

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Ciências
ULisboa

Estudo da atividade antimicrobiana de derivados de Azauronas e Sphaerococcenol A

Joana Rita da Silva Almeida Ferreira

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Isabel Portugal
Professora Doutora Mónica Cunha



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa sob a coorientação direta dos Professores Doutores Isabel Portugal e João Perdigão

A Professora Doutora Mónica Cunha foi a orientadora interna, designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

Aos meus orientadores Isabel Portugal (Orientadora Externa), João Perdigão (Coorientador) e Mónica Cunha (Orientadora Interna) por me darem a oportunidade de trabalhar neste projeto e por me ajudarem a transformá-lo naquilo que é mostrado nas páginas seguintes.

A todas as pessoas do grupo de trabalho Patogenómica e Resistência Bacteriana, em especial ao Pedro Gomes, que me acolheram desde o início e que se encontravam sempre disponíveis em ajudar.

À Diana Mora e ao Iúri Fernandes que tornaram os meus dias no laboratório uma série de comédia cheia de companheirismo e motivação. Mais do que colegas, amigos que levarei para a vida.

A todos meus amigos e família por aturarem as minhas “cromices”, por me incentivarem a ser sempre eu mesma e por me moldarem naquilo que sou hoje.

E em especial, aos meus pais por acreditarem sempre nas minhas capacidades (mesmo quando eu não o faço), por estarem sempre a torcer por mim e por me deixarem sonhar.

Resumo

A tuberculose (TB) continua a ser uma das doenças provocadas por um único agente infeccioso que mais morbidade e mortalidade causa a nível mundial. Porém, os tratamentos existentes são longos e nem sempre eficazes, promovendo a emergência e incidência de estirpes resistentes, sendo cada vez mais importante a descoberta e utilização de novas terapias para o combate desta patologia. Este trabalho tem, então, como objetivo determinar se os derivados de azauronas e de sphaerococcenol A são possíveis alternativas terapêuticas para a TB. Relativamente aos derivados de azauronas, estes foram identificados, através de ensaios de microdiluição, como ativos apenas contra micobactérias tuberculosas pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), sendo que essa atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é bacteriostática. Para além disto, apesar destes fármacos serem aparentemente tóxicos (índice de seletividade < 1), eles apresentam sinergia com macrófagos diferenciados de células THP-1. Contudo, o mecanismo de ação destes derivados continua por determinar, apesar de não parecer envolver bombas de efluxo inibidas por reserpina e clorpromazina. Já os derivados de sphaerococcenol A não apresentam atividade contra Mtb, mas sim contra *M. smegmatis* e contra uma variada gama de bactérias de Gram-positivo com diferentes graus de resistências a outros antibióticos. Estas atividades são, contudo, diferentes, visto que para a micobactéria não-tuberculosa de crescimento rápido a atividade é bactericida e que para as bactérias de Gram-positivo é bacteriostática, promovendo para estas últimas um fenómeno de tolerância. Adicionalmente, determinou-se que a eficácia destes fármacos depende da presença do grupo hidroxilo à frente do plano em vez de um grupo carbonilo. Logo, apesar de só os derivados de azauronas serem promissores para o tratamento da TB, os derivados de sphaerococcenol A são promissores para o combate a infeções provocadas por bactérias de Gram-positivo, pelo que se está perante fármacos importantes para o combate a duas ameaças de saúde pública.

Palavras Chave: Atividade Antimicrobiana; Derivados de Azauronas; e Derivados de Sphaerococcenol A

Abstract

Tuberculosis (TB), caused by a single infectious agent, continues to be one of the diseases with more morbidity and mortality worldwide. However, existing treatments are long and not always effective, promoting the emergence and incidence of resistant strains, so it is extremely important to discover and use new therapies to fight against this pathology. Hence, the objective of this study is to determine whether azaaurone and sphaerococcenol A derivatives are possible therapeutic alternatives for TB. Regarding azaaurone derivatives, they have been identified, through microdilution assays, as active only against tuberculous mycobacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), and they have a bacteriostatic activity against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Furthermore, although these drugs are apparently toxic (selectivity index < 1), they have synergy with differentiated macrophages of THP-1 cells. But the mechanism of action of these derivatives remains to be determined, although it does not appear to involve efflux pumps inhibited by reserpine and chlorpromazine. On the other hand, sphaerococcenol derivatives do not show activity against Mtb, but against *M. smegmatis* and against a wide range of Gram-positive bacteria with different degrees of resistance to other antibiotics. Nevertheless, these activities are different, since for the fast-growing nontuberculous *Mycobacterium* the activity is bactericidal and for the Gram-positive bacteria it is bacteriostatic, which promotes a tolerance phenomenon for these last bacteria. In addition, it has been determined that the efficacy of these derivatives depends on the presence of the hydroxyl group ahead of the plane rather than a carbonyl group. Therefore, although only azaaurone derivatives are promising drugs for the treatment of TB, sphaerococcenol A derivatives are promising drugs for the therapy of infections caused by Gram-positive bacteria, thus these two groups of derivatives are important to fight against two threats to global health.

Keywords: Antimicrobial Activity; Azaaurones Derivatives; and Sphaerococcenol A Derivatives

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
Índice de Tabelas.....	v
Índice de Figuras	vi
Índice de Abreviaturas.....	vii
1. Introdução.....	1
1.1. Perspetiva Histórica da Tuberculose (TB)	1
1.2. Epidemiologia da Tuberculose	2
1.3. Micobactérias, Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e Agente Etiológico da Tuberculose	3
1.4. Modo de Transmissão e Patofisiologia da Tuberculose	5
1.5. Fármacos Antituberculosos (Anti-TB)	6
1.6. “Pipeline” de Fármacos Anti-TB.....	11
1.7. Azauronas e derivados de Sphaerococcenol A como Fármacos Anti-TB.....	14
1.8. Objetivos	15
2. Materiais e Métodos	16
2.1. Compostos.....	16
2.2. Isolados e Estirpes de Espécies Bacterianas.....	17
2.3. Atividade Antibacteriana das Azauronas e dos Derivados de Sphaerococcenol A.....	19
2.3.1. Atividade Antibacteriana das Azauronas na presença de Inibidores de Bombas de Efluxo	19
2.4. Concentração Mínima Inibitória (MBC).....	20
2.5. Curvas de Morte na presença da Azaurona 5a e do derivado MF153F8.....	20
2.6. Citotoxicidade da Azaurona 5a em células THP-1.....	21
2.7. Atividade <i>ex vivo</i> da Azaurona 5a num modelo de infeção com macrófagos	21
3. Resultados e Discussão	23
3.1. Azauronas.....	23
3.1.1. Espetro de atividade das azauronas	23
3.1.2. Curva de morte de Mtb na presença da azaurona 5a	27
3.1.3. Atividade <i>ex vivo</i> da azaurona 5a contra Mtb num modelo de infeção em macrófagos.....	28
3.2. Sphaerococcenol A e os seus derivados	30
3.2.1. Espetro de atividade de Sphaerococcenol A e dos seus derivados	31
3.2.2. Curvas de morte na presença de MF153F8	33
4. Conclusão e Perspetivas Futuras	36
Referências Bibliográficas	38

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 "Scaffold" das azauronas e substituintes das azauronas testadas.....	16
Tabela 2.2 Estruturas químicas do MFSA e dos seus derivados	17
Tabela 2.3 Isolados e Estirpes de Espécies Bacterianas	18
Tabela 3.1 Atividade antibacteriana de azauronas contra bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo e micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido.....	23
Tabela 3.2 Atividade antibacteriana das azauronas 5a, 5j e 5x na presença dos inibidores de bombas de efluxo reserpina e CPZ contra E. coli, S. aureus, micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido.....	26
Tabela 3.3 Atividade antibacteriana da azaurona 5a na presença dos inibidores de bombas de efluxo reserpina e CPZ contra Mtb e BCG.....	27
Tabela 3.4 Atividade antibacteriana de MFSA e dos seus derivados contra bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo, bem como contra micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido e micobactérias tuberculosas.....	31
Tabela 3.5 Atividade de MF153F8 contra diferentes bactérias de Gram-positivo.....	32
Tabela 3.6 Comparação dos valores das MICs antes e depois das bactérias serem expostas ao fármaco MF153F8.....	34

