com agitação. A tempos pré-determinados foram retiradas alíquotas diluídas de 1:4 em ACN, e posteriormente centrifugadas durante 5 minutos, a 10000 g (centrífuga 112, Sigma). O sobrenadante foi analisado por HPLC.

3.1.3. Estudo da estabilidade em homogenato total (HT) dos pró-fármacos

Para cada um dos compostos juntou-se num tubo de ensaio de vidro: 50 µl de HT, 1400 µl de PBS e 50 µl da solução-mãe do composto com uma concentração de 3,6 mM.

Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C com agitação, e a tempos pré-determinados foram retiradas alíquotas de 150 µl para eppendorfs com 600 µl de ACN, que foram seguidamente centrifugados numa microcentrífuga de bancada, durante 5 minutos, a 10000 g. O sobrenadante foi depois analisado por HPLC.

3.2. Determinação das eficácias de encapsulação (EE) dos pró-fármacos nas suspensões lipossomais

No estudo das eficácias de encapsulação (EE) determinaram-se inicialmente curvas de calibração para os compostos a usar na determinação das EE (C12, C14 e C16), apresentadas na tabela AIV.2. do Anexo IV, por leitura de diferentes concentrações específicas a um comprimento de onda de 267 nm, num espectrofotómetro UV/Visível Lambda2.

Das suspensões de lipossomas inicialmente preparadas, retirou-se uma alíquota, que foi diluída em metanol, a partir da qual se determinou a quantidade de composto presente, por análise espectrofotométrica a 267 nm. A suspensão lipossomal inicial foi centrifugada durante 5 minutos, a 10000 g, tendo sido separado o sobrenadante do sedimento e sendo este último ressuspensionado, de forma a ficar com o volume da suspensão inicial. Do sobrenadante e dos lipossomas ressuspensionados foram retiradas alíquotas que foram diluídas em metanol, na mesma percentagem de diluição da suspensão de lipossomas inicialmente preparados.

As EEs foram então calculadas pela seguinte fórmula:

EE = concentração do composto na suspensão de lipossomas ressuspendidos / (concentração do composto na suspensão de lipossomas ressuspendidos + concentração de composto no sobrenadante).

Com a finalidade de controlar a estabilidade das vesículas, determinou-se para três tempos diferentes a percentagem de pró-fármaco que continuava associado às vesículas, após separação das mesmas por centrifugação. Para tal, usou-se a fórmula descrita para o cálculo da EE. Estes ensaios foram efectuados para as formulações lipídicas que obtiveram valores mais elevados de EE no estudo anterior. Todas as formulações lipossomais seleccionadas para esta fase do estudo continham na sua composição apenas um lípido.

3.3. Estudo da estabilidade dos pró-fármacos encapsulados em lipossomas

3.3.1. Estudo da estabilidade em plasma dos fármacos encapsulados em lipossomas

Para este estudo, juntou-se num tubo de ensaio de vidro: 750 µl de plasma, um volume de suspensão lipossomal que permitiu obter uma concentração final de fármaco em cada tubo de 2 mM e PBS n um volume final de 3000 µl.

Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C com agitação e em tempos específicos foram retiradas alíquotas de 150 µl para eppendorfs com 600 µl de ACN, que foram seguidamente centrifugados durante 5 minutos, a 10000 g. O procedimento restante foi igual ao descrito no estudo da estabilidade dos fármacos em plasma na sua forma livre.

3.3.2. Estudo da estabilidade em homogenato total (HT) dos fármacos encapsulados em lipossomas

Para cada uma das formulações lipídicas preparadas, juntou-se num tubo de ensaio de vidro: 50 µl de homogenato, volume de suspensão lipossomal para uma

concentração final de fármaco em cada de 2 mM e PBS num volume final de 1500 µl. O procedimento restante foi igual ao descrito no estudo da estabilidade dos fármacos encapsulados em lipossomas, no plasma.

3.4. Estudos de actividade dos pró-fármacos

3.4.1. Estirpes micobacterianas usadas

Mycobacterium tuberculosis H37Rv (ATCC 27294), susceptível à PZA serviu como controlo absoluto; usaram-se também estirpes clínicas com resistência adquirida à PZA mantidas na Unidade de Bacteriologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge de Lisboa, cuja susceptibilidade e resistência à PZA foram caracterizadas pelo sistema BACTEC MGIT 960 (59).

Mycobacterium bovis isolado de um animal infectado, pelo Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV) de Lisboa.

Mycobacterium bovis BCG (ATCC35734) foi adquirida do Instituto Pasteur de Paris, e duas estirpes de *Mycobacterium avium*, DZMC 44156 e DZMC 44157, foram obtidas da colecção alemã (7).

Mycobacterium smegmatis mc² 155 foi gentilmente cedida por Bill Jacobs (67).

3.4.1.1. Condições de crescimento das estirpes micobacterianas

Todas as estirpes usadas foram mantidas em cultura líquida em meio Middlebrook 7H9 ou caldo myco devidamente suplementadas. A preparação dos meios encontra-se descrita no Anexo V. As suspensões micobacterianas foram preparadas retirando colónias crescidas em meio sólido (Middlebrook 7H10) para frascos com tampa de filtro com 10-20 ml de meio líquido. As culturas foram incubadas a 37°C durante cerca de 30 dias, para as estirpes de crescimento lento, tempo após o qual era feito um novo inóculo por diluição, para manter as estirpes numa fase de crescimento exponencial durante os ensaios. Todas as densidades ópticas para os caldos micobacterianos foram quantificadas a 600nm num espectrofotómetro Biophotometer Eppendorf.

3.4.2. Ensaios *in vitro* para determinação de concentração mínima inibitória (CMI) para os pró-fármacos C12, C14 e C16

3.4.2.1. Preparação de inóculo de micobactérias

A partir de uma cultura em meio líquido, em fase exponencial, preparou-se uma suspensão de 10×10^8 unidades formadoras de colónias por ml (UFC/ml). Para tal, retirou-se um volume de 1 ml da cultura inicial em fase exponencial de crescimento e diluiu-se em PBS, fazendo-se a posterior centrifugação durante 30 minutos, a 4°C. Após centrifugado, retirou-se o sobrenadante e fez-se a diluição do sedimento em PBS até se obter uma densidade óptica de 0,2 a 600 nm, correspondente a 10×10^8 UFC/ml. O inóculo foi colocado durante alguns minutos num banho de ultra-sons para garantir a dispersão dos bacilos e evitar a formação de agregados.

Do inóculo de 10×10^8 UFC/ml preparou-se uma diluição, obtendo-se uma concentração 10×10^6 UFC/ml também em PBS. Do inóculo 10×10^6 UFC/ml retirou-se o volume necessário para que cada tubo com meio líquido e a pH 5,9 (valor lido num potenciómetro Crison, modelo micro pH 2002), para a determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMIs) tivesse 10×10^4 UFC/ml.

3.4.2.2. Determinação das CMIs

Os compostos a estudar foram os ésteres C12, C14 e C16, a PZA e o POA. Para todos os compostos prepararam-se soluções-mãe em dimetilsulfóxido (DMSO) com a concentração de 8 mg/ml.

As CMIs foram determinadas pelo método de diluições sucessivas em caldo myco suplementado, a pH 5,9, uma vez que é necessário um ambiente ácido para a activação da PZA (59), em ambiente asséptico. A cada tubo de ensaio com as várias concentrações foi adicionado um volume específico do inóculo 10^6 UFC/ml, de modo a obter em cada tubo a concentração de 10^5 UFC/ml, tal como descrito no ponto anterior.

Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

Os tubos foram incubados durante cerca de 30 dias a 37°C. Após este tempo fez-se a leitura da CMI, sendo esta definida como a concentração mínima de composto capaz de inibir o crescimento visível micobacteriano, notado pela ausência de turvação no meio de cultura (5). Em todos os estudos foram preparados tubos de controlo sem adição de qualquer composto, ou seja tubos com inóculo de 10^5 UFC/ml em caldo myco suplementado e a pH 5,9.

Neste ensaio testaram-se as estirpes: *M. tb.* H37Ra, *M. avium* 44156 e *M. avium* 44157.

Uma vez definidos valores de CMI para as estirpes anterior, testaram-se com base nos resultados obtidos as concentrações 20 µg/ml e 200 µg/ml para todos os compostos nas seguintes estirpes: *M. bovis* BCG, *M. bovis*, *M. tb.* H37Rv, *M. tb.* H37Ra, e ainda duas estirpes clínicas de *M. tb.* com resistência adquirida à PZA, designadas de PZAR1 e PZAR2.

3.4.3. Ensaio *in vitro* para determinação de concentração mínima inibitória (CMI) para os AINEs: aspirina, ibuprofeno e viox

Os inóculos micobacterianos foram preparados tal como no ponto 3.4.2.1.. Mas o pH do meio não foi alterado.

3.4.3.1. Determinação das CMIs

Para este trabalho usaram-se as espécies *M. smegmatis* e *M. tb.* H37Rv. Os compostos a estudar foram os AINEs: aspirina, ibuprofeno e viox.

As concentrações a testar foram as seguintes:

Tabela 2 – Concentrações dos AINEs a testar.

AINE:	Concentração:
Ibuprofeno	100 μ M
	10 μ M
	100 nM
Aspirina	10 mM
	1 mM
Vioxx	100 μ M
	10 μ M
	1 μ M
	100 nM
	10 nM

A cada tubo de ensaio com as várias concentrações foi adicionado um volume específico do inóculo 10×10^6 UFC/ml, de modo a obter em cada tubo a concentração de 10×10^4 UFC/ml, tal como descrito no ponto 3.4.2.1..

Os tubos foram incubados durante cerca de 30 dias a 37°C, sendo agitados de dois em dois dias. Após este tempo leu-se a CMI, notada pela ausência de turvação no meio de cultura. Em todos os estudos foram preparados tubos de controlo sem adição de qualquer composto, ou seja tubos com inóculo de 10×10^4 UFC/ml e apenas com meio sem adição de compostos ou inóculo micobacteriano.

3.5. Estudos *ex vivo* da actividade dos compostos em macrófagos infectados

Uma vez definido um valor de CMI, este serviu de base para os ensaios *ex vivo*, permitindo analisar o efeito dos compostos na sobrevivência intracelular de micobactérias em macrófagos.

3.5.1. Linha celular

Usaram-se macrófagos de ratinho da linha celular J774A.1 cedidos por Gareth Griffiths, do Laboratório Europeu de Biologia Molecular (EMBL) de Heidelberg, que foram crescidos e mantidos em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

(Difco_Invitrogen) com 0,01% de piruvato e alta concentração de glucose (4,5 g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Difco) e de 20 mM de glutamina. Para manutenção, foi adicionado ao meio DMEM estreptomicina e penicilina.

3.5.2. Culturas de macrófagos

Após a aderência das células à caixa de cultura de tecidos, cerca de 30 minutos após o plaqueamento, o meio foi substituído para retirar o DMSO existente na mistura de congelamento e usado como crioprotector. Os macrófagos cresceram até cerca de 80% de confluência (cerca de 2 dias) numa caixa de cultura de tecidos de 10 cm de diâmetro, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após o crescimento, raspou-se a placa com um “cell scraper” e ressuspenderam-se as células em 10 ml de meio DMEM (7).

Para culturas em caixa de cultura de tecidos de 24 poços, aplicou-se 1 ml de meio DMEM suplementado a 10% com SFB em cada poço, aplicou-se uma gota por poço, de 5ml obtidos de uma cultura nas condições anteriores, e deixou-se incubar a 37°C com 5% de CO₂. Após cerca de 2 dias as células encontravam-se a 80% de confluência e prontas a serem infectadas.

3.5.3. Preparação do inóculo usado para a infecção celular

Para a infecção de macrófagos, do inóculo 10×10^8 UFC/ml lavado duas vezes em PBS, foi preparado um inóculo com 10×10^6 UFC/ml em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino. O inóculo foi posto durante alguns minutos num banho de ultra-sons para garantir a dispersão dos bacilos e evitar a formação de agregados.

Os possíveis aglomerados de micobactérias foram desfeitos passando as células por uma seringa de agulha fina, de forma a garantir a fagocitose individual de cada bacilo.

3.5.4. Infecção dos macrófagos de ratinho J774A.1

Os macrófagos com cerca de 80% de confluência foram infectados um inóculo micobacteriano cuja concentração permitiu obter uma multiplicidade de infecção (moi_multiplicity of infection) de 10:1 (bacilos /macrófago).