Índice de Figuras

Figura 1.1 Estimativa das Taxas de Incidência da TB em 2021	2
Figura 1.2 Tendências Globais de Indicadores associados à TB entre 2000 e 2021	3
Figura 1.3 Fármacos anti-TB de primeira linha	7
Figura 1.4 Fármacos anti-TB de segunda linha.....	9
Figura 1.5 Fármacos anti-TB aprovados na última década.....	10
Figura 1.6 "Scaffolds" das Auronas e dos seus derivados.....	15
Figura 1.7 Estrutura química do sphaerococcenol A	15
Figura 3.1 Representação gráfica dos valores das MICs das azauronas testadas obtidas para as micobactérias pertencentes ao MTBC e ao MAC	24
Figura 3.2 Curva de morte de Mtb na presença da azaurona 5a.....	28
Figura 3.3 Curva dose-resposta do fármaco 5a contra macrófagos diferenciados de células THP-1 ..	29
Figura 3.4 Representação gráfica da viabilidade de Mtb quando num sistema macrófago-Mtb na presença da azaurona 5a (0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1 µg/mL), bem como de isoniazida 1 µg/mL e rifampicina 1 µg/mL (controlos negativos).....	30
Figura 3.5 Curvas de morte de bactérias de Gram-positivo e de micobactéria de crescimento rápido na presença de MF153F8.	33

Índice de Abreviaturas

- ATP – Adenosina Trifosfato
- BCG – Bacilo de Calmette-Guérin
- BSL-3 – Laboratório de Biossegurança de Nível 3 (do inglês “Biosafety Level 3 Laboratory”)
- CPZ – Clorpromazina
- DMSO – Dimetilsulfóxido (do inglês “Dimethyl sulfoxide”)
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês “Deoxyribonucleic Acid”)
- DR-TB – Estirpe de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a fármacos (do inglês “Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*”)
- EMA – Agência Europeia do Medicamento (do inglês “European Medicines Agency”)
- FDA – do inglês “Food and Drug Administration”
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês “Human Immunodeficiency Virus”)
- IC50 – Concentração Inibitória Média (do inglês “Half-Maximum Inhibitory Concentration”)
- MAC – Complexo *Mycobacterium avium* (do inglês “*Mycobacterium avium* Complex”)
- MBC – Concentração Mínima Bactericida (do inglês “Minimum Bactericidal Concentration”)
- MDR-TB – Estirpe de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente a fármacos (do inglês “Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*”)
- MHA – Meio de Cultura Mueller-Hinton Agar
- MHB – Meio de Cultura Mueller-Hinton Broth
- MIC – Concentração Mínima Inibitória (do inglês “Minimum Inhibitory Concentration”)
- MMP – Metaloproteínase de Matriz (do inglês Matrix Metalloproteinase)
- MRSA – Estirpe de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (do inglês “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”)
- Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*
- MTBC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (do inglês “*Mycobacterium tuberculosis* Complex”)
- OADC – Ácido Oleico-Albumina-Dextrose-Catalase (do inglês “Oleic Albumin Dextrose Catalase”)
- PAS – Ácido *para*-aminosalicílico (do inglês “*para*-Aminosalicylic Acid”)
- PBS – Tampão fosfato-salino (do inglês “Phosphate Buffered Saline”)
- PDIM – Dimicocerosato de Ftiocerol (do inglês “phthiocerol dimycocerosate”)
- PGL – Glicolípido Fenólico (do inglês “Phenolic glycolipid”)
- PMA – Acetato de Miristato de Forbol (do inglês “phorbol myristate acetate”)
- Pre-XDR-TB – Estirpe de *Mycobacterium tuberculosis* pré-extensivamente resistente a fármacos (do inglês “pre-Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*”)
- RD – Região Diferenciadora (do inglês “Region of Difference”)
- RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês “Ribonucleic Acid”)
- STR – Estreptomicina
- TB – Tuberculose
- TLR – do inglês “toll-like receptor”
- VISA – Estirpe de *Staphylococcus aureus* com resistência intermédia à vancomicina (do inglês “Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*”)
- WHO – Organização Mundial de Saúde (do inglês “World Health Organization”)
- XDR-TB – Estirpe de *Mycobacterium tuberculosis* extensivamente resistente a fármacos (do inglês “Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*”)

1. Introdução

1.1. Perspetiva Histórica da Tuberculose (TB)

O género *Mycobacterium* terá surgido há mais de 150 milhões de anos (Hayman, 1984), porém o ancestral comum mais recente do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) só surgiu à cerca de 6000-70000 anos (Bos *et al.*, 2014; Comas *et al.*, 2013) no corno de África (Supply *et al.*, 2013). Aqui terá infetado humanos que, durante o período Neolítico, através das suas migrações, promoveram a dispersão desse agente bacteriano para o resto do mundo (Comas *et al.*, 2013) e consequente adaptação a diferentes grupos humanos (Buzic & Giuffra, 2020). A patologia causada por microrganismos pertencentes ao MTBC existe, então, desde a antiguidade, sendo conhecida, atualmente, por TB. Todavia, só em 1882 é que *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), também designada por bacilo de Koch (Taylor *et al.*, 2003), foi isolada e identificada como o agente etiológico da TB no ser humano (R. Koch, 1882). Esta descoberta permitiu, ao longo das décadas seguintes, um intenso aprofundamento do conhecimento acerca da transmissão desta patologia (Churchyard *et al.*, 2017), a qual ocorre através de partículas aerossolizadas expelidas por indivíduos com doença ativa e, posteriormente, inaladas por indivíduos saudáveis de modo a que possam atingir o trato respiratório inferior destes (Chapman *et al.*, 1964; Riley *et al.*, 1959, 1962; Riley R. L. & O'Grady F., 1961). A identificação do agente etiológico permitiu ainda uma melhor compreensão da progressão da doença e a caracterização da fase latente da mesma (Churchyard *et al.*, 2017; Dobbs & Kimmerling, 2008). Adicionalmente, esta identificação permitiu, também, o desenvolvimento de várias técnicas para diagnóstico da TB (*e.g.* prova cutânea da tuberculina, exame microscópio direto do esfregaço da expectoração) (Daniel, 2006), tendo também possibilitado a descoberta de novas abordagens terapêuticas com vista a controlar — e erradicar — esta patologia. A primeira, em 1921, consistiu no desenvolvimento da vacina com o bacilo de Calmette-Guérin (BCG), um mutante atenuado de *M. bovis* obtido através de subcultura sucessiva em bÍlis de bovino (Calmette A. *et al.*, 1924; Calmette & Guérin, 1909; Hsu *et al.*, 2003). Este processo permitiu que a estirpe parental virulenta utilizada fosse perdendo a sua virulência (Calmette & Guérin, 1909), não causando TB, mas mantendo antigénios protetores contra Mtb e outros agentes patogénicos semelhantes (Stover *et al.*, 1991). No entanto, embora a vacina BCG apresente, em crianças, cerca de 75% de eficácia contra algumas formas severas de TB (*e.g.* meningites, TB miliar), não proporciona uma proteção eficiente contra TB pulmonar (Oxford Vaccine Group, 2022; Trunz *et al.*, 2006), nem previne a ocorrência de infeção primária ou a reativação da infeção pulmonária latente [Organização Mundial de Saúde (WHO), n.d.].

Nas décadas seguintes do século XX, a descoberta dos antibióticos e intensa pesquisa de novos agentes, levou à descoberta de diversos antibióticos com atividade contra o Mtb. Nos anos 40, foi isolada, de duas estirpes de *Actinomyces griseus*, a estreptomomicina (STR) que mostrou ter atividade contra bactérias de Gram-negativo e estirpes (virulentas e não-virulentas) de Mtb (Rawlins, 2012; Schatz *et al.*, 1944) e, também, foi sintetizado o ácido *para*-aminosalicílico (PAS) com o objetivo de nutrir e matar o bacilo (Lehmann, 1946a, 1946b). Todavia, apesar de ambos os compostos apresentarem alguma eficácia no tratamento da TB, induzem alguns efeitos secundários no hospedeiro, assim como o surgimento de estirpes de Mtb resistentes quando usados de forma isolada (Hinshaw *et al.*, 1946; The Therapeutic Trials Committee of the Swedish National Association against Tuberculosis, 1950). Deste modo, nos anos 50, começaram a utilizar-se regimes de combinação de fármacos (W. Fox *et al.*, 1999) e determinou-se que a isoniazida e a pirazinamida — sintetizadas nas décadas 10 e 30 (Dalmer *et al.*, 1936; Meyer & Mally, 1912), respetivamente — também apresentam atividade contra Mtb (H. H. Fox, 1952; Yeager *et al.*, 1952). No final dessa mesma década foi identificada a rifampicina (Sensi *et al.*, 1959), a qual, nos anos seguintes, começou a ser usada contra o agente etiológico da TB (Maggi *et al.*,

1966; Sensi *et al.*, 1966). Na década de 60, também foi determinado que o etambutol é ativo contra *Mtb* (Kuck *et al.*, 1963; Thomas *et al.*, 1961), o que permitiu, juntamente com a rifampicina, melhorar os regimes de combinação para o tratamento da TB. Para além dos compostos mencionados, ao longo destes anos também foram desenvolvidos outros antibióticos, como a cicloserina (Barclay & Russe, 1955), a canamicina (Umezawa, 1958), a etionamida (Riddell *et al.*, 1960) e a capreomicina (Poppellwell *et al.*, 1966), com vista a eliminar estirpes de *Mtb* resistentes (J. F. Murray *et al.*, 2015). Contudo, devido à dificuldade em compreender os mecanismos de resistência das estirpes de *Mtb*, à falta de modelos animais adequados e à falta de incentivos financeiros (Ginsberg & Spigelman, 2007), só após cerca de 40 anos é que foram aprovados novos fármacos para o combate à TB, entre os quais a bedaquilina [Agência Europeia do Medicamento (EMA), 2014b; Food and Drug Administration (FDA), 2012], a delamanida (EMA, 2014a) e a pretomanida (EMA, 2020; FDA, 2019).

1.2. Epidemiologia da Tuberculose

Apesar da longa história associada à TB e da existência de terapêutica eficaz, estima-se que cerca de 25% da população mundial esteja infetada com o bacilo (WHO, 2022a), sendo que é nos continentes africano e asiático onde se encontram as maiores taxas de incidência da doença (Figura 1.1). Logo, a TB permanece como uma das patologias causadas por um único agente infeccioso com maior mortalidade, tendo vitimado, em 2021, cerca de 1,6 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2022a).

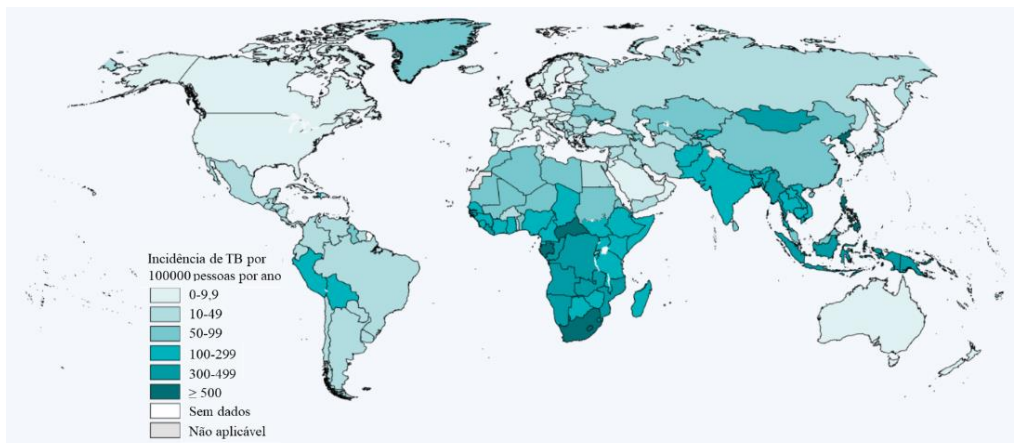


Figura 1.1 Estimativa das Taxas de Incidência da TB em 2021. Adaptado de Figura 14 do Relatório Global da Tuberculose 2022 (WHO, 2022a).

Tendo em conta os valores constantemente elevados dos indicadores associados à TB (*e.g.* taxa de incidência, mortalidade, emergência e incidência de estirpes de *Mtb* resistentes a antibióticos), a 67^a Assembleia Mundial de Saúde aprovou uma estratégia global para prevenção, tratamento e controlo da TB a pôr em prática a partir de 2015 (WHO, 2014). Posteriormente nomeada de “The end TB strategy”, esta tem como objetivo principal acabar com a epidemia da TB a nível mundial até 2035 (WHO, 2015). De forma a atingir esta meta foi proposto que, por essa altura e comparativamente aos valores de 2015, deve existir uma redução de 95% do número de mortes associadas à TB e uma redução em 90% da taxa de incidência desta doença (menos de 10 casos de TB por 100000 pessoas), sendo também e para tal necessário a redução do número de doentes e famílias a enfrentar custos catastróficos relacionados com o tratamento da TB (WHO, 2015). Porém, para se atingir estas metas é fundamental existir um plano de controlo e gestão da TB, o qual deve consistir não só na identificação de indivíduos infetados, mas também na existência de tratamentos eficazes tanto para doença ativa como para a infeção latente.

Durante anos este plano tem sido posto em prática e os valores associados aos diversos indicadores evoluíram de uma forma favorável ao cumprimento dos objetivos propostos. No entanto, desde 2020, devido ao impacto da COVID-19, houve uma alteração nesta tendência. Por um lado, a mortalidade associada à TB subiu pela primeira vez em 15 anos e, por outro, a descida dos números de casos notificados e de casos novos e reincidentes que receberam tratamento (tanto para estirpes sensíveis como resistentes) (Figura 1.2) (WHO, 2022b) não corresponde à realidade. Portanto, os valores associados à mortalidade indicam que a implementação dos tratamentos e a sua eficácia estão aquém do esperado e a descida observada nos valores associados ao diagnóstico e incidência indica que os casos não diagnosticados e/ou não tratados aumentaram, o que promoverá, num futuro próximo, a ocorrência de um maior número de pessoas a desenvolver TB e consequente aumento da transmissão comunitária da mesma e do número de mortes que lhe estão associadas (WHO, 2022a).