3.5.5. Estudo da actividade antimicobacteriana dos vários compostos em macrófagos infectados

Os macrófagos a 80% de confluência foram infectados com uma moi de 10:1 por contacto de 3 horas para garantir a internalização dos bacilos. Para eliminar os bacilos não fagocitados, retirou-se o meio DMEM e lavaram-se os poços com PBS por 3 vezes. Para recuperar as micobactérias que sobreviveram intracelularmente, lisaram-se os macrófagos infectados de um dos poços com uma solução de Igepal a 1% (Sigma-Aldrich) em água e por fim fez-se o plaqueamento de várias diluições em água destilada estéril desse lisado. As diluições foram preparadas numa placa de 96 poços pelo método das diluições seriadas e as aplicações em meio sólido foram efectuadas em duplicado. A contagem das UFC foi avaliada após incubação a 37°C em meio 7H10 suplementado

Nos restantes poços fez-se a substituição do meio por meio com o composto a estudar. Assim, em cada caixa de cultura de tecidos de 24 poços analisaram-se várias concentrações dos compostos.

Nos ensaios com macrófagos infectados com *M. avium* 44156 e *M. avium* 44157 o procedimento foi realizado da mesma forma que o descrito anteriormente, mas para a infecção das células usou-se uma concentração final micobacteriana de 10^3 bacilos/ml e o tempo de internalização dos bacilos foi de 12 horas. Estas condições foram as estabelecidas para se poder efectuar os ensaios forma a garantir uma moi que permitisse notar diferenças aquando da avaliação final das UFC. Aos dias 4 e 6 de infecção o meio foi substituído por novo meio mas mantendo as mesmas concentrações dos compostos a testar.

Para o estudo da actividade antimicobacteriana dos vários compostos na sua forma encapsulada em lipossomas em macrófagos infectados, prepararam-se suspensões lipossomais estéreis, e realizou-se o estudo da actividade antimicobacteriana seguindo o

procedimento efectuado com os compostos na forma livre. Nas placas de 24 poços, as quantidades de suspensões lipossomais foram as correspondentes às quantidades de composto encapsulado, igual à concentração considerada como CMI.

Também o estudo da actividade antimicobacteriana dos AINEs em macrófagos infectados foi realizado da mesma forma que os anteriores.

No estudo de infecção celular com *M. smegmatis* mc² 155, o tempo de fagocitose foi de uma hora, e visto esta ser uma estirpe de crescimento rápido e de eliminação rápida, a infecção foi seguida durante 24 horas.

Para o estudo das infecções com *M. tb.* usou-se um inóculo de infecção nas células de 10⁶ bacilos/ml. E o tempo de internalização foi de três horas. Aos dias 4 e 6 de infecção o meio foi substituído por novo meio mas mantendo as mesmas concentrações dos compostos a testar.

3.6. Estudo da actividade antimicobacteriana da associação do Pró-fármaco C12 com os AINEs em macrófagos infectados com *M. tb.* H37Rv

Para este ensaio usou-se o pró-fármaco C12 por se considerar o mais representativo de todos os pró-fármacos estudados.

Seguiu-se o mesmo procedimento dos ensaios com macrófagos infectados, mas para este usou-se um inóculo de infecção nas células de 10⁵ bacilos/ml, que foi o valor que permitiu acompanhar a evolução da infecção por contagem de UFC. E o tempo de internalização foi de três horas. Aos dias 4 e 6 de infecção o meio foi substituído por novo meio mas mantendo as mesmas concentrações dos compostos a testar.

3.7. Análise estatística

Os resultados apresentados são as médias de pelo menos três experiências independentes.

Para os dados com uma distribuição normal, a comparação entre grupos foi feita através do teste t de *student*. Os valores de $p < 0.05(*)$ e $< 0.01(**)$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

4.1. Avaliação da estabilidade dos pró-fármacos

4.1.1. Estabilidade química dos pró-fármacos isolados

A estabilidade química dos pró-fármacos na sua forma livre foi estudada em PBS contendo 20% de ACN (v/v). Dos valores obtidos nos cromatogramas elaboraram-se gráficos, tal como para o exemplo apresentado no Anexo III, para determinar o tempo de meia-vida dos compostos, e os resultados obtidos foram os apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Valores de k e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) determinados para os compostos C12 e C14 isolados, em PBS com ACN a 20%.

Composto	k (h^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)
C12	0.0050	0.9993	8316
C14	0.0052	0.9622	7996

Para o composto C16 não se notou degradação. Assim, os tempos de meia-vida só puderam ser determinados para os compostos C12 e C14, concluindo-se que o pró-fármaco C16 é estável em PBS. Mesmo os pró-fármacos C12 e C14 têm uma elevada estabilidade química, de aproximadamente 6 dias, o que permite garantir que do ponto de vista químico, uma resistência suficiente para a elaboração dos ensaios de determinação de actividade, não sendo os resultados influenciados por falta de estabilidade química.

4.1.2. Estabilidade enzimática dos pró-fármacos isolados

Tal como no ponto 4.1.1, com a linearização dos valores obtidos nos cromatogramas, determinaram-se os valores de k e os respectivos tempos de meia-vida para os vários ésteres em plasma.

Tabela 4 - Valores de k e tempos de meia-vida para os fármacos C12, C14 e C16 isolados, em plasma.

Composto	k (min^{-1})	r^2	$t_{1/2}$ (min)	$t_{1/2}$ médio (min)
C12	0.0431	0.9763	16	15
	0.0498	0.9974	14	
C14	0.0359	0.9832	19	19
C16	0.0084	0.9698	83	68
	0.0094	0.7510	74	
	0.0151	0.9701	46	

Dos valores obtidos, foi possível estabelecer uma relação entre o número de carbonos do composto e os seus tempos de meia-vida em plasma, pois estes aumentaram à medida que aumentou a cadeia de carbonos dos pró-fármacos.

No estudo da estabilidade dos fármacos isolados em homogenato total (HT) obtiveram-se os seguintes resultados:

Tabela 5 - Valores de k e tempos de meia-vida para os fármacos C12, C14 e C16 isolados, em HT.

Composto	k (min⁻¹)	r²	t ½ (min)	t ½ médio (min)
C12	0.6545	0.9350	1	2
	0.2759	0.9537	3	
C14	0.7502	0.9959	1	4
	0.0951	0.9783	7	
C16	0.0481	0.9276	14	21
	0.0255	0.7712	27	

Também nestes estudos de estabilidade em HT foi possível notar a relação entre o número de carbonos dos compostos e os tempos de meia-vida, e confirmou-se que estes aumentaram à medida que aumentou a cadeia de carbonos dos compostos.

4.2. Avaliação da estabilidade das suspensões lipossomais com os pró-fármacos encapsulados

4.2.1. Capacidade de encapsulação das suspensões lipossomais

As eficácias de encapsulação (EEs) foram determinadas de acordo com o procedimento experimental. E, visto numa fase inicial se ter verificado que todos os compostos apresentavam a mesma tendência de resultados, estes ensaios foram efectuados apenas com o pró-fármaco C12.

Tabela 6 - Valores de EE obtidos nas várias suspensões lipossomais.

Formulação	Razão	C12	EE
lipídica	lípidio/fármaco	(μmol)	(%)
DPPC	20:1	1	44 ($\pm$ 35,84)
	10:1	2	93 ($\pm$ 7,79)
	4:1	5	97
DMPC	20:1	1	96
	10:1	2	95 ($\pm$ 5,60)
	4:1	5	97
DMPC:DMPG (7:3)	20:1	1	76
	10:1	2	83 ($\pm$ 6,90)
	4:1	5	71
DMPC:DMPG (9:1)	20:1	1	83
	10:1	2	87 ($\pm$ 9,88)
	4:1	5	79
DPPC:DPPG (7:3)	10:1	2	90
DPPC:DPPG (9:1)	10:1	2	87

NOTA: Para os valores de EE apresentados referentes a duas suspensões lipossomais, é apresentada a EE média. Para os valores de EE referentes a 3 ou 4 suspensões lipossomais é apresentada a EE média e o respectivo desvio-padrão.

Para as suspensões formadas com o lípido DPPC obtiveram-se valores menores de EE quando comparados com os valores das suspensões formadas com DMPC; mas em ambos os casos, os valores de EE foram superiores aos obtidos nas suspensões com mistura de lípidos, para as quais as misturas com DPPC e DPPG obtiveram maiores valores de EE.

Os valores de EE obtidos permitiram notar que para a razão de lípido/fármaco 1:10, não existiram grandes variações de valores nas diferentes formulações lipídicas, como se pode notar pela análise da tabela 6, tendo por isso sido esta a formulação escolhida para a continuação dos estudos.

Avaliou-se a estabilidade dos lipossomas ao longo do tempo, e em todos os casos obteve-se um resultado similar ao apresentado na figura 8, em que se analisou uma suspensão com a razão lípido/fármaco de 10:1, sendo o lípido usado o DPPC e o composto o C12 (2 μ mol).

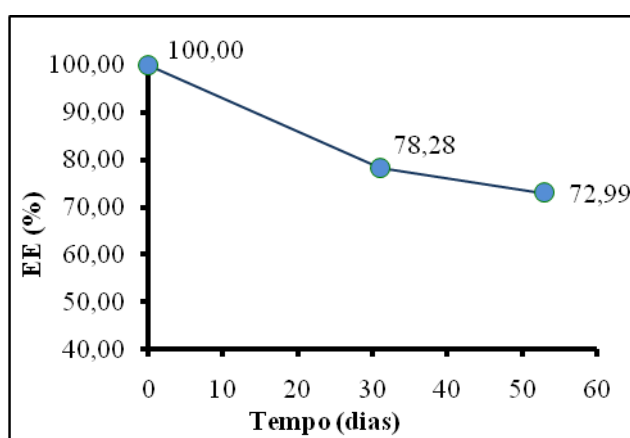


Figura 8 - Variação da EE ao longo do tempo para uma suspensão lipossomal com DPPC.

Embora se tenha notado um decréscimo nos valores de EE ao longo do tempo, os intervalos de variação foram pequenos, eles mantiveram uma estabilidade suficiente para garantir o uso das suspensões nos estudos posteriores mesmo após algum tempo da sua preparação, pois o decréscimo observado foi aceitável.

4.2.2. Estabilidade enzimática dos pró-fármacos encapsulados em lipossomas

Tal como descrito no estudo da estabilidade dos fármacos isolados, o tempo de meia-vida foi calculado pela expressão: $t_{1/2} = 0.693/k$. Os resultados obtidos neste estudo para as várias formulações lipídicas usadas com o composto C12 em plasma, foram os apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Valores de k e tempos de meia-vida determinados para as reacções de C12 sob a forma encapsulada, em plasma.

Formulação da suspensão lipossomal	k (h⁻¹)	r²	t ½ (min)	t ½ médio (min)
DPPC	0.5685	0.9406	73	73
DMPC	0.5030	0.9637	83	
	0.6201	0.9704	67	78
	0.5038	0.9467	83	
DMPC:DMPG	0.5956	0.9633	70	
(9:1)	0.3649	0.8770	114	83
	0.6538	0.9047	64	
DMPC:DMPG	0.7969	0.9185	52	
(7:3)	0.5942	0.9454	70	60
	0.7114	0.9177	58	
DPPC:DPPG (9:1)	0.6867	0.9044	61	61
DPPC:DPPG (7:3)	0.7380	0.9065	56	56

De acordo com os valores obtidos, a formulação lipídica que apresentou uma maior estabilidade em plasma foi a formulação DMPC: DMPG (9:1). As misturas de DPPC e DPPG foram as formulações que apresentaram menores valores de t ½.

Foram também preparadas suspensões lipossomais com os ésteres C14 e C16, que apresentaram em plasma os valores de estabilidade descritos na tabela 8.

Tabela 8 - Valores de k e tempos de meia-vida determinados para as reacções de C14 e C16 sob a forma encapsulada, em plasma.

Composto encapsulado	Formulação da suspensão lipossomal	k (h ⁻¹)	r ²	t ½ (min)
C14	DPPC	0.0800	0.9604	520
	DMPC	0.2629	0.9162	158
	DMPC:DMPG (9:1)	0.3567	0.9322	116
C16	DPPC	0.1479	0.9191	281
	DMPC	0.1944	0.9104	214
	DMPC:DMPG (9:1)	0.1122	0.9520	371

Obtiveram-se valores de $t_{1/2}$ muito superiores aos obtidos no estudo relativo ao composto C12 sob a forma encapsulada. Mas neste estudo, a formulação lipídica que apresentou uma maior estabilidade foi a das vesículas preparadas apenas com DPPC. E, ao comparar a estabilidade dos mesmos compostos sob a forma livre, confirmou-se o esperado, de que a encapsulação dos compostos em lipossomas protege os compostos da degradação enzimática, pois os tempos de meia-vida para os compostos na forma livre foram de alguns minutos e sob a forma encapsulada foram de uma a várias horas.

No estudo da estabilidade em HT, para os fármacos encapsulados, obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Valores de k e tempos de meia-vida determinados para as reacções dos ésteres sob a forma encapsulada em HT.