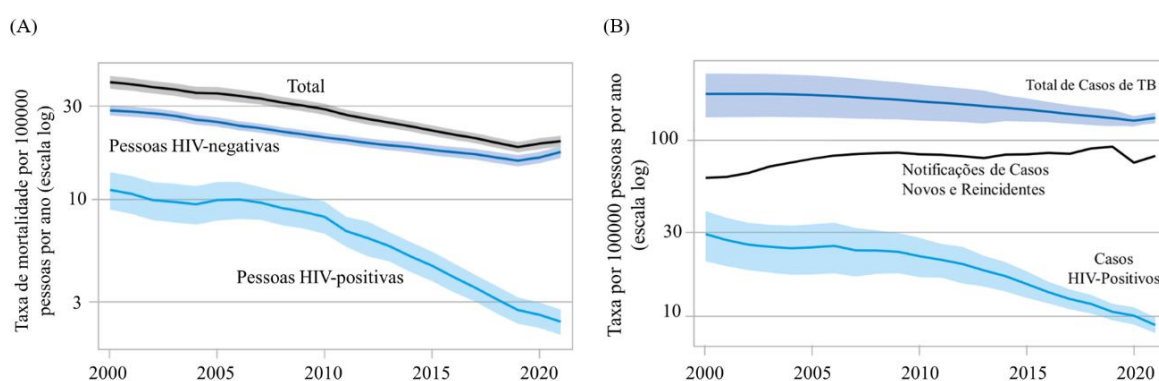


Figura 1.2 Tendências Globais de Indicadores associados à TB entre 2000 e 2021, sendo as áreas sombreadas correspondentes ao intervalo de confiança de 95%. Adaptado de Figuras 6 e 10 do Relatório Global da Tuberculose 2022 (WHO, 2022a). **(A)** Taxa de Mortalidade da TB, com comparação entre indivíduos infetados e não infetados com vírus da imunodeficiência humana (HIV), ou seja, entre indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos; **(B)** Taxas de Incidência (total de casos e casos de indivíduos HIV-positivos) e de Notificação de Casos (novos e reincidentes).

1.3. Micobactérias, Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e Agente Etiológico da Tuberculose

Pertencente ao filo Actinobacteria, à classe Actinomycetia e à ordem Corynebacteriales (*Taxonomy Browser (Mycobacterium)*, n.d.), o género *Mycobacterium* compreende microrganismos saprófitos e parasitas oportunistas e obrigatórios (“The Actinobacteria, Part A,” 2012), sendo habitualmente dividido em micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido (e.g. *M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. fortuitum*) (Brown-Elliott & Philley, 2017) e de crescimento lento [e.g. complexo *M. avium* (MAC), *M. kansasii*, *M. goodii*, *M. scrofulaceum*] (Zulu *et al.*, 2021), micobactérias tuberculosas (e.g. *M. tuberculosis*, *M. bovis*) e micobactérias que provocam lepra (e.g. *M. leprae*, *M. lepromatosis*) (Fedrizzi *et al.*, 2017). Em geral, as micobactérias são bacilos alongados, aeróbios ou microaerófilos e desprovidos de mobilidade, sendo que, enquanto algumas estirpes não produzem pigmentos e formam colónias cremes, outras são produtoras de pigmentos na presença e/ou na ausência de luz e, como tal, formam colónias amareladas ou alaranjadas (“The Actinobacteria, Part A,” 2012). Adicionalmente, as micobactérias apresentam um elevado conteúdo de G+C (62 a 70%) a nível genómico e são, por vezes, classificadas como bactérias de Gram-positivo (Cook *et al.*, 2009), embora esta técnica não seja eficaz na coloração destes bacilos. Esta classificação deve-se ao facto de estas bactérias possuírem uma membrana celular interna constituída por fosfolípidos derivados do ácido fosfatídico (e.g. fosfatidilinositol), bem como por lipomananos e lipoarabinomananos (Chiaradia *et al.*, 2017); uma parede celular complexa que apresenta uma camada granular, uma camada de peptidoglicanos — compostos por ácido *meso*-diaminopimélico, ácido murâmico, glucosamina, ácido glutâmico, arabinose,

alanina e galactose; e uma camada de arabinogalactanos e uma membrana celular externa, cuja superfície interna é constituída por ácidos micólicos (responsáveis pela álcool-ácido resistência dos bacilos) e a externa por lípidos variados, entre os quais dimiocerosatos de ftiocerol (PDIMs) e glicolípidos fenólicos (PGLs) (Dulberger *et al.*, 2020; “The Actinobacteria, Part A,” 2012; Vincent *et al.*, 2018). A ultra-estrutura e composição da parede estão, assim, associadas à promoção da sobrevivência (Madigan *et al.*, 2019) e à baixa permeabilidade (Forrellad *et al.*, 2013) das micobactérias, uma vez que a presença de um elevado teor de lípidos influencia o influxo e efluxo de diversas substâncias (Koul *et al.*, 2011), dificultando a ação de fármacos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de novos fármacos.

Relativamente às micobactérias tuberculosas, estas podem ser definidas por um grupo restrito de bactérias geneticamente relacionadas denominado MTBC, o qual é composto por *Mtb*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. orygis* e *M. mungi* (Forrellad *et al.*, 2013; Pfyffer, 2015). O MTBC apresenta, então, uma população de estrutura estritamente clonal com sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) altamente conservadas (homologia superior a 99,9%), assim como sequências de 16S de ácido ribonucleico (RNA) semelhantes, visto que não ocorrem com frequência rearranjos genômicos de grandes dimensões nas estirpes destas bactérias nem transferências horizontais de genes entre elas (Böddinghaus *et al.*, 1990; Brites & Gagneux, 2015; Gagneux, 2018; Galagan, 2014). Contudo, apesar de existir uma baixa heterogeneidade genética, as bactérias do MTBC, devido à expressão diferencial dos genes, apresentam diversos fenótipos, ecótipos adaptados a diferentes organismos (*e.g.* *Mtb* e *M. africanum* são exclusivos de humanos; *M. microti* é exclusivo de roedores; *M. bovis* tem múltiplos hospedeiros) e patogenicidade (Brosch *et al.*, 2002; Kanabalan *et al.*, 2021), sendo que as espécies virulentas apresentam diversas estratégias para evadir e modular a resposta imunitária do hospedeiro a favor do sucesso da infecção e transmissão (Forrellad *et al.*, 2013). Para além disso, sabe-se que o MTBC diverge de um único ancestral comum (Brosch *et al.*, 2002) e que as estirpes com tropismo para o ser humano se encontram distribuídas em nove linhagens filogenéticas (L1 a L9): a linhagem Indo-Oceânica (L1); a linhagem da Ásia Oriental (L2); a linhagem da África Oriental e da Índia (L3); a linhagem Euro-Americana (L4); a linhagem *M. africanum* da África Ocidental 1 (L5); a linhagem *M. africanum* da África Ocidental 2 (L6); a linhagem da Etiópia (L7); a linhagem da África Oriental (região dos Grandes Lagos Africanos) (L8); e a linhagem da África Oriental (Somália) (L9) (Brites & Gagneux, 2015; Coscolla *et al.*, 2021; Kanabalan *et al.*, 2021; Ngabonziza *et al.*, 2020). Estas linhagens, com base na presença ou ausência do gene *TbD1*, podem ser divididas nas que contêm as estirpes primitivas (L1, L5 a L9) e nas que contêm as estirpes modernas (L2 a L4). Isto porque, a deleção deste gene, tal como acontece nestas últimas estirpes, está associada a um aumento da resistência contra o stress oxidativo e à hipoxia e, portanto, a uma maior virulência e propagação das mesmas a nível mundial (Bottai *et al.*, 2020; Brosch *et al.*, 2002; Galagan, 2014; Silva *et al.*, 2022).

Ainda que a TB possa ser causada por qualquer uma das bactérias pertencentes ao MTBC, o principal agente etiológico da TB em humanos é o *Mtb*, uma vez que, como a maioria das suas estirpes estão distribuídas pelas L2 a L4, esta espécie é mais virulenta e tem maior distribuição geográfica (Bottai *et al.*, 2020; Jia *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2022). Para além disto, *Mtb* não apresenta fatores de virulência “clássicos” (*e.g.* fatores de aderência, exotoxinas), mas sim um envelope celular dinâmico e imunomodulatório que permite a evasão ao sistema imunitário do hospedeiro e conseqüente sobrevivência no organismo deste, bem como uma tolerância (resistência fenotípica) a antibióticos promovida por alterações epigenéticas na expressão génica e na modificação de proteínas (Cambier, Falkow, *et al.*, 2014; Dulberger *et al.*, 2020; Zhang & Yew, 2015). Assim, este agente patogénico pode apresentar resistência intrínseca a uma variada gama de antibióticos conferida não só pela composição e estrutura do envelope celular, mas também devido aos sistemas de efluxo e pelos processos de

inativação de fármacos e/ou monometilação dos alvos dos antibióticos (Gygli *et al.*, 2017). Contudo, também pode apresentar resistência adquirida (resistência genética), a qual se deve a mutações cromossômicas (*e.g.* polimorfismos de nucleótido único, deleções, inserções) ocorridas — durante a fase exponencial do crescimento bacteriano — devido a mecanismos celulares (*e.g.* erros de transcrição, tradução e/ou reparação) e/ou a fatores de stress (*e.g.* uso incorreto de terapias, diagnóstico tardio) ou de risco (*e.g.* subnutrição, diabetes, tabagismo) (Gygli *et al.*, 2017; Hameed *et al.*, 2018; Mcgrath *et al.*, 2014; WHO, 2022a; Zhang & Yew, 2015).