Composto encapsulado	Formulação da suspensão lipossomal	k (h ⁻¹)	r ²	t ½ (min)
C12	DPPC	0.0056	0.9787	124
	DMPC	0.0129	0.9782	54
	DMPC:DMPG (9:1)	0.0095	0.9853	73
C14	DPPC	0.0019	0.8309	365
	DMPC	0.0041	0.9699	169
	DMPC:DMPG (9:1)	0.0038	0.9605	182
C16	DPPC	0.0007	0.7579	990
	DMPC	0.0009	0.9217	770
	DMPC:DMPG (9:1)	0.0016	0.9280	433

As formulações que apresentaram menor estabilidade foram as formulações constituídas apenas pelo lípido DMPC e as que apresentaram maior estabilidade foram as formulações constituídas por DPPC. Também nestes foi possível notar que quanto maior a cadeia carbonada dos compostos encapsulados, maiores são os valores de t ½ observados e portanto maior a estabilidade.

Para todos os estudos de estabilidade efectuados para os compostos sob a forma encapsulada, foi possível notar que as formulações mais estáveis, as que apresentam maiores valores de t ½ são as formulações de apenas um lípido, o DPPC.

Para todos os compostos ficou esclarecido que a sua encapsulação em lipossomas os torna mais estáveis enzimaticamente.

4.3. Actividade dos pró-fármacos: pirazinoato de dodecanoílo (C12), pirazinoato de tetradodecanoílo (C14) e pirazinoato de hexadecanoílo (C16)

4.3.1. Concentrações mínimas inibitórias

Para a determinação das CMI's efectuaram-se os estudos conforme descritos no procedimento experimental em caldo myco a pH 5,9 (46) para a estirpe *M. tb.* H37rv, e os resultados obtidos foram os apresentados nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Valores de CMI's dos pró-fármacos, POA e PZA, determinados *in vitro* contra a estirpe *M. tb.* H37rv, sensível à PZA.

Composto	CMI (µg/ml)
POA	100-200
PZA	20-40
C12	20-40
C14	10-20
C16	20-40

Da mesma forma que nos ensaios anteriores, determinaram-se as CMI's dos pró-fármacos em estirpes resistentes à PZA, e obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 11.

Tabela 11 - Valores de CMIs dos pró-fármacos (pirazinoato de dodecanoílo (C12), pirazinoato de tetradodecanoílo (C14) e pirazinoato de hexadecanoílo (C16)), POA e PZA, determinados *in vitro* contra várias estirpes resistentes à PZA.

Estirpe:	CMI (µg/ml)				
	C12	C14	C16	PZA	POA
<i>M. avium</i> DZMC 44156	20	20	> 40	> 1000	> 1000
<i>M. avium</i> DZMC 44157	10	10	> 40	> 1000	> 1000
<i>M. tuberculosis</i> PZAR1	40	40	> 40	> 200	> 1000
<i>M. tuberculosis</i> PZAR2	20	20	> 40	> 1000	> 1000
<i>M. bovis</i>	40	40	> 40	> 1000	> 1000
<i>M. bovis</i> BCG	20	20	> 40	> 1000	> 1000

Os resultados obtidos foram confirmados pelo método do sistema BACTEC MGIT 960, não apresentando diferenças significativas.

Tal como esperado, os resultados de CMIs para a PZA estiveram de acordo com a literatura (59). Quando comparados os valores das CMIs da PZA e do POA para uma estirpe *M. tb.* susceptível à PZA, com os valores de CMIs obtidos na mesma estirpe com os pró-fármacos, os últimos foram em média dez vezes inferiores. Em estirpes resistentes à PZA, os valores de CMIs para a PZA foram superiores a 1000 µg/ml para todas as estirpes testadas confirmando a sua resistência, enquanto que os valores de CMIs para os pró-fármacos variam entre 20 e 40 µg/ml demonstrando a elevada actividade dos compostos. O composto C16 apresentou um valor de CMI ligeiramente superior aos de C12 e C14, sendo mesmo assim consideravelmente activo.

4.3.2. Actividade dos pró-fármacos em macrófagos infectados

Uma vez que *M. tb.* é um patógeno intracelular que infecta principalmente macrófagos, estas células fagocíticas foram escolhidas para ensaios com estirpes micobacterianas. Foi escolhida a linha celular de macrófagos de ratinho J774A.1, por ser uma das linhas celulares que tem sido usada pelo grupo e que mostrou ser um bom modelo para o estudo de interacção patógeno-hospedeiro (46, 59).

Avaliou-se a actividade antimicobacteriana dos vários compostos em *M. tb.* H37Rv. Para os ensaios iniciais estudaram-se concentrações inferiores, iguais e superiores às determinadas como CMIs nos ensaios *in vitro*, num intervalo de 10-200 µg/ml. Os valores de CMIs para os ensaios *ex vivo* foram de 100 µg/ml para o POA e PZA e de 20 µg/ml para os pró-fármacos C12, C14 e C16 confirmando os dados obtidos *in vitro*. Concentrações inferiores demonstraram-se ineficazes quando testadas em macrófagos infectados. A figura 9 apresenta os valores das UFC obtidos a partir de macrófagos infectados e tratados com os pró-fármacos nas concentrações seleccionadas.

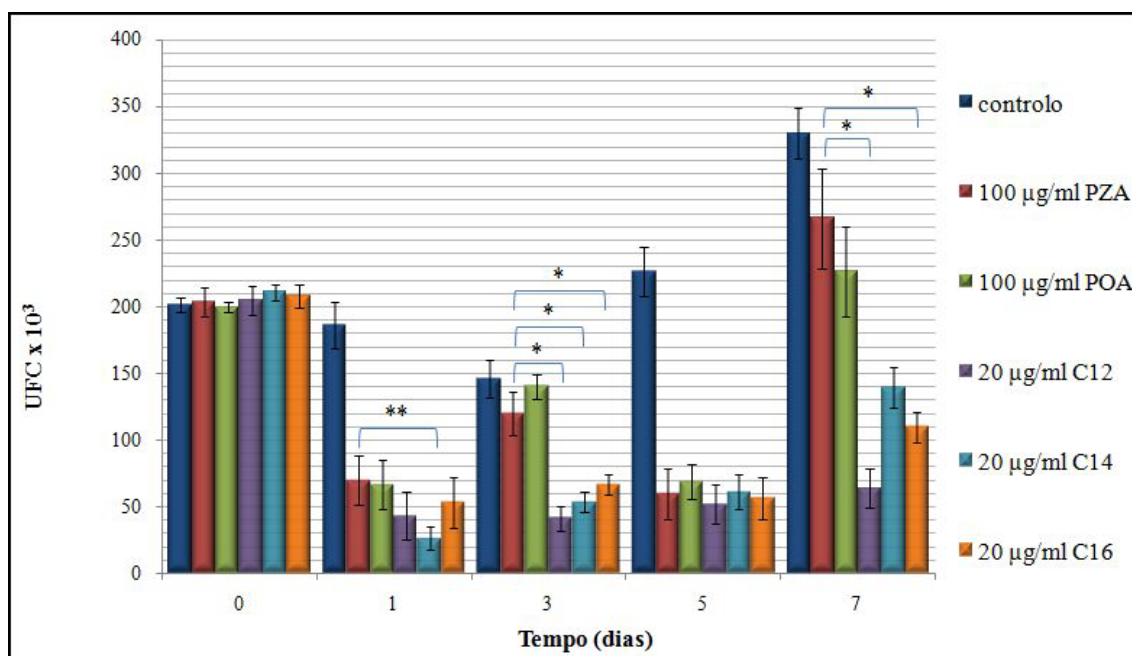


Figura 9 – Comparação do efeito dos vários compostos na sobrevivência intracelular de *M. tb.*, (valores de $p < 0.05(*)$ e $< 0.01(**)$).

Um dia após a infecção, todos os compostos apresentaram actividade contra o *M. tb.*, tendo os pró-fármacos uma actividade cerca de cinco vezes superior quando comparada com a actividade da PZA e POA.

A PZA e POA apresentaram-se relativamente activos aos dias um e cinco, mas deixaram de ter efeito anti-micobacteriano ao sétimo dia. Contrariamente, os pró-fármacos mantiveram a sua actividade durante todo o tempo do ensaio (figura 9). O éster C12, demonstrou ser o fármaco mais activo contra a estirpe *M. tb.*.

4.3.2.1 Actividade dos compostos em macrófagos infectados com *M. avium*

O *M. avium* é naturalmente resistente à maioria dos antibióticos, incluindo a PZA (69). Em oposição ao *M. tb.* onde a resistência é devida maioritariamente a mutações no gene *pncA*, o *M. avium* tem uma elevada actividade de PZase e a sua resistência natural deve-se provavelmente a um eficiente mecanismo de efluxo. Estudou-se a actividade antimicobacteriana dos vários compostos em *M. avium* e compararam-se os resultados com a acção do POA e da PZA. Confirmou-se que o mesmo é resistente à PZA e ao POA e dos três compostos o que apresentou maior actividade contra esta espécie foi o C12.

Como o composto C12 demonstrou ser o mais activo contra esta espécie, foi o composto que seleccionámos para testar o seu efeito contra duas estirpes diferentes de *M. avium*, *M. avium* DZMC 44157 e *M. avium* DZMC 44156.

Ambas as estirpes são sensíveis a concentrações de 5 µg/ml e 10 µg/ml de C12. Para a concentração de 10 µg/ml o efeito foi superior a 0,5 log em relação ao controlo ao fim de sete dias de infecção (figura 10, **I.** e **II.**). Com concentrações de PZA e POA de 100 µg/ml obtiveram-se resultados semelhantes aos obtidos para as concentrações de 5 µg/ml (resultados não apresentados).

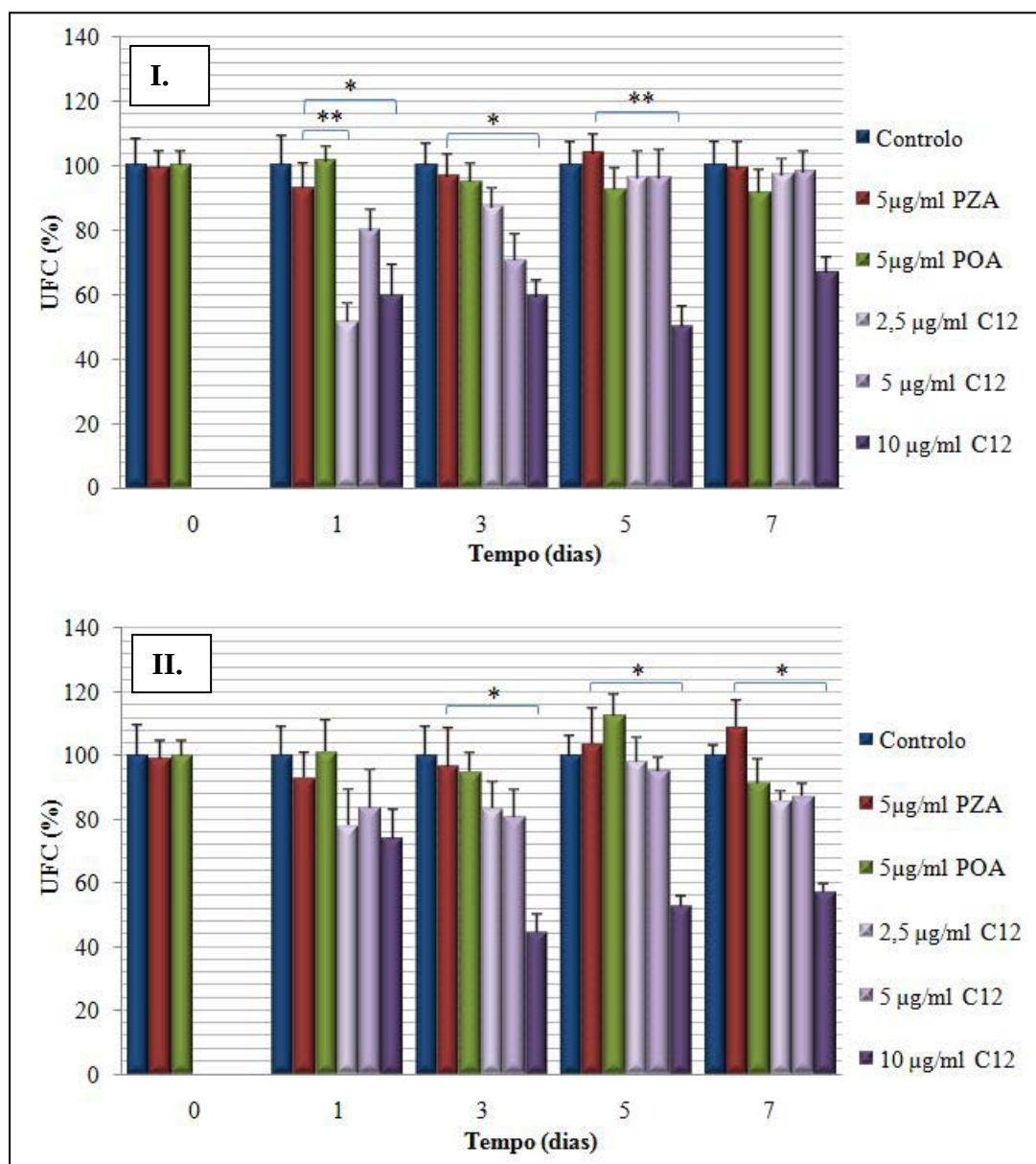


Figura 10 – Efeito do éster C12 na sobrevivência intracelular de *M. avium* DZMC 44157 (I.) e *M. avium* DZMC 44156 (II.) (valores de $p < 0.05(*)$ e $< 0.01(**)$).

4.3.3. Actividade antimicobacteriana dos vários compostos na sua forma encapsulada em lipossomas

Para este estudo usaram-se suspensões lipossomais preparadas com DPPC, pois em estudos anteriores não se observou diferença significativa entre suspensões preparadas com DPPC ou DMPC. Como controlo usaram-se células infectadas sem qualquer tratamento, e células infectadas tratadas com POA e PZA.

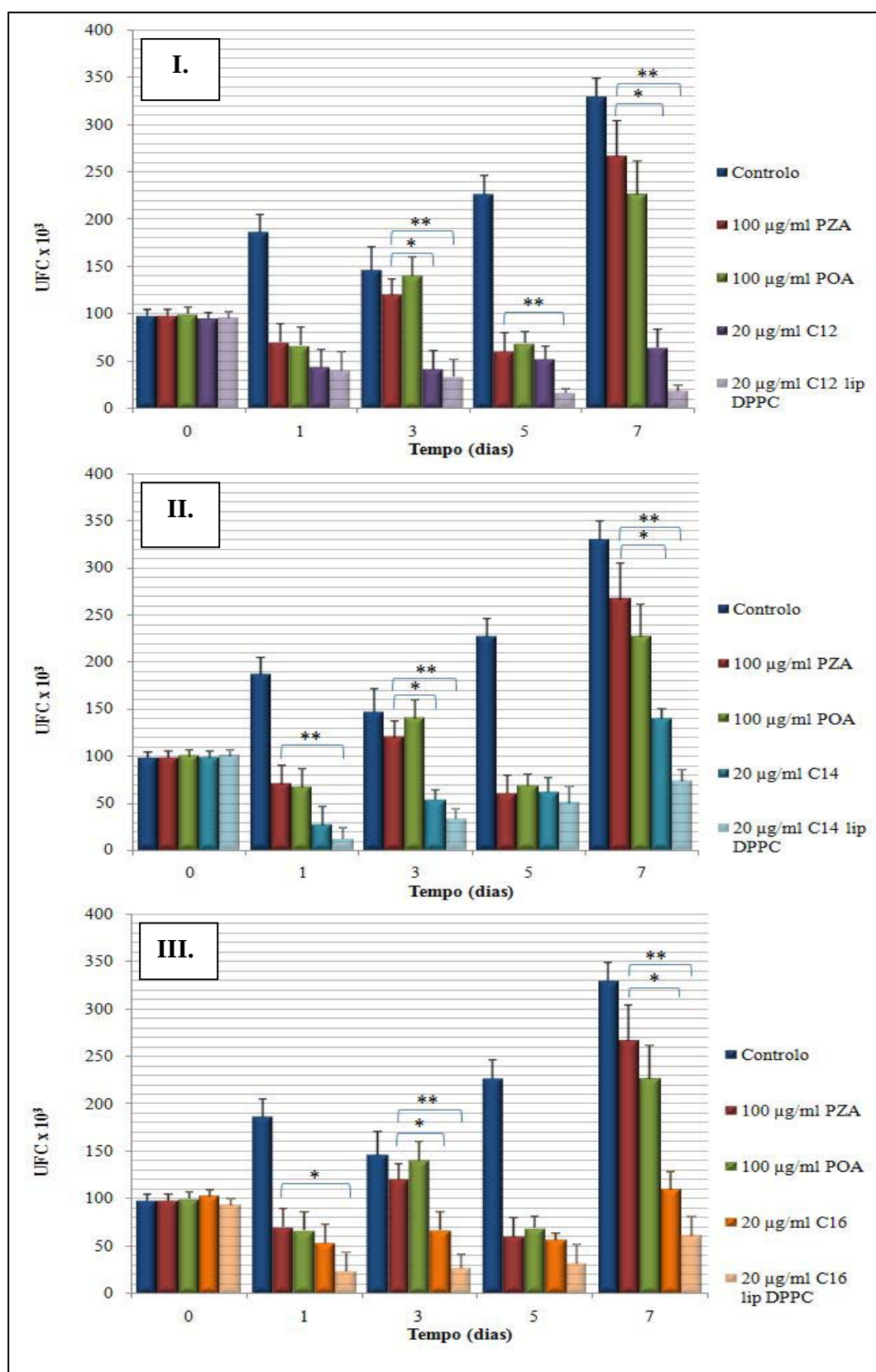


Figura 11 – Comparação do efeito dos pró-fármacos C12 (I.), C14 (II.) e C16 (III.) sob as formas livres e encapsuladas na sobrevivência intracelular de *M. tb.* H37Rv (valores de $p < 0.05$ (*) e < 0.01 (**)).

Todos os compostos apresentaram maior actividade em *M. tb.* quando comparados com as moléculas de referência POA e PZA, quer na sua forma livre quer na encapsulada. O composto C12 foi o pró-fármaco que apresentou maior actividade.

A encapsulação dos compostos em lipossomas aumentou o efeito bactericida em macrófagos em cerca de 50% quando comparado com a forma livre correspondente do composto (figura 11).

4.4. Acção dos AINEs

4.4.1 Acção dos AINEs em *M. smegmatis* e em *M. tb.* H37Rv

Determinou-se a CMI dos AINEs pelo método descrito anteriormente. Os valores obtidos para *M. smegmatis* mc² 155 e *M. tb.* H37Rv encontram-se na tabela 12. Estes foram considerados como os valores em que houve uma diminuição nítida da turvação do meio de cultura inoculado.

Tabela 12 - Valores de CMIs obtidos para todos os compostos em estudo.

AINE	CMI
Ibuprofeno	100 µM
ASA	10 mM
Vioxx	100 µM

Na figura 12 apresentam-se os resultados obtidos em percentagem de UFC.

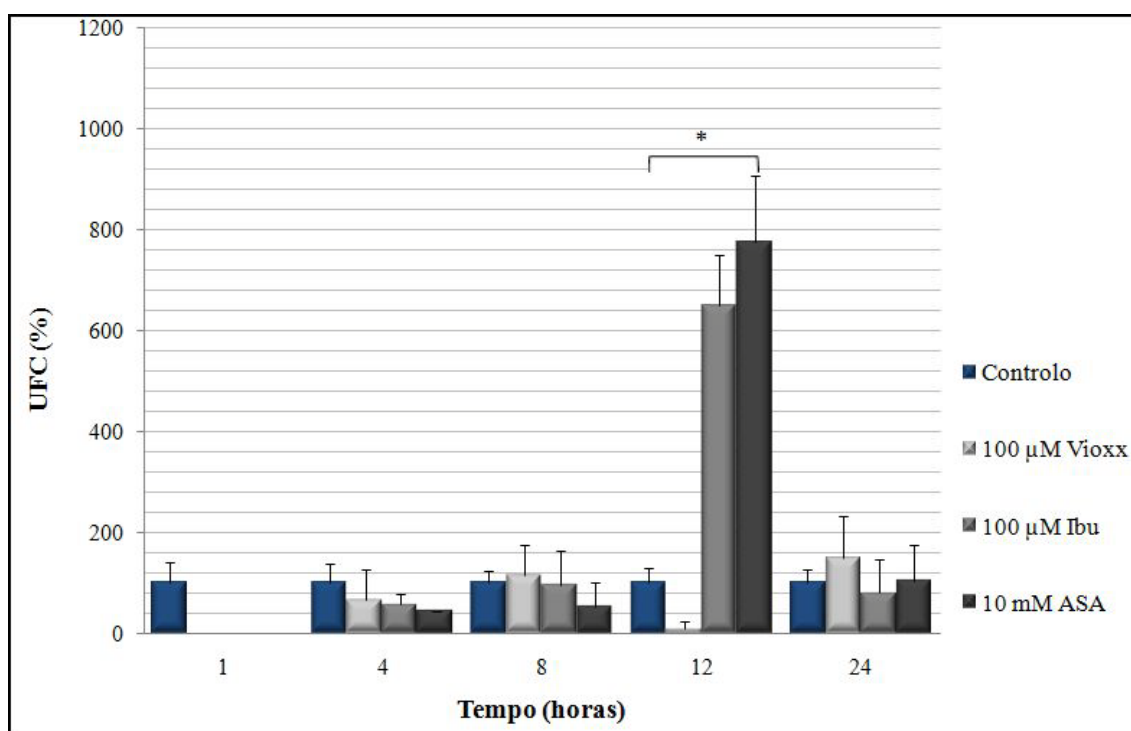


Figura 12 – Efeito da presença de AINEs na sobrevivência intracelular de *M. smegmatis*, (valores de $p < 0.05(*)$ e $< 0.01(**)$).

O tratamento com ibuprofeno e ASA em macrófagos infectados por *M. smegmatis*, originou um efeito facilitador da sobrevivência das bactérias intracelulares, estatisticamente significativo, 12 horas pós infecção. Não se observou qualquer efeito do rofecoxib ou vioxx.

Como as bactérias se encontram em compartimentos intracelulares, e não se pode prever a concentração real do composto que chega ao compartimento celular que será activa, testou-se o efeito de diferentes concentrações de cada AINE durante a infecção pelo *M. tb*. (Figura 13), uma correspondendo à CMI *in vitro*, sendo as outras dez a cem vezes menos concentradas.

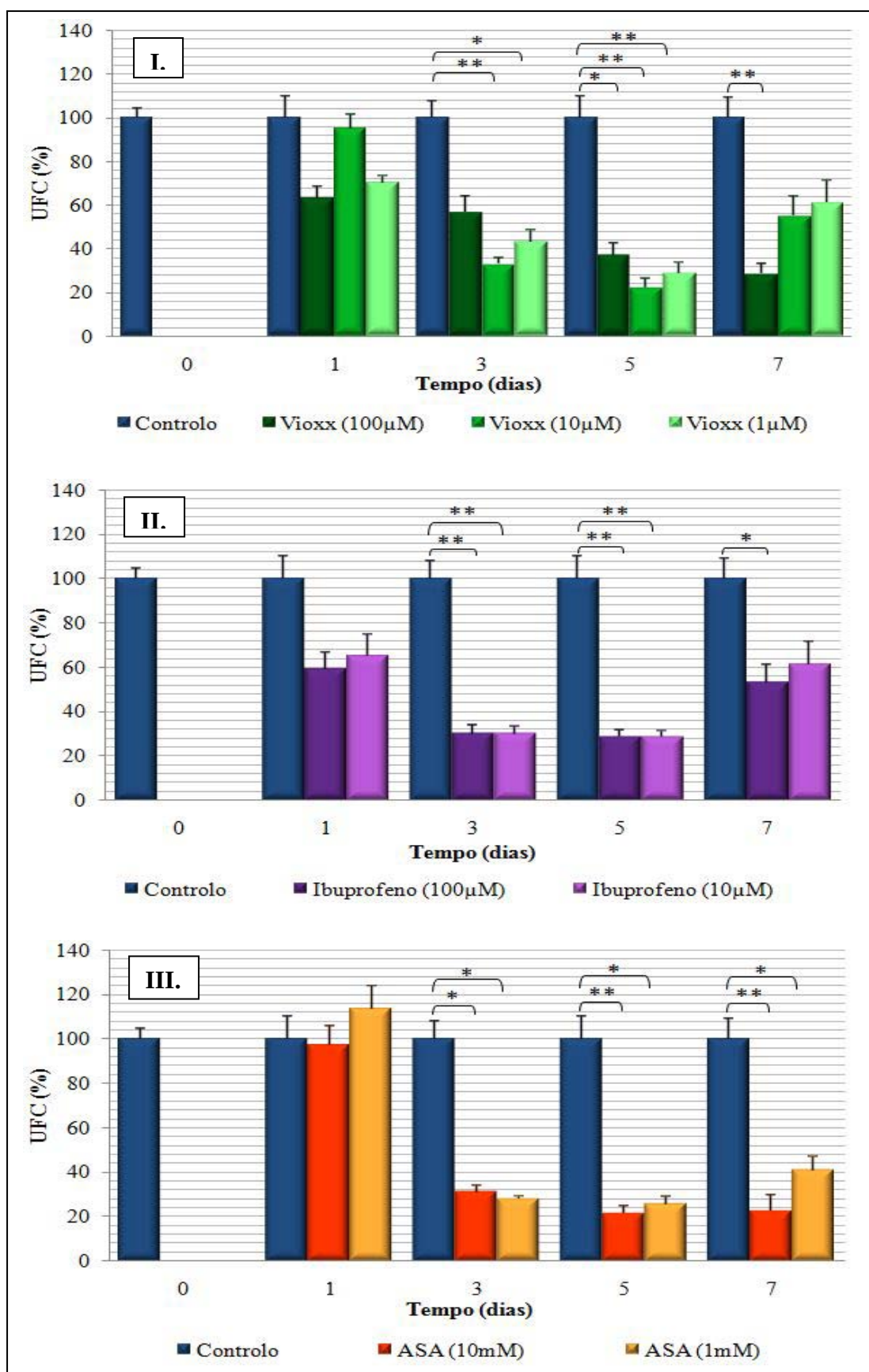


Figura 13 – Efeito da presença de AINEs, vioxx (I.), ibuprofeno (II.) e aspirina (III.) na sobrevivência intracelular de *M. tb.* H37Rv, (valores de $p < 0.05$ (*) e < 0.01 (**)).