1.4. Modo de Transmissão e Patofisiologia da Tuberculose

A transmissão da TB ocorre eficazmente por aerossóis — com no máximo três bacilos — que têm de chegar ao trato respiratório inferior de novos indivíduos (Bloom *et al.*, 2017; Cambier, Falkow, *et al.*, 2014), pelo que Mtb não pode ser detetada pelo sistema imunitário do hospedeiro enquanto não passar pelo trato respiratório superior. Isto é possível, graças à presença de PDIMs na superfície desta bactéria que impedem que seja reconhecida por macrófagos microbicidas — recrutados através de “toll-like receptors” (TLRs) ou através da via MyD-88 —, permitindo, assim, que Mtb chegue aos alvéolos pulmonares (Cambier, Falkow, *et al.*, 2014). Nestes, uma vez que o bacilo apresenta à sua superfície PGLs, ocorre o recrutamento e infeção de macrófagos alveolares permissivos dependentes de CCL2 (Cambier, Takaki, *et al.*, 2014) e consequente subregulação de catepsinas, o que contribui para a formação de nichos intracelulares (Anes *et al.*, 2021) propícios à replicação bacteriana (Sheedy & Divangahi, 2021) e para a passagem dessas células fagocíticas para o interstício pulmonar. Aqui, estas células infetadas induzem as células epiteliais circundantes a secretar metaloproteínases de matriz (MMPs) (Cambier, Falkow, *et al.*, 2014; Volkman *et al.*, 2010) [*e.g.* MMP-1, MMP-9 (Paige & Bishai, 2010)], as quais formam proteases dependentes de zinco com capacidade para degradar colagénio estável presente na matriz extracelular pulmonar (Page-McCaw *et al.*, 2007). Assim, à medida que Mtb estabelece a infeção, a organização celular dos pulmões é alterada, o que permite o recrutamento de macrófagos intersticiais e a disseminação do agente etiológico para estes (S. B. Cohen *et al.*, 2018; Paige & Bishai, 2010; Sköld & Behar, 2008), resultando na expansão de novos nichos replicativos (Cambier, Falkow, *et al.*, 2014). Isto promove, depois, a polarização dos macrófagos intersticiais a macrófagos M1 (Thiriot *et al.*, 2020), os quais induzem atividades pró-inflamatórias — síntese de vários mediadores (*e.g.* espécies reativas de oxigénio), péptidos antimicrobianos (*e.g.* catelicidina) e eicosanoides pró-inflamatórios (Marakalala *et al.*, 2016) — com o objetivo de eliminar o bacilo (Sheedy & Divangahi, 2021). Porém, se a infeção persistir os macrófagos M1 irão promover o início da formação de granulomas — estruturas patológicas características da TB (Cambier, Falkow, *et al.*, 2014) — de modo a manter o crescimento bacteriano restrito a um único local (Ahmad *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2015). Todavia, estas estruturas são atualmente percecionadas como estruturas que favorecem a persistência e evasão dos bacilos, visto as respostas pró-inflamatórias serem de tal modo exacerbadas que, em vez de levarem à eliminação da infeção, dificultam a homeostasia tecidual e a integridade dos granulomas (Ahmad *et al.*, 2022). Consequentemente, ocorre um constante recrutamento de macrófagos que irão sofrer polarização para macrófagos M2, os quais — devido a apresentarem fusão mitocondrial e consequente promoção do metabolismo da glutamina, da fosforilação oxidativa e da oxidação de ácidos gordos (Ramond *et al.*, 2019; L. Shi *et al.*, 2019) — induzem respostas anti-inflamatórias que, por um lado, regulam a infeção e favorecem a reparação tecidual (Marakalala *et al.*, 2016; Sheedy & Divangahi, 2021) e, por outro, geram um ambiente favorável ao crescimento do bacilo, bem como a persistência deste (Ahmad *et al.*, 2022). Para além dos macrófagos, também ocorre o recrutamento de células dendríticas, linfócitos, fibroblastos e colagénio (Anes *et al.*, 2021) que, juntamente com a compartimentação espacial nos granulomas dos macrófagos M1 (centro) e dos macrófagos M2

(periferia), permitem a limitação da infecção e previnem a disseminação da mesma pelo organismo do hospedeiro (Sheedy & Divangahi, 2021; L. Shi *et al.*, 2019). Durante este processo, quando existe a presença de um elevado número de macrófagos M1 (Thiriot *et al.*, 2020) e a quantidade bacteriana atinge um determinado limite em cada um dos macrófagos, estes sofrem apoptose e são, por conseguinte, eliminados por eferocitose (Cambier, Falkow, *et al.*, 2014; Sheedy & Divangahi, 2021). Isto possibilita, não só a diminuição da carga infecciosa (Sheedy & Divangahi, 2021) por causa do ambiente pró-inflamatório (Thiriot *et al.*, 2020), como também a expansão do nicho replicativo devido ao constante recrutamento de mais macrófagos (J. M. Davis & Ramakrishnan, 2009), o que leva à manutenção e/ou ao aumento dos granulomas (Cambier, Falkow, *et al.*, 2014). Enquanto esta contenção da disseminação ocorrer, está-se perante a fase da latência da TB (Elliott *et al.*, 2015). Contudo, quando sob fatores de stress (*e.g.* condições imunossupressoras, coinfeção por HIV) (Jilani *et al.*, 2022) e na presença de um elevado número de macrófagos M2, esta doença passa a estar ativa, uma vez que ocorre indução da morte dos macrófagos por necrose e de respostas anti-inflamatórias, que promovem a gaseificação dos granulomas e consequentes libertação e proliferação de *Mtb* para outros tecidos, assim como a sua possível transmissão a outros indivíduos (Cambier, Falkow, *et al.*, 2014; Kaufmann & McMichael, 2005; Sheedy & Divangahi, 2021; Thiriot *et al.*, 2020). Deste modo, a presença do bacilo no organismo hospedeiro pode resultar em três destinos: a eliminação imediata do agente patogénico (muito raro), sem evidência imunológica que houve contacto com o mesmo; o desenvolvimento de TB ativa como infeção primária que é frequente em pessoas com imunidade insuficiente (*e.g.* crianças, idosos, indivíduos imunocomprometidos); e, o desenvolvimento de TB latente, que poderá progredir para TB ativa (Kanabalan *et al.*, 2021; Kaufmann & McMichael, 2005).

Logo, os elevados valores das taxas de incidência e de mortalidade associadas a esta patologia devem-se, maioritariamente, ao facto de *Mtb* — ao promover a formação de granulomas — conseguir sobreviver de uma forma latente no organismo do hospedeiro (LoBue & Mermin, 2017; Silva Miranda *et al.*, 2012). Isto faz com que, devido a fatores de stress e/ou genéticos, apenas 5 a 10% dos casos é que desenvolvam TB (forma ativa) (Jilani *et al.*, 2022), dos quais cerca de 15% são casos de TB extrapulmonar (WHO, 2022d) [*e.g.* TB miliar, TB osteoarticular, TB geniturinária, TB cutânea (Ramirez-Lapausa *et al.*, 2015)].