Os resultados obtidos mostraram, que todos os AINEs apresentaram actividade anti-micobacteriana em qualquer das concentrações testadas *ex vivo*, isto é, observou-se um efeito de morte intracelular a partir do terceiro dia de infecção pelo *M. tb.* em macrófagos tratados com qualquer dos compostos. Não se detectou em nenhum dos tempos pós-infecção uma tendência para facilitar a sobrevivência intracelular do *M. tb.*.

4.5. Efeito combinado dos AINEs com os pró-fármacos na sobrevivência intracelular micobacteriana

Uma vez que existem evidências de que a associação de compostos pode modular a infecção micobacteriana, e visto existirem estudos com a associação de alguns fármacos com a PZA, testaram-se os pró-fármacos associados com os AINEs.

4.5.1. Acção antimicobacteriana do efeito combinado em *M. tb.* H37Rv

Neste ensaio usou-se o pró-fármaco C12 (figura 15) por ser o mais representativo, e para comparação realizou-se o mesmo ensaio com PZA (figura 14).

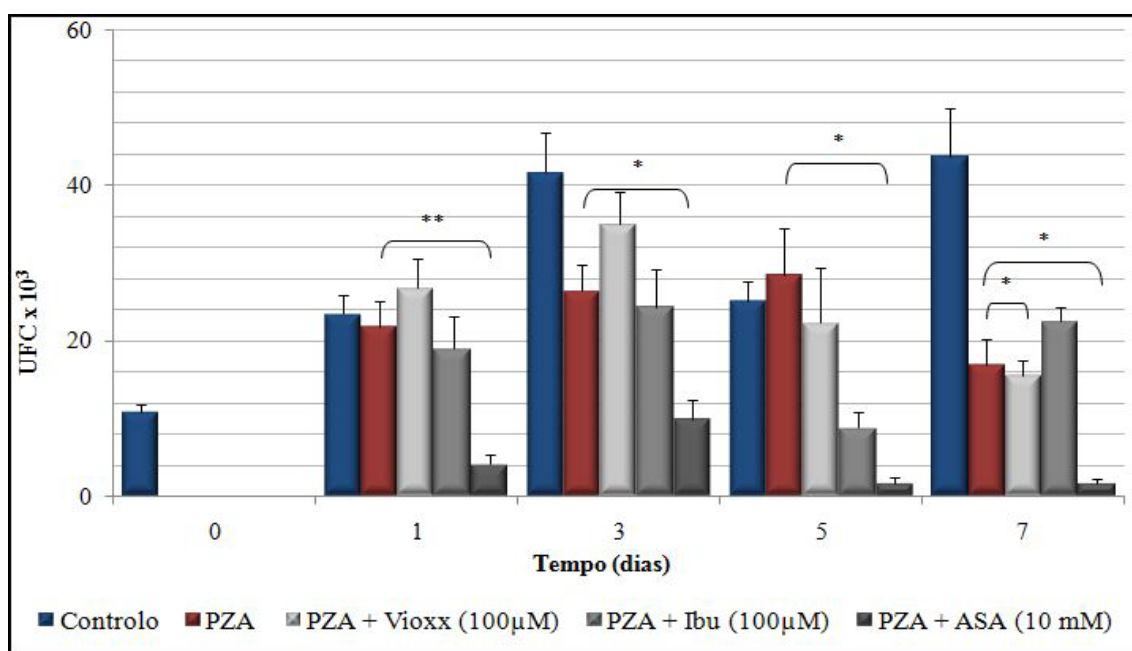


Figura 14 - Efeito da presença de PZA combinada com AINEs na sobrevivência intracelular de *M. tb.* H37Rv, (valores de $p < 0.05$ (*) e < 0.01 (**)).

A ASA potenciou o efeito da PZA de uma forma muito mais significativa que os outros AINEs. Em contrapartida, o viox não demonstrou apresentar grande efeito potenciador, podendo indicar que a COX-2 não é a enzima envolvida neste processo de potenciação, uma vez que o viox é um inibidor específico para a COX-2 e os outros AINEs têm outros mecanismos de acção.

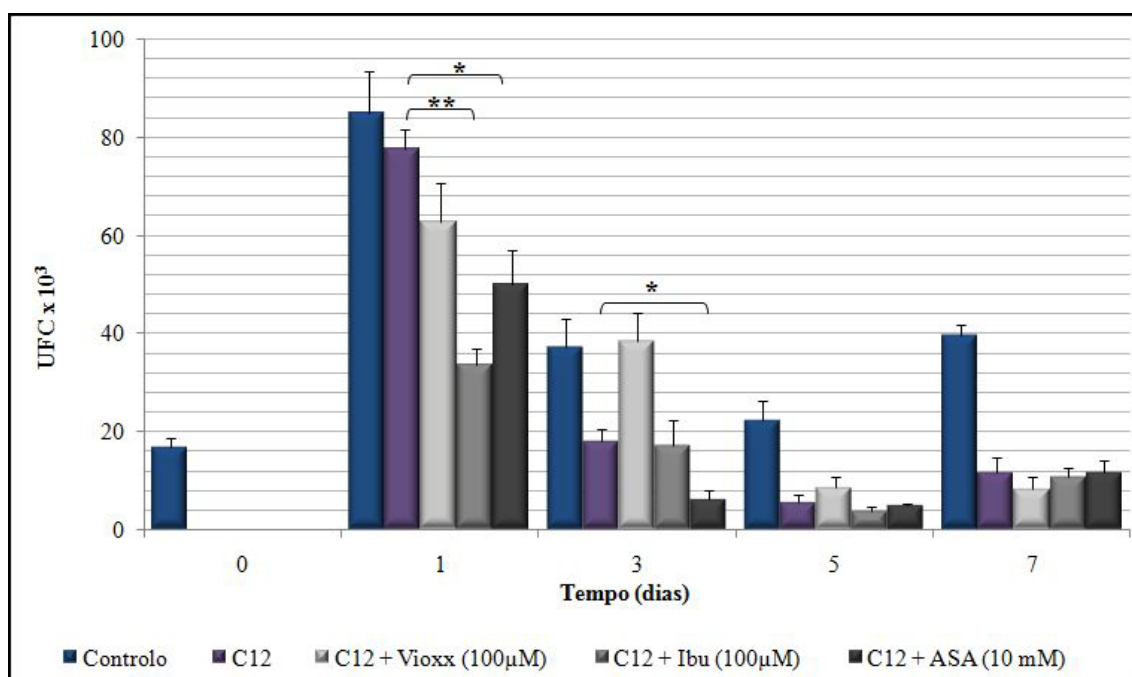


Figura 15 - Efeito do éster C12 combinado com os AINEs na sobrevivência intracelular de *M. tb.* H37Rv, (valores de $p < 0.05$ (*) e < 0.01 (**)).

Com o C12 os resultados mostram a mesma potenciação da actividade antimicrobacteriana quando este é associada à ASA. A combinação com o ibuprofeno apenas potencia a actividade do C12 ao fim do primeiro dia de infecção. Enquanto que com o viox o efeito é antagonista, mostrando uma tendência para reduzir o efeito do C12 aos dias três e cinco de infecção (figura 15).

Discussão e perspectivas

5.1. Discussão

Neste trabalho estudaram-se três novos pró-fármacos derivados da PZA, pirazinoato de dodecanoílo (C12), pirazinoato de tetradodecanoílo (C14) e pirazinoato de hexadecanoílo (C16) que apresentaram uma baixa estabilidade em plasma, tendo sido o éster C16 o mais estável. Em homogenato total de fígado de ratinho (HT) os pró-fármacos apresentaram uma estabilidade inferior quando comparada com a estabilidade em plasma, continuando o composto C16 a ser o mais estável. De uma forma geral a estabilidade enzimática foi baixa, com tempos de meia-vida na ordem dos minutos. Quanto à estabilidade química, estudada nos ensaios em PBS com ACN a 20 %, esta foi muito elevada para todos os pró-fármacos, com tempos de meia-vida de cerca de 5 dias e meio (5,775 dias para o C12 e 5,553 dias para o C14); principalmente para o C16 para o qual foi impossível determinar um valor de $t_{1/2}$, visto não se ter detectado degradação do composto. No entanto, verificou-se que quanto maior a cadeia carbonada dos ésteres sintetizados, maior a estabilidade dos compostos. De acordo com a bibliografia, a procura de novos fármacos derivados da PZA, ésteres inclusive, não é recente, mas a

difficuldade comum nestes compostos tem sido obter estabilidades que justifiquem a continuidade dos estudos (30, 82). De forma a aumentar a estabilidade, optou-se pela inclusão dos compostos em vesículas lipossomais.

Após encapsulação dos pró-fármacos em lipossomas, analisaram-se as EEs dos mesmos de forma a escolher uma formulação que permitisse continuar os ensaios. Os lipossomas preparados apenas com DPPC ou DMPC, apresentaram um maior valor de EE quando comparados com os lipossomas preparados com mistura de lípidos. No estudo da estabilidade dos compostos na forma encapsulada, foi possível observar que em plasma, as suspensões lipossomais preparadas com DPPC apresentaram maiores valores de $t_{1/2}$, sendo mais estáveis. A estabilidade destas suspensões preparadas com DPPC foi ainda superior em HT. Em todos os casos, verificou-se a mesma relação dos valores de $t_{1/2}$ com o tamanho da cadeia carbonada dos ésteres. Quanto maior a cadeia, maior a estabilidade das suspensões lipossomais.

Nos estudos *in vitro*, os valores de CMIs obtidos para os pró-fármacos foram cerca de cinco vezes inferiores aos valores obtidos para a PZA e POA, para a estirpe *M. tb.* susceptível à PZA. Quando testados em macrófagos infectados com *M. tb.* apresentaram um efeito anti-micobacteriano superior, mais regular e constante que a PZA e o POA.

O facto de os ensaios *in vitro* terem sido realizados a pH 5,9 deveu-se a este valor ser muito aproximado de pH 6,4 (64) que se sabe ser o valor de acidez existente nos fagossomas de *M. tb.* e outras micobactérias.

Todas as estirpes com resistência natural ou adquirida à PZA apresentaram valores de CMI superiores a 1000 µg/ml, e quando testados os pró-fármacos, estes demonstraram ser activos nestas estirpes para CMIs compreendidas entre 10 a 40 µg/ml.

Notou-se que para *M. avium*, naturalmente resistente à PZA, ambas as estirpes testadas demonstraram ser muito susceptíveis aos pró-fármacos, mas resistentes ao POA. Se neste caso, a resistência à PZA é devida a mecanismos de efluxo, então também se deveria notar resistência aos pró-fármacos, mas contrariamente, estes demonstraram ser mais activos quando estudados em bacilos intracelulares nos estudos *ex vivo*, do que nos ensaios *in vitro*, sendo por isso uma possibilidade a considerar para estudar a actividade e transporte do POA.

Quando encapsulados em lipossomas, os compostos apresentaram uma maior actividade antimicrobiana contra *M. tb.*, cerca de 50% superior, demonstrando ser

activos em todas as suas formas mas traduzindo-se a sua encapsulação numa aumento de actividade.

Para analisar a resposta inflamatória do hospedeiro perante a infecção micobacteriana, foram também testados três AINEs: ibuprofeno, ASA e viox. Quando estudados *in vitro*, estes apresentaram actividade micobactericida e micobacteriostática. Nos estudos *ex vivo* esperava-se que a ASA apresentasse um efeito facilitador de sobrevivência, devido ao seu papel descrito como precursor de sideróforos em *M. smegmatis* (1), uma vez que facilitando a aquisição intracelular do ferro, facilita o acesso àquele nutriente essencial para a viabilidade bacteriana. Adicionalmente, a ASA bloqueia a nucleação da actina em fagossomas contendo *M. smegmatis* podendo por esta via facilitar a sua sobrevivência em macrófagos. Estes argumentos podem ser aplicados ao mesmo efeito induzido pelo ibuprofeno (6, 60).