1.5. Fármacos Antituberculosos (Anti-TB)

Face à epidemiologia global e estratégia de sobrevivência de *Mtb* no hospedeiro humano, a descoberta e o desenvolvimento de fármacos anti-TB são de extrema importância para o controlo e gestão desta patologia. Os fármacos anti-TB podem ser divididos em fármacos de primeira linha e de segunda linha (WHO, 2019).

Os fármacos anti-TB de primeira-linha (Figura 1.3) são aqueles que são usados como tratamento standard — a isoniazida, a pirazinamida, o etambutol e a rifampicina —, uma vez que são eficazes tanto para o tratamento da TB provocada por estirpes sensíveis como por estirpes monorresistentes (WHO, 2019, 2022d).

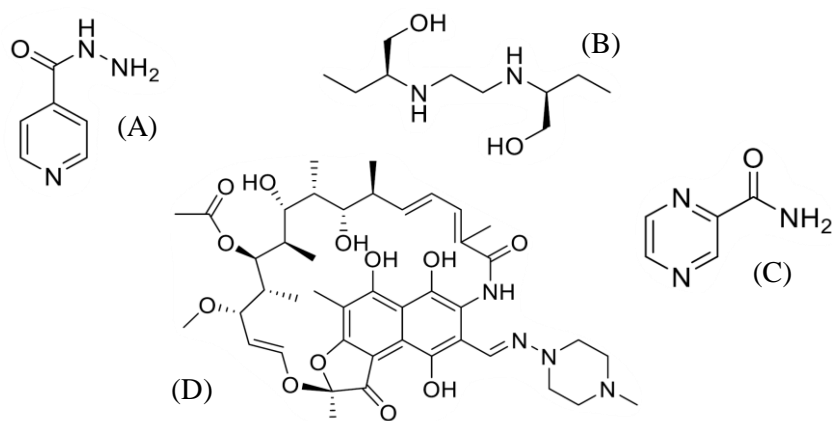


Figura 1.3 Fármacos anti-TB de primeira linha. (A) Isoniazida; (B) Etambutol; (C) Pirazinamida; (D) Rifampicina.

A isoniazida (Figura 1.3A), também designada de hidrazida de ácido isonicotínico (Chakraborty & Rhee, 2015), é um pró-fármaco que, após entrar nos bacilos por difusão passiva (Bardou *et al.*, 1998), é ativado pelo catalase-peroxidase (KatG) (Zhang *et al.*, 1992). Na sua forma ativa vai interferir com a biossíntese da parede celular das micobactérias, inibindo a síntese de ácidos micólicos (Dulberger *et al.*, 2020), bem como induzir reduções na atividade respiratória e efeitos seletivos na extração de lípidos e na acumulação de trealose e hexose fosfato solúveis (Chakraborty & Rhee, 2015). Esta inibição só acontece, pois, a isoniazida ao inibir InhA (Banerjee *et al.*, 1994; Rawat *et al.*, 2003) — enzima pertencente ao complexo ácidos gordos sintetase II que está envolvido na síntese de ácidos micólicos (Dulberger *et al.*, 2020) — vai formar vários radicais e adutos, entre os quais um aduto covalente com o cofator NAD que atuará como inibidor competitivo do InhA (O'Connor & Brady, 2022; Rawat *et al.*, 2003). A isoniazida apresenta uma boa seletividade para as micobactérias, mesmo quando estas são resistentes a outros fármacos (*e.g.* PAS, STR) (Long, 1958), sendo um potente bactericida apenas ativo contra Mtb intracelular e extracelular em fase exponencial de crescimento (Hartkoorn *et al.*, 2007; Palomino & Martin, 2014).

Já a pirazinamida (Figura 1.3C), para além de ser um análogo sintético da nicotinamida (Maroushek, 2020), é um pró-fármaco que, após entrar nos bacilos por difusão passiva (Palomino & Martin, 2014), é hidrolisado em ácido pirazinoico (forma ativa) pela nicotinamidase/pirazinamidase (PncA) (Scorpio & Zhang, 1996; W. Shi *et al.*, 2011). Esta conversão permite, através de bombas de efluxo, a saída do composto para o meio extracelular (Palomino & Martin, 2014). Todavia, caso as bactérias se encontrem em ambientes ácidos — como no interior dos macrófagos ou em áreas de inflamação aguda (Maroushek, 2020) [*e.g.* lesões da TB (Mitchison, 1985)] —, o ácido pirazinoico vai ser protonado e volta a entrar nos bacilos, acumulando-se no interior destes (Zhang & Mitchison, 2003) e atuando em diferentes alvos. Um destes alvos é a proteína ribossomal S1 (RpsA), a qual se liga diretamente às cadeias a montante de RNA mensageiro e à subunidade 30S do ribossoma (Bycroft *et al.*, 1997; W. Shi *et al.*, 2011). Portanto, esta proteína é essencial aquando da tradução proteica e da separação ribossomal durante o processo de modificação pós-traducional (W. Shi *et al.*, 2011) e, como tal, a forma ativa da pirazinamida interfere no metabolismo das micobactérias. Mas, o principal alvo deste composto é a aspartato descarboxilase (PanD) (Anthony *et al.*, 2018), cujo os níveis são regulados pós-traducionalmente e que está envolvida na biossíntese de coenzima A (Gopal *et al.*, 2020; Rangunathan *et al.*, 2021). O ácido pirozinoico interage com a “tag” de degradação presente na região C-terminal desta enzima, promovendo, assim, a degradação da PanD pela protease caseinolítica ClpC1-ClpP, pelo que a forma ativa da pirazinamida está envolvida na interrupção da biossíntese de coenzima

A, bem como num processo suicida relacionado com um dos mecanismos de ação regulatório pós-traducional bacteriano (Gopal *et al.*, 2020). No entanto, a pirazinamida não apresenta uma atividade bactericida, mas sim uma atividade de esterilização (WHO, 2010), sendo mais ativa contra os bacilos em fase estacionária (Zhang *et al.*, 2002). Isto permite, então, a eliminação destas micobactérias (Alnimr, 2015) e, como tal, uma redução do tempo de tratamento da TB (Palomino & Martin, 2014).

Por outro lado, o etambutol (Figura 1.3B), derivado sintético da 1,2-etanediamina (WHO, 2010), é um fármaco bacteriostático (Palomino & Martin, 2014) que, apesar de conseguir entrar nos bacilos em qualquer fase de crescimento, só é ativo contra aqueles que estão na fase exponencial (Forbes *et al.*, 1962). Nestas últimas bactérias, o etambutol interfere na polimerização dos arabinanos da parede celular (Chakraborty & Rhee, 2015) ao inibir as arabinosiltransferases (EmbA, EmbB e EmbC) — as quais estão envolvidas nas sínteses dos arabinogalactanos (EmbA e EmbB) e dos lipoarabinomananos (EmbC) (Goude *et al.*, 2009) — e, como tal, impossibilitando o crescimento bacteriano. Adicionalmente, o etambutol aparenta ter efeitos sinérgicos com a isoniazida, uma vez que consegue induzir um aumento da inibição de um regulador transcricional TetR na expressão do gene *inhA*, pelo que aumenta a sensibilidade das micobactérias à isoniazida (Lee & Nguyen, 2022; Zhu *et al.*, 2019). Esta interação promove um aumento da eficácia deste último fármaco, o que indica que o etambutol é essencial para a redução da duração do tratamento da TB e para minimizar a emergência de estirpes resistentes à isoniazida (de Steenwinkel *et al.*, 2010).