Para o viox, não se observou qualquer efeito, o que poderá indicar que a COX-2 não está envolvida no mecanismo de sobrevivência intracelular de *M. smegmatis*. Já o efeito não selectivo da ASA e do ibuprofeno na COX poderá bloquear a libertação de AA das membranas, a sua consequente conversão em PGE₂ e o bloqueio na síntese de AMPc (48). O efeito final seria o aumento da nucleação da actina na membrana do fagossoma com diminuição da sobrevivência intracelular de *M. smegmatis*.

Na infecção de macrófagos pelo *M. tb.*, os fagossomas contendo esta micobactéria estão inibidos na capacidade de nuclear actina (7). Nenhum dos AINEs testados reverteu este bloqueio (60). Em oposição, os AINEs apresentaram um efeito bactericida e bacteriostático *in vitro*, tendência esta confirmada *ex vivo* mesmo em concentrações de dez a cem vezes inferiores à CMI determinada. Quando testados em macrófagos infectados, todos os compostos apresentaram principalmente ao 3º dia de infecção, um efeito anti-micobacteriano. Não está esclarecido o mecanismo de acção, no entanto, estes resultados sugerem um possível benefício da inclusão de AINEs nos esquemas terapêuticos de tratamento micobacterioses, motivo pelo qual se estudou a associação destes com os pró-fármacos derivados da PZA.

Nos ensaios de associação dos compostos, os efeitos bactericidas do pró-fármaco testado (C12) e da PZA foram potenciados. Isto permite especular que a complementação do tratamento da TB com AINEs pode modular favoravelmente a resposta inflamatória.

5.2. Perspectivas

É urgente encontrar novas soluções e melhorar as políticas globais de luta contra a TB, uma doença que já tendo sido tratável e de prevenção acessível é hoje em dia um problema de cada vez mais complicada resolução e contenção. A terapêutica actual continua a basear-se em antibacilares existentes há muitas décadas, e não existem disponíveis novos compostos alternativos para contornar as resistências cada vez mais notificadas. Embora já existam estudos com novos compostos, todos os ensaios que envolvem a sua aprovação para a terapêutica são muito demorados.

Considerando que as taxas de TB resistente, multirresistente e extensivamente resistente têm vindo a aumentar a nível mundial, a linha de investigação deste trabalho apresenta-se bastante promissora, sugerindo alternativas terapêuticas a considerar no tratamento de TB e outras micobacterioses para as quais os fármacos actuais são cada vez menos eficazes.

Bibliografia

- 1 Adilakshmi, T.; Ayling, P.D.; Ratledge, C.. **2000**. Mutational analysis of a role for salicylic acid in iron metabolism of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*. **182**: 264-271.
- 2 Álvares, E.. Capítulo 7. Tuberculose do Aparelho Respiratório. Pina, J.. **2004**. A Tuberculose na viragem do novo milénio. Edições Lidel. Pág.: 121-148.
- 3 Amann, R.; Peskar, B.A.. **2002**. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *European Journal of Pharmacology*. **447**:1-9.
- 4 American Thoracic Society. **2000**. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **161**: 1376–1395. Disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/pubs/PDF/1376.pdf> a 4 Novembro de 2008.
- 5 Andrews, J.M.. **2001**. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **48**: 5-16.
- 6 Anes, E.; Jordao, L.. **2008**. Trick-or-treat: dietary lipids and host resistance to infectious disease. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*. (*in press*)
- 7 Anes, E.; Kühnel, M.P.; Bos, E.; Moniz-Pereira, J.; Habermann, A.; Griffiths, G.. **2003**. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nature Cell Biology*. **5**: 793-802.

- 8 Anes, E.; Peyron, P.; Staali, L.; Jordao, L.; Gutierrez, M.G.; Kress, H.; Hagerdorn, M.; Maridonneau-Parini, I.; Skinner, M.A.; Wildeman, A.G.; Kalamidas, S.A.; Kuehnelt, M.; Griffiths, G.. **2006**. Dynamic life and death interactions between *Mycobacterium smegmatis* and J774 macrophages. *Cell Microbiology*. **8**: 939–960.
- 9 Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Third global report. *The WHO/IUATLD global project on drug resistance surveillance, 1999–2002*. World Health Organization, Geneva; **2004** (WHO/HTM/TB/2004.343). Disponível em http://www.who.int/tb/publications/who_htm_tb_2004_343/en/ a 7 de Julho de 2008.
- 10 Antunes, A.A.. Capítulo 4. Epidemiologia da tuberculose: compreender para agir. Pina, J. **2000**. A Tuberculose na viragem do milénio. Edições Lidel. Pág.: 37-85.
- 11 Bjorkman, D.J.. **1998**. The Effect of Aspirin and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Prostaglandins. *The American Journal of Medicine*. **105**: 8S-12S.
- 12 Boletim do Centro de Informação do Medicamento. Maio/Junho **2003**. Os Fármacos da Tuberculose-Multirresistente (TB-MR). Disponível em: http://www.ordemfarmaceuticos.pt/ordemfarmaFiles/files/ofFileS1_526.pdf.
- 13 Boshoff, H.I.M.; Mizrahi, V.. **2000**. Expression of *Mycobacterium smegmatis* Pyrazinamidase in *Mycobacterium tuberculosis* Confers Hypersensitivity to Pyrazinamide and Related Amides. *Journal of Bacteriology*. **182**: 5479-5485.
- 14 Botting, R.. **2003**. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thrombosis Research*. **110**: 269–272.
- 15 Botting, R.M.. **2006**. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). *Journal of Thermal Biology*. **31**: 208–219.
- 16 Bozza, P.T.; Payne, J.L.; Morham, S.G.; Langenbch, R.; Smithies, O.; Weller, P.F.. **1996**. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: Cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**: 11091-11096.
- 17 Brennan, P.J.; Nikaido, H.. **1995**. The envelope of mycobacteria. *Annu Ver Biochem*. **64**: 39-63.
- 18 Byrne, S.T.; Denkin, S.M.; Zhang, Y.. **2007**. Aspirin and ibuprofen enhance pyrazinamide treatment of murine tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **59**: 313-316.
- 19 Byrne, S.T.; Denkin, S.M.; Zhang, Y.. **2007**. Aspirin antagonism in isoniazid treatment of tuberculosis in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 794–795.
- 20 Carvalho, W.A.; Carvalho, R.D.S.; Rios-Santos, F.. **2004**. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. **54**: 448-464.
- 21 Castandet, J.; Prost, J.-F.; Peyron, P.; Asterie-Dequeker, C.; Anes, E.; Cozzzone, A.J.; Griffiths, G.; Maridonneau-Parini, I.. **2005**. Tyrosine phosphatase MptA of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits phagocytosis and increases actin polymerization in macrophages. *Research in Microbiology*. **156**: 1005–1013.
- 22 Caterina, R.; Basta, G.. **2001**. n-3 Fatty acids and the inflammatory response —

biological background. *European Heart Journal Supplements*. **3**: D42–D49.

- 23 Chen, M.; Divangahi, M.; Gan, H.; Shin, D.S.J.; Hong, S.; Lee, D.M.; Serhan, C.N.; Behar, S.M.; Remold, H.G.. **2008**. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE₂ and LXA₄ in the induction of macrophage death. *The Journal of Experimental Medicine*. **205**: 2791-2801.
- 24 Cheng, S.J.; Thibert, L.; Sanchez, T.; Heifets, L.; Zhang, Y.. **2000**. *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**: 528–532.
- 25 Clemens, D.L.; Horwitz, M.A.. **1995**. Characterization of the Mycobacterium-Tuberculosis Phagosome and Evidence That Phagosomal Maturation Is Inhibited. *Journal of Experimental Medicine*. **181**: 257-270.
- 26 Coll, P.. **2003**. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **21**: 299-308.
- 27 Constantino, L.; Anes, E.; Simões, M.F.; Valente, E.. **2006**. Formulações vesiculares contendo pró-fármacos do ácido pirazinóico ou de outros ácidos orgânicos, que permitem proteger o pró-fármaco da degradação plasmática e processos para a sua preparação. Patente de Invenção Nacional nº PT103495, ref.DP/01/2007/3349.
- 28 Crubézy, E.; Legal, L.; Fabas, G.; Dabernat, H.; Ludes, B.. **2006**. Pathogeny of archaic mycobacteria at the emergence of urban life in Egypt (3400 bc). *Infection, Genetics and Evolution*. **6**: 13-21.
- 29 Cynamon, M.H.; Gimi, R.; Gyenes, F.; Sharpe, C.A.; Bergmann, K.E.; Han, H.J.; Gregor, L.B.; Rapolu, R.; Luciano, G.; Welch, J.T.. **1995**. Pyrazinoic acid esters with broad spectrum *in vitro* antimycobacterial activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. **38**:3902-3907.
- 30 Cynamon, M.H.; Klemens, S.P.; Chou, T.S.; Gimi, R.H.; Welch, J.T.. **1992**. Antimycobacterial activity of a series of pyrazinoic acid esters. *Journal of Medicinal Chemistry*. **35**: 1212–1215.
- 31 Dannenberg, A.M.. **1982**. Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease*. **125**: 25-30.
- 32 Darling, R.L.; Romero, J.J.; Dial, E.J.; Akunda, J.K.; Langenbach, R.; Lichtenberger, L.M.. **2004**. The Effects of Aspirin on Gastric Mucosal Integrity, Surface Hydrophobicity, and Prostaglandin Metabolism in Cyclooxygenase Knockout Mice. *Gastroenterology*. **127**: 94–104.
- 33 DeBarber, A.E.; Mdluli, K.; Bosman, M.; Bekker, L.G.; Barry, C.E.. **2000**. Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings - National Academy Of Sciences USA*. **97**: 9677–9682.
- 34 Defacque, H.; Bos, E.; Garvalov, B.; Barret, C.; Roy, C.; Mangeat, P.; Shin, H.; Rybin, V.; Griffiths, G.. **2002**. Phosphoinositides Regulate Membrane-dependent Actin Assembly by Latex Bead Phagosomes. *Molecular Biology of the Cell*. **13**: 1190–1202.
- 35 Defacque, H.; Egeberg, M.; Habermann, A.; Diakonova, M.; Roy, C.; Mangeat, P.; Voelter, W.; Marriott, G.; Pfannstiel, J.; Faulstich, H.; Griffiths, G.. **2000**. Involvement

of ezrin/moesin in de novo actin assembly on phagosomal membranes. *The EMBO Journal*. **19**: 199–212.

- 36 Demissie, A.; Leyten, E.M.S.; Abebe, M.; Wassie, L.; Aseffa, A.; Abate, G.; Fletcher, H.; Owiafe, P.; Hill, P.C.; Brookes, R.; Rook, G.; Zumla, A.; Arend, S.M.; Klein, M.; Ottenhoff, T.H.M.; Andersen, P.; Doherty, T.M.; e grupo de estudo VACSEL. **2006**. Recognition of Stage-Specific Mycobacterial Antigens Differentiates between Acute and Latent Infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Vaccine Immunology*. **13**: 179-186.
- 37 Dobos, K.M.; Spotts, E.A.; Quinn, F.D.; King, C.H.. **2000**. Necrosis of lung epithelial cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis* is preceded by cell permeation. *Infection and Immunity*. **68**: 6300-6310.
- 38 Espinal, M.A.; Laserson, K.; Camacho, M.; Fusheng, Z.; Kim, S.J.; Tlali, R.E.; Smith, I.; Suarez, P.; Antunes, M.L.; George, A.G.; Martin-Casabona, N.; Simelane, P.; Weyer, K.; Binkin, N.; Ravigliione, M.C.. **2001**. Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*; **5**: 887-893.
- 39 Gale, A.G.; Kirtikara, K.; Pittayakhajonwut, P.; Sivichai, S.; Thebtaranonth, Y.; Thongpanchang, C.; Vichai, V.. **2007**. In search of cyclooxygenase inhibitors, anti-*Mycobacterium tuberculosis* and anti-malarial drugs from Thai flora and microbes. *Pharmacology and Therapeutics*. **115**: 307–351.
- 40 Gillespie, S.H.. **2002**. Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **46**: 267-274.
- 41 Glenn, H.L.; Jacobson, B.S.. **2002**. Arachidonic acid signalling to the cytoskeleton: the role of cyclooxygenase and cyclic AMP-dependent protein kinase in actin bundling. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. **53**: 239-250.
- 42 *Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing*. World Health Organization; **2007** (WHO/HTM/TB/2007.376). Disponível em http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/en/ a 7 Julho de 2008.
- 43 Gurumurthy, P.; Ramachandran, G.; Kumar, A.K.H.; Rajasekaran, S.; Padmapriyadarsini, C.; Swaminathan, S.; Venkatesan, P.; Sekar, L.; Kumar, S.; Krishnarajasekhar, O.R.; Paramesh, P.. **2004**. Malabsorption of rifampin and isoniazid in HIV-infected patients with and without tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. **38**: 280-3.
- 44 IV- Terapêutica. Pina, J. **2000**. A Tuberculose na viragem do milénio. Edições Lidel. Pág.: 371-487.
- 45 Janulionis, E.; Sofer, C.; Song, H.Y.; Wallis, R.S.. **2004**. Lack of activity of orally administered Clofazimine against intracellular *Mycobacterium tuberculosis* in whole-blood culture. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48**: 3133-3135.
- 46 Jordao, L.; Bleck, C.K.E.; Mayorga, L.; Griffiths, G.; Anes, E.. **2008**. On the killing of mycobacteria by macrophages. *Cellular Microbiology*. **10**: 529-48.
- 47 Jordao, L.; Lengeling, A.; Bordat, Y.; Boudou, F.; Gicquel, B.; Neyrolles, O.; Becker, P.D.; Guzman, C.A.; Griffiths, G.; Anes, E.. **2008**. Effects of omega-3 and -6 fatty acids