A rifampicina (Figura 1.3D) é um antibiótico semissintético de largo espetro derivado da rifamicina, uma subclasse das ansamicinas (Chakraborty & Rhee, 2015; Piddock *et al.*, 2000), sendo ativa contra algumas bactérias de Gram-negativo e várias de Gram-positivo (Suresh *et al.*, 2022), entre as quais o agente causador da TB. A rifampicina é ativa contra bacilos em fase exponencial de crescimento e em fase estacionária (Mitchison, 1979) e apresenta atividade bactericida e de esterilização tanto em *Mtb* intracelular como extracelular (WHO, 2010), sendo, por isso, o mais eficaz dos fármacos anti-TB de primeira linha (WHO, 2022d). Esta eficácia deve-se ao facto de este fármaco, após entrar no bacilo por difusão passiva (A. Koch *et al.*, 2014), se ligar com elevada afinidade à subunidade β (RpoB) da RNA polimerase dependente de DNA (Hartmann *et al.*, 1967; Ning *et al.*, 2021). Esta interação bloqueia estericamente o processo de alongação do RNA na extremidade 5' (Campbell *et al.*, 2001), o que promove, então, a inibição da síntese de RNA (Ning *et al.*, 2021) e, conseqüentemente, do processo de transcrição (Dulberger *et al.*, 2020), levando à morte bacteriana (Ning *et al.*, 2021) sem que haja efeitos secundários no hospedeiro, visto que a rifampicina não é ativa na RNA polimerase de mamíferos (Suresh *et al.*, 2022).

Porém, no caso de os esquemas terapêuticos de primeira-linha não apresentarem eficácia ou estar-se perante casos de TB provocados por estirpes resistentes (WHO, 2019) será necessário recorrer aos fármacos anti-TB de segunda linha (*e.g.* aminoglicosídeos, fluoroquinolonas) (Figura 1.4), os quais são mais tóxicos e menos eficazes (WHO, 2022a) que os de primeira linha.

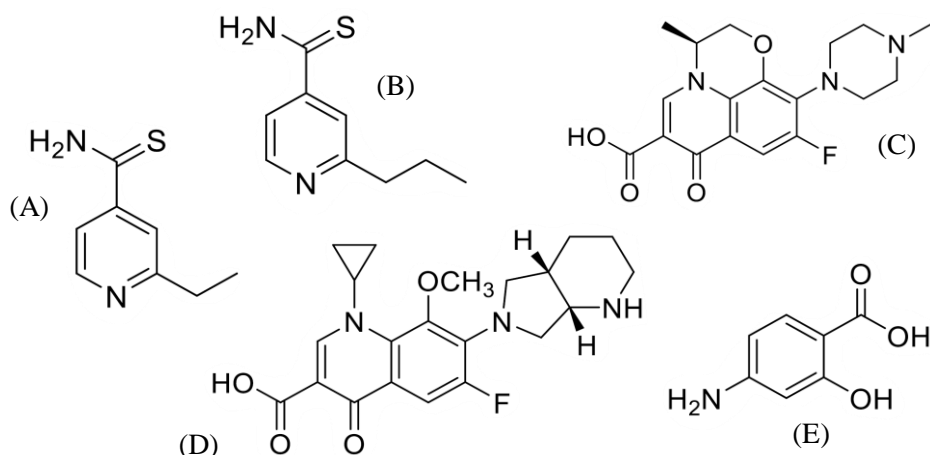


Figura 1.4 Fármacos anti-TB de segunda linha. (A) Etionamida; (B) Protionamida; (C) Levofloxacin; (D) Moxifloxacin; (E) PAS.

Os aminoglicosídeos são uma classe de antibióticos naturais ou semissintéticos de largo espectro derivados de actinomicetes (Krause *et al.*, 2016) que são ativos contra várias bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo e contra Mtb (Ho *et al.*, 1997; Papich, 2016). Contudo, como estes fármacos [*e.g.* amicacina, canamicina, STR, gentamicina (Grosset & Singer, 2013)] são hidrofílicos (Germovsek *et al.*, 2017) para que atravessem o invólucro celular é necessário que ocorra ligação iônica reversível à membrana celular externa (Ramirez & Tolmasky, 2010; Taber *et al.*, 1987), de modo a aumentar a permeabilidade da mesma (Krause *et al.*, 2016) seguindo-se dois passos dependentes de energia que são necessários para a subsequente passagem através da membrana celular interna (Jana & Deb, 2006; Krause *et al.*, 2016). Devido a estes últimos passos, os aminoglicosídeos têm, principalmente, atividade contra bactérias aeróbias, pois estas apresentam a cadeia de transporte eletrónico do ciclo de respiração celular (Jana & Deb, 2006), a qual possibilita a criação e manutenção do potencial de membrana que funciona como força motriz para a entrada dos aminoglicosídeos no citoplasma (Damper & Epstein, 1981). Aqui, apresentam uma atividade bactericida (B. D. Davis, 1987), já que ao ligarem-se irreversivelmente (Drew, 2010) ao RNA ribossomal 16S da subunidade 30S do ribossoma vão alterar a conformação do local aminoacil (Kotra *et al.*, 2000; Ramirez & Tolmasky, 2010). Isto leva à formação de péptidos truncados e à inibição da translocação do RNA transferência, ou seja, promove, por um lado, a síntese incorreta de proteínas e, por outro, a inibição da síntese proteica (Ibache-Quiroga *et al.*, 2018; Krause *et al.*, 2016), comprometendo, então, a viabilidade bacteriana.

Já as fluoroquinolonas são uma classe de antibióticos de largo espectro que, após chegarem ao citoplasma por difusão (Hooper & Jacoby, 2016), apresentam atividade seletiva e bactericida contra várias bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo (Baggio & Ananda-Rajah, 2021; Blondeau, 2004; Smith *et al.*, 2001). Esta atividade deve-se à inibição da DNA girase e da topoisomerase IV, as quais são essenciais para a viabilidade das bactérias (Palomino & Martin, 2014), visto estarem envolvidas na hidrólise transitória das duas cadeias de DNA aquando da replicação e da transcrição (Champoux, 2001; Khodursky *et al.*, 2000). No caso do agente causador da TB, como este apenas apresenta a DNA girase (Aubry *et al.*, 2004), as fluoroquinolonas [*e.g.* ciprofloxacina, levofloxacin (Figura 1.4C), moxifloxacin (Figura 1.4D), ofloxacin (Jnawali & Ryoo, 2013)] apenas vão interagir com esta enzima, interferindo com o complexo enzima-DNA e, conseqüentemente, alterando a conformação da DNA girase e o normal funcionamento da mesma (Blondeau, 2004). Este mecanismo resulta na formação de um complexo ternário formado pela fluoroquinolona, pela DNA girase e pelo DNA, promovendo a inibição da síntese

do DNA e consequente inibição do crescimento bacteriano, o que leva, por fim, à morte dos bacilos (Mitra *et al.*, 2021).

Além dos fármacos de segunda-linha mencionados, existem ainda outros como o PAS (Figura 1.4E), a etionamida/protionamida (Figura 1.4A/B) e a cicloserina, cujas atividades consistem na inibição do metabolismo do folato, da síntese proteica e da síntese de peptidoglicanos, respectivamente (Azam & Jayaram, 2015; Chakraborty *et al.*, 2013; Ramanathan *et al.*, 2019). Adicionalmente, alguns antibióticos como os supramencionados levofloxacina e moxifloxacina, bem como a clofazimina (interfere na penetração transmembranar e no ciclo redox intracelular) e a linezolida (inibe a síntese proteica) são fármacos que foram reaproveitados (Bahuguna & Rawat, 2020) para o tratamento da TB, apesar de também serem indicados para o tratamento de outras patologias. Todavia, na última década foram aprovados três novos fármacos (Figura 1.5) — bedaquilina, delamanida e pretomanida — para uso no tratamento da TB provocada por estirpes resistentes (Mudde *et al.*, 2022).