- on *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage and in mice. *Microbes and Infection*. **10**: 1379-86.
- 48 Kalamidas, S.A.; Kuehnel, M.P.; Peyron, P.; Rybin, V.; Rauch, S.; Kotoulas, O.B.; Houslay, M.; Hemmings, B.A.; Gutierrez, M.G.; Anes, E.; Griffiths, G.. **2006**. cAMP synthesis and degradation by phagosomes regulate actin assembly and fusion events: consequences for mycobacteria. *Journal of Cell Science*. **119**: 3686-3694.
 - 49 Kaufmann, S.H.E.; McMichael, A.J.. **2005**. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nature Medicine*. **11**: S33-S44.
 - 50 Kinchen, J.M.; Ravichandran, K.S.. **2008**. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nature reviews. Molecular cell Biology*. **9**: 781-795.
 - 51 Laal, S.; Skeiky, Y.A.W.. Chapter 5_Immune-Based Methods. Cole, S. T.; Eisenach, K.D.; McMurray, D.N.; Jacobs Jr, W.R.. **2005**. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. AMS Press. Pág.: 71-83.
 - 52 Luís, A.S.. Capítulo 3. Relações Imunopatogénicas entre o *Mycobacterium tuberculosis* e o hospedeiro Humano. Pina, J.. **2004**. *A Tuberculose na viragem do novo milénio*. Edições Lidel. Pág.: 19-36.
 - 53 McCarty, M.F.; Block, K.I.. **2006**. Preadministration of high-dose salicylates, suppressors of NF-kappaB activation, may increase the chemosensitivity of many cancers: an example of proapoptotic signal modulation therapy. *Integrative Cancer Therapies*. **5**: 252-268.
 - 54 McDonough, K.A.; Kress, Y.; Bloom, B.R.. **1993**. Pathogenesis of Tuberculosis: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with Macrophages. *Infection and Immunity*. **61**: 2763-2773.
 - 55 Park, J.S.; Tamayo, M.H.; Gonzalez-Juarrero, M.; Orme, I.M.; Ordway, D.J.. **2006**. Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. **79**: 80-86.
 - 56 Park, S.K.; Lee, J.Y.; Chang, C. L.; Lee, M. K.; Son, H.C.; Kim, C.M.; Jang, H.J.; Park, H. K.; Jeong, S.H.. **2001**. *pncA* mutations in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *BMC Infectious Diseases*. **1**. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/1/4>.
 - 57 Pérez, M.P.; Hurtado, M.P.; Rivera, M.. **2001**. Tuberculosis en el nuevo milenio. *Revista de La Facultad de Medicina*. **24**: 104-119.
 - 58 Piddock, L.J.; Williams, K.J.; Ricci, V.. **2000**. Accumulation of rifampicin by *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **45**: 159-165.
 - 59 Portugal, I.; Barreiro, L.; Moniz-Pereira, J.; Brum, L.. **2004**. *pncA* Mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48**: 2736-2738.
 - 60 Rauch, S.; Simoes, M.F.; Tsikas, D.; Bell, G.; Anes, E.; Kuehnel, M.; Griffiths, G.. **2008**. Effects of pro- and anti-inflammatory drugs on phagocytosis, phagosome-actin assembly and maturation and mycobacterial survival in macrophages; role of

prostaglandin synthesis by phagosomes. *In prep.*

- 61 Rieder, H.L.. **2001**. Bases Epidemiológicas do Controlo da Tuberculose. Direcção-Geral da Saúde.
- 62 Rosner, J.L.. **1985**. Nonheritable resistance to chloramphenicol and other antibiotics induced by salicylates and other chemotactic repellents in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*. **82**: 8771-8774.
- 63 Ruiz, P.; Rodríguez-Cano, F.; Zerolo, F.J.; Casal, M.. **2002**. Investigation of the *In Vitro* Activity of Streptomycin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbial Drug Resistance*. **8**: 147-149.
- 64 Russell, D.G.; Purdy, G.E.; Owens, R.M.; Rohde, K.H.; Yates, R.M.. **2005**. *Mycobacterium tuberculosis* and the Four-Minute Phagosome. *American Society for Microbiology News*. **71**: 459-463.
- 65 Schaible, U.E.; Kaufmann, S.H.E.. **2007**. Malnutrition and infection: Complex mechanisms and global impacts. *PLoS Medicine*. **4**: e115.
- 66 Schaller, A.; Guo, M.; Oluwatosin, G.; Zhang, Y.. **2002**. *Escherichia coli* genes involved in resistance to pyrazinoic acid, the active component of the tuberculosis drug pyrazinamide. *FEMS microbiology letters*; **211**: 265-270.
- 67 Snapper, S.B.; Melton, R.E.; Mustafa, S.; Kieser, T.; Jacobs, W.R.. **1990**. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology*. **4**: 1911-1919.
- 68 Somoskovi, A.; Parsons, L.M.; Salfinger, M.. **2001**. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory Research*. **2**: 164-168.
- 69 Sun, Z.; Scorpio, A.; Zhang, Y.. **1997**. The *pncA* gene from naturally pyrazinamide-resistant *Mycobacterium avium* encodes pyrazinamidase and confers pyrazinamide susceptibility to resistant *M. tuberculosis* complex organisms. *Microbiology*. **143**: 3367-3373.
- 70 Sun, Z.; Zhang, Y.. **1999**. Reduced pyrazinamidase activity and the natural resistance of *Mycobacterium kansasii* to the antituberculosis drug pyrazinamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **43**: 537-542.
- 71 Sweany, H.C.; Turner, G.C.; Lichtenstein, M.; Entin, S.. **1949**. A Preliminary Report on the Use of Para Amino Salicylic Acid in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. *Chest*. **16**: 633-656.
- 72 Tohgi, H.; Konno, S.; Tamura, K.; Kimura, B.; Kawano, K.. **1992**. Effects of low-to-high doses of aspirin on platelet aggregability and metabolites of thromboxane A2 and prostacyclin. *Stroke*. **23**: 1400-1403.
- 73 Treede, I.; Braun, A.; Sparla, R.; Kühnel, M.; Giese, T.; Turner, J.R.; Anes, E.; Kulaksiz, H.; Füllekrug, J.; Stremmel, W.; Griffiths, G.; Ehehalt, R.. **2007**. Anti-inflammatory Effects of Phosphatidylcholine. *The Journal of Biological Chemistry*; **282**: 27155-27164.
- 74 van der Wel, N.; Hava, D.; Houben, D.; Fluitsma, D.; van Zon, M.; Pierson, J.; Brenner, M.; Peters, P.J.. **2007**. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the

phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 129: 1287-1298.

- 75 Vane, J.R.; Mitchell, J.A.; Appleton, I.; Tomlinson, A.; Bishop-Bailey, D.; Croxtall, J.; Willoughby, D.A.. **1994**. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitricoxide synthase in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*. **91**: 2046–2050.
- 76 Vane, J.R.. **1971**. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature - New Biology*. **231**: 232–5.
- 77 Vane, J.R.; Butting, R.M.. **2003**. The mechanism of action of aspirin_review. *Thrombosis Research*. **110**: 255-258.
- 78 Vergne, I.; Chua, J.; Singh, S.B.; Deretic, V.. **2004**. Cell Biology of Mycobacterium tuberculosis phagosome. *Annual Review of Cell and Development Biology*. **20**: 367–94.
- 79 Volans, G.; Hartley, V.; McCrea, S.; Monaghan, J.. **2003**. Non-opioid analgesic poisoning. *Clinical Medicine*. **3**: 119-23.
- 80 Wade, M.M.; Zhang, Y.. **2004**. Anaerobic incubation conditions enhance pyrazinamide activity against Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Medical Microbiology*. **53**: 769-773.
- 81 Wu, K.K.. **2003**. Control of COX-2 and iNOS gene expressions by aspirin and salicylate. *Thrombosis Research*. **110**: 273–276.
- 82 Yamamoto, S.; Toida, I.; Watanabe, N.; Ura, T.. **1995**. *In Vitro* Antimycobacterial Activities of Pyrazinamide Analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; **39**: 2088-2091.
- 83 Zhang, Y.; Mitchison, D.. **2003**. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **7**: 6-21.
- 84 Zhang, Y.; Scorpio, A.; Nikaido, H.; Sun, Z.. **1999**. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of Bacteriology*. **181**: 2044-2049.
- 85 Zimhony, O.; Cox, J.S.; Welch, J.T.; Vilchèze, C.; Jacobs Jr, W.R.. **2000**. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Medicine*. **6**: 1043-1047.
- 86 WHO REPORT **2008**. Global Tuberculosis Control. Surveillance, planning, financing.

Anexos

Anexo I

1. Síntese dos pró-farmacos, ésteres derivados da PZA (C12, C14 e C16)

Os passos da síntese dos ésteres derivados da PZA e o respectivo mecanismo estão ilustrados no esquema da figura AI.1.

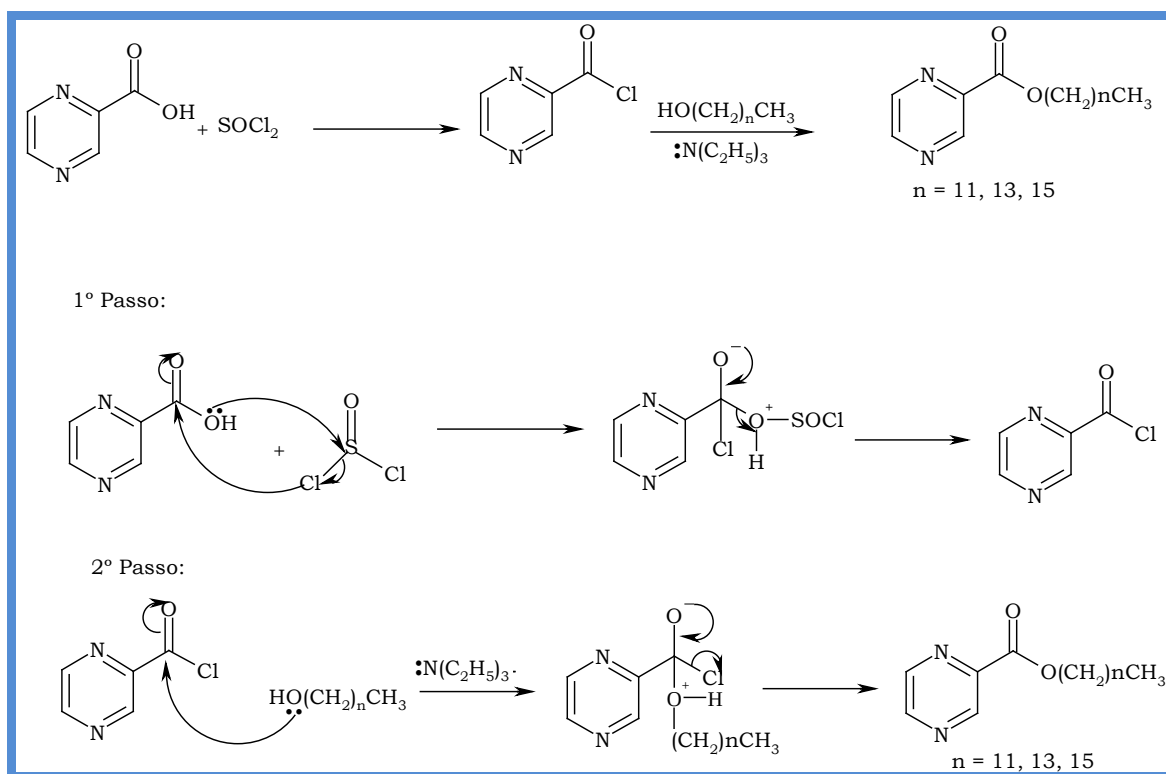


Figura AI.1. Esquema do mecanismo de síntese dos ésteres derivados de PZA.

Seguindo o esquema referido, sintetizaram-se os pirazinoatos de dodecanoílo (C12), tetradecanoílo (C14) e hexadecanoílo (C16) de acordo com o seguinte procedimento:

A uma determinada quantidade de ácido pirazínóico (POA) adicionou-se cloreto de tionilo. Aqueceu-se a solução em refluxo por algum tempo. Evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo com a ajuda do vácuo e purificou-se o cloreto de pirazinoílo por sublimação. Este foi obtido sob a forma de cristais pontiagudos brancos, que escureceram ao fim de alguns minutos. Os cristais foram imediatamente dissolvidos em diclorometano e a mistura foi colocada num banho de gelo. De seguida, juntou-se dodecanol (1-tetradecanol _ hexadecanol) e trietilamina destilada, a qual foi adicionada lentamente. A reacção deu-se no banho de gelo durante algum tempo e prosseguiu à temperatura ambiente. Foi posteriormente aquecida em refluxo e de seguida deixou-se à temperatura ambiente. A reacção foi controlada por cromatografia em camada fina (TLC) usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo. A mistura foi filtrada e o filtrado foi lavado com água destilada e também com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. A solução foi tratada com sulfato de magnésio anidro e o solvente foi evaporado. O composto obtido foi purificado por cromatografia em coluna, usando como eluente a mesma mistura anterior de hexano e acetato de etilo e o controlo foi efectuado por TLC, usando o mesmo eluente. A confirmação da estrutura foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN) e infra-vermelhos (IV). O produto foi obtido sob a forma de pequenos sólidos brancos com aspecto ceroso.

Anexo II

1. Preparação de lipossomas contendo os pró-fármacos encapsulados

A preparação dos lipossomas foi elaborada por liofilização de acordo com os procedimentos descritos em patente (27). Usou-se *terc*-butanol para garantir a esterilidade das soluções. Para essas suspensões usaram-se diferentes fosfolípidos (tabela AII.1) e alguns combinados (tabela AII.2).

Tabela AII.1 - Diferentes fosfolípidos usados nas preparações lipossomais.

Fosfolípido	Designação usada	TC (C°)
Dimiristoilfosfatidilcolina	DMPC	23
Dipalmitoilfosfatidilcolina	DPPC	41
Dimiristoilfosfatidilglicerol	DMPG	23
Dipalmitoilfosfatidilglicerol	DPPG	41

Os fosfolípidos são compostos termotrópicos (apresentam mudanças de fase devidas a variação térmica). A transição entre as fases dá-se a uma temperatura designada de transição de fase (TC). Acima da TC as cadeias acíclicas das bicamadas fosfolipídicas têm maior mobilidade. A TC varia consoante o comprimento da cadeia acíclica e o grau de insaturação. É por isto necessário preparar os lipossomas acima do maior valor de TC dos lípidos usados.

Todas as suspensões lipossomais preparadas foram observadas ao microscópio óptico com contraste de fase a uma ampliação de 400x, para efectuar o controlo morfológico dos lipossomas.

Tabela AII.2 - Diferentes formulações lipídicas usados na preparação das suspensões lipossomais.

Formulação lipídica	Razão lípido/fármaco encapsulado	Fármaco
DPPC	20:1, 10:1, 4:1	C12
DPMC	20:1, 10:1, 4:1	
DMPC:DMPG (7:3)	20:1, 10:1, 4:1	
DMPC:DMPG (9:1)	20:1, 10:1	
DMPC:DMPG (9:1)	10:1, 4:1	
DPPC:DPPG (7:3)	10:1	
DMPC	10:1	C14
DPPC	10:1	
DMPC:DMPG (9:1)	10:1	
DMPC	10:1	C16
DPPC	10:1	
DMPC:DMPG (9:1)	10:1	

Anexo III

1. Estudo da estabilidade dos pró-fármacos

Construíram-se curvas de calibração com comportamento linear, tendo no eixo das abcissas os valores das concentrações do respectivo composto e no eixo das ordenadas os valores das médias das áreas do pico atribuído ao composto analisado. Esse pico é obtido no tempo de retenção de cada composto, lido nos vários cromatogramas das injeções efectuadas em triplicado. Através de uma regressão linear foi então obtida a equação da recta e o coeficiente de regressão linear (r^2) da mesma para cada um dos compostos.

Os compostos em estudo apresentaram os tempos de retenção descritos na tabela AIII.1.

Tabela AIII.1 - Tempos de retenção e massa molecular de cada um dos pró-fármacos.

Composto	Tempo de retenção (min)	Massa molecular (g/mol)
C12	5,6	292,5
C14	8,8	320,5
C16	15,6	348,5

Para a construção da recta de calibração dos pró-fármacos, obtiveram-se valores de áreas para as várias concentrações, resultantes da análise de cromatogramas. Da média de valores das áreas de injeções em triplicado, obtiveram-se valores de área para cada concentração, e através de uma regressão linear obtiveram-se as rectas de calibração, apresentadas na tabela AIII.2.

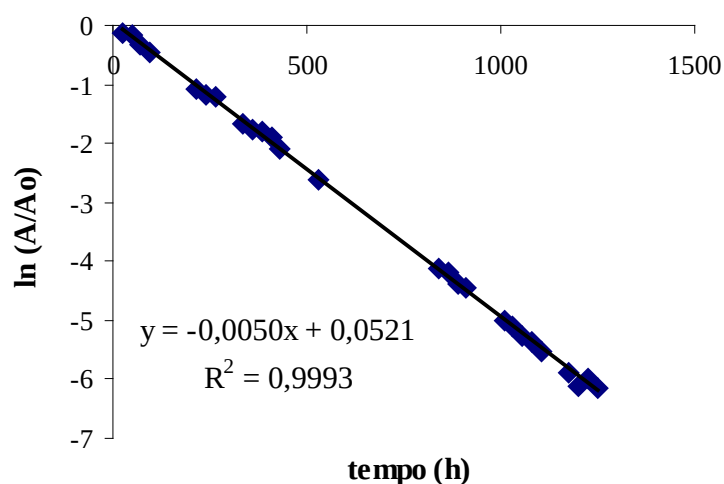
Tabela AIII.2 - Rectas de calibração obtidas para os fármacos em estudo.

Fármaco	Recta de calibração	r^2
C12	$y = 1,958E10x + 2963,6$	0,99
C14	$y = 2,13E10x + 558,3883$	1
C16	$y = 2,474E10x + 2736,9039$	1

Dos valores obtidos nos cromatogramas elaboraram-se gráficos para determinar o tempo de meia-vida dos compostos tal como o exemplo apresentado de seguida.

Nesses gráficos considerou-se como eixo das abcissas o logaritmo da razão entre a área obtida em cada ponto (A) e a área obtida no tempo zero (A0) e como eixo das ordenadas o tempo.

Com os dados obtidos da análise cromatográfica, construiu-se o seguinte gráfico para o composto C12:

**Figura AIII.1** - Gráfico de $\ln (A/A_0)$ versus tempo para C12 em PBS com ACN a 20%.

Como as reacções referidas são reacções de 1ª ordem, vem que:

$$dC/dT = k [C] \Leftrightarrow \ln C - \ln C_0 = -k.T \Leftrightarrow \ln (C/C_0) = -k.T$$

O tempo em que a concentração é igual a metade da concentração inicial, é designado de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$). Então, como $C = \frac{1}{2} C_0$, vem que:

$$\begin{aligned} \ln C/C_0 &= -k \cdot t_{1/2} \Leftrightarrow \ln (1/2 C_0) / C_0 = -k \cdot t_{1/2} \Leftrightarrow \ln 1/2 = -k \cdot t_{1/2} \Leftrightarrow -0,693 = -k \cdot t_{1/2} \\ \Leftrightarrow 0,693 &= k \cdot t_{1/2} \Leftrightarrow t_{1/2} = 0,693/k \end{aligned}$$

Da recta obtida vem que: $k = 0,0050 \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2} = 8316$ minutos.

Anexo IV

1. Estudo das eficácias de encapsulação (EE) dos pró-fármacos

Determinaram-se inicialmente curvas de calibração para cada composto. Para tal, prepararam-se seis soluções para cada um dos compostos, com diferentes concentrações (Tabela AIV.1.) e leu-se a absorvância.

Tabela AIV.1. - Valores de concentrações usadas na construção da recta de calibração.

Concentração de pró-fármaco (mol/l)
$2,50 \times 10^{-5}$
$5,00 \times 10^{-5}$
$7,50 \times 10^{-5}$
$1,00 \times 10^{-4}$
$1,25 \times 10^{-4}$
$1,50 \times 10^{-4}$

As rectas de calibração necessárias para a determinação foram também efectuadas conforme descrito no anexo III.

Tabela AIV.2. - Rectas de calibração obtidas para os fármacos em estudo.

Fármaco	Recta de calibração	r²
C12	$y = 6488,79 x$	0,9831
C14	$y = 5890,98 x$	0,9931
C16	$y = 7069,1 x$	0,9829

Após preparação de várias diluições para determinação espectrofotométrica da concentração de fármaco encapsulada, obtiveram-se as concentrações do composto, analisadas na data da sua preparação.

Anexo V

1.1. Preparação dos meios de cultura líquidos

O meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 (Difco) foi preparado de acordo com as instruções do produto, dissolvendo 4,7 g em 900 ml de água destilada contendo 2 ml de glicerol (Sigma-Aldrich) e aquecendo-se até dissolução completa. O meio foi seguidamente autoclavado a 121°C durante 20 minutos.

Aquando da sua utilização, adicionaram-se 100 ml de suplemento Middlebrook OADC (BBL Middlebrook OADC – Enrichment) e 5 ml de uma solução estéril de Tween 80 (Sigma) a 10%.

A utilização do detergente Tween 80 teve como objectivo impedir a formação de aglomerados de micobactérias, fenómeno frequente durante o crescimento destas culturas.

Em alternativa ao meio líquido Middlebrook 7H9 usou-se caldo myco. Prepararam-se duas soluções, uma com 5 g de Nutriente Broth (Difco) em 500 ml de água destilada; e outra juntando 5 g de Middlebrook 7H9 broth em 500 ml de água destilada. Ambas as soluções foram autoclavadas a 121°C durante 20 minutos. Para a sua utilização juntaram-se quantidades iguais das duas soluções e para um litro de caldo adicionaram-se 100 ml de suplemento Middlebrook OADC (BBL Middlebrook OADC – Enrichment) e 5 ml de uma solução estéril de Tween 80 (Sigma) a 10%.

Como opção alternativa ao uso de OADC, usou-se um suplemento de albumina que se preparou juntando-se para um volume final de 100 ml, 5 g de albumina (fracção V bovina) (Merck), 2 g de dextrose ou glucose anidra (Merck) e água destilada até perfazer o volume final. Este suplemento foi esterilizado por filtração com filtros de 0,45 µm (Ministart; Sartorius). E sempre que se usou este suplemento, na quantidade de 100ml por cada litro de meio, adicionou-se também ao meio de cultura 10 ml de uma solução estéril de glucose a 50% por cada litro de meio.

É de notar que o meio só foi suplementado para estirpes de crescimento lento que são metabolicamente exigentes e demoram cerca de três semanas a formar colónias. Para o crescimento de *M. smegmatis* mc²155, usou-se caldo myco apenas com adição de 0,5% de glucose e 0,05% de Tween 80.

Para os ensaios *in vitro*, o meio preparado foi acidificado até um pH de 5,9 com uma solução estéril de HCl 1M (47).

1.2. Preparação dos meios de cultura sólidos

O meio de cultura sólido Middlebrook 7H10 Agar (Difco) foi preparado de acordo com as instruções do produto, dissolvendo 2 g em 900 ml de água destilada contendo 2 ml de glicerol (Merck) e aquecendo-se até dissolução completa. Após a preparação do meio, o mesmo foi autoclavado e distribuído em placas de Petri, em condições estéreis para posterior utilização, tendo o cuidado de garantir a distribuição do meio a uma altura até dois terços da placa para o espalhamento das estirpes de crescimento lento. As placas foram guardadas no frigorífico até serem utilizadas.

Outra opção de crescimento foi o uso de meio myco-agar. Que se preparou juntando para uma primeira solução 5 g de nutriente Broth, 5 g de glucose, 15 g de agar e 500 ml de água destilada. Para uma segunda solução juntaram-se 5 g de Middlebrook 7H9 Broth a 500 ml de água destilada.

As soluções foram a esterilizar a 121°C por 20 min, e aquando da sua utilização fundiu-se o meio, juntaram-se quantidades iguais das duas soluções, adicionou-se suplemento para o caso das estirpes de crescimento lento e fez-se a sua distribuição em placas de Petri.

Estes meios foram suplementados tal como os meio líquidos.