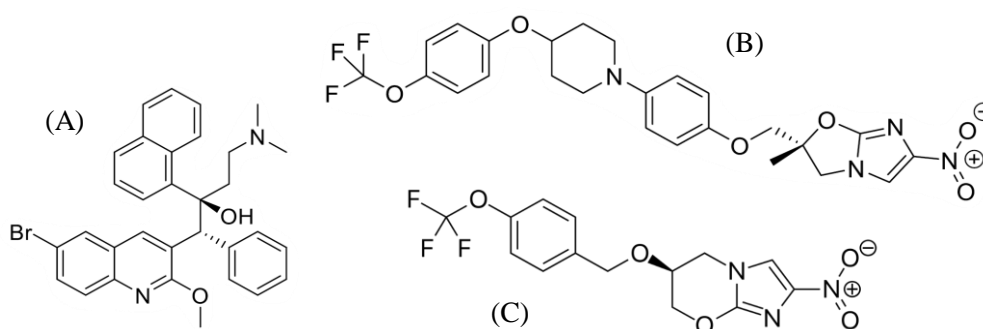


Figura 1.5 Fármacos anti-TB aprovados na última década. (A) Bedaquilina; (B) Delamanida; (C) Pretomanida.

Inicialmente conhecida como TMC207 ou R207910, a bedaquilina (Figura 1.5A) — pertencente à classe das diarilquinolinas — é um antibiótico de espectro alargado dentro do género *Mycobacterium* que tem atividade contra várias micobactérias (*e.g.* estirpes de *Mtb* sensíveis e resistentes, complexo *M. avium*, micobactérias não-tuberculosas) (Andries *et al.*, 2005; Huitric *et al.*, 2007), sendo ativa contra *Mtb* mesmo quando esta se encontra em fase estacionária e/ou em situação de hipoxia (Rao *et al.*, 2008). A atividade deste fármaco, apesar de bacteriostática nos primeiros dias, é sobretudo bactericida devido à ocorrência de alterações metabólicas nas bactérias (Hards *et al.*, 2015; Koul *et al.*, 2014). Isto porque a bedaquilina ao ligar-se às subunidades ϵ e γ do F-adenosina trifosfato (ATP) sintase (Koul *et al.*, 2007; Kundu *et al.*, 2016) irá influenciar os níveis de ATP, comprometendo, então, a viabilidade bacteriana (Hards *et al.*, 2015; Koul *et al.*, 2014).

A delamanida (OPC-67683) e a pretomanida (PA-824) (Figura 1.5B e Figura 1.5C, respetivamente) — pertencentes à classe dos nitroimidazóis — são pró-fármacos, cuja ativação depende do ciclo redox do cofator deazaflavina 420 (F_{420}) (Mudde *et al.*, 2022), mais especificamente da enzima nitroreductase dependente de F_{420} (Ddn) (Fujiwara *et al.*, 2018; Mudde *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2008) e, no caso da pretomanida, também da desidrogenase de ácidos hidroximicólicos dependente de F_{420} (Purwantini & Mukhopadhyay, 2013). Assim sendo, estes compostos têm mecanismos de ação comparáveis que consistem na interrupção da biossíntese de ácidos micólicos, quando em condições aeróbias, e na interferência da respiração bacteriana (Manjunatha *et al.*, 2009; Mudde *et al.*, 2022; Palomino & Martin, 2013; van den Bossche *et al.*, 2019). Isto porque, enquanto que a ativação da delamanida inibe a síntese de ácidos metoxi- e ceto-micólicos (Matsumoto *et al.*, 2006) e gera

intermediários reativos não caracterizados que interferem na respiração celular (Mudde *et al.*, 2022), a ativação da pretomanida promove a inibição de ácidos cetó-micólicos (Stover *et al.*, 2000) e a libertação de espécies reativas de nitrogênio (*e.g.* óxido nítrico) que leva à ocorrência de interferências no metabolismo das micobactérias e de danos em várias macromoléculas essenciais à sua sobrevivência, entre as quais proteínas intracelulares e lípidos da parede celular (Bahuguna & Rawat, 2020; Manjunatha *et al.*, 2009; Mudde *et al.*, 2022). Para além disto, ambos os fármacos apresentam atividade bactericida contra estirpes de *Mtb* sensíveis e resistentes, independentemente da fase de crescimento destas (Bahuguna & Rawat, 2020; Chen *et al.*, 2017; Stover *et al.*, 2000). Contudo, a delamanida é ativa contra *Mtb* intracelular e apresenta maior potência do que a pretomanida (Matsumoto *et al.*, 2006).

1.6. “Pipeline” de Fármacos Anti-TB

Apesar da existência de todos os fármacos supramencionados, é cada vez mais comum, tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos, a emergência e incidência de TB provocada por estirpes de *Mtb* resistentes a fármacos (DR-TB) (WHO, 2022d). Estas podem ser: monorresistentes (*e.g.* resistentes à isoniazida, resistentes à rifampicina); polirresistentes (*i.e.* resistentes a mais do que um fármaco de primeira linha sem que seja a combinação de isoniazida e rifampicina); multirresistentes (MDR-TB) (*i.e.* resistentes à isoniazida e à rifampicina); pré-extensivamente resistentes (pre-XDR-TB) (*i.e.* resistentes à rifampicina e à isoniazida, bem como a qualquer fluoroquinolona); e extensivamente resistentes (XDR-TB) (*i.e.* resistentes à rifampicina, à isoniazida e a pelo menos uma fluoroquinolona, bem como ou à bedaquilina e/ou à linezolida) (Hameed *et al.*, 2018; WHO, 2019, 2022a). Portanto, apesar de existirem várias terapias, a emergência e transmissão destas estirpes têm dificultado cada vez mais o controlo e o tratamento eficaz da TB (Yang *et al.*, 2020), fazendo com que esta patologia seja considerada um grave problema de saúde pública (WHO, 2022d). Atualmente, o tratamento standard da TB com uma duração de seis meses, apresenta apenas uma taxa de sucesso de 85% (WHO, 2022b), não sendo, por isso, totalmente eficaz no tratamento da TB, sobretudo, quando esta é provocada por estirpes resistentes. Assim, para estas são necessárias terapias de maior duração [*e.g.* 9 a 12 meses para MDR-TB, 15 a 24 meses para pre-XDR-TB e XDR-TB (Nahid *et al.*, 2019; WHO, 2022a)] que consistem no uso de uma combinação de um maior número de fármacos, principalmente de segunda-linha. Contudo, apesar de todas estas terapias serem essenciais para a prevenção de um curso desfavorável e da transmissão da TB (Suárez *et al.*, 2019), elas contribuem para o aumento de estirpes resistentes, visto que — devido às suas longas durações e componente multifármacos — provocam o surgimento de problemas de adesão e intolerância devido à quimiotoxicidade (Campaniço *et al.*, 2019; Gill *et al.*, 2022).

Logo, a descoberta, reaproveitamento e/ou desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da TB nunca foi tão importante, pois só desta forma é que se poderá diminuir a incidência e a mortalidade associadas a esta patologia. Contudo, persistem vários desafios relacionados não só com características de *Mtb* e da patologia que lhe está associada (Dartois & Rubin, 2022), mas também com o facto de os fármacos terem de cumprir requisitos específicos (Koul *et al.*, 2011). Por um lado, o desenvolvimento de terapias anti-TB está comprometido, pois o agente etiológico da TB apresenta uma parede celular rica em lípidos que dificulta a passagem dos fármacos pelas membranas (Koul *et al.*, 2011) e porque, apesar de serem bem conhecidos os mecanismos de resistência aos fármacos anti-TB, ainda não estão completamente elucidados como são os mecanismos de latência do *Mtb* e de como ocorre o influxo e o efluxo dos fármacos neste bacilo (Ginsberg & Spigelman, 2007; Koul *et al.*, 2011). Assim, é mais provável a emergência de estirpes de *Mtb* resistentes que — juntamente com fatores relacionados com o hospedeiro (*e.g.* tempo de resposta do sistema imunitário) — leva à existência de

uma grande variabilidade na progressão da TB e consequente demora significativa da cura desta doença quando comparada com outras infecções bacterianas do trato respiratório (Dartois & Rubin, 2022). Por outro lado, os fármacos experimentais devem diminuir a complexidade dos vários regimes terapêuticos, serem mais eficazes e potentes de modo a ser possível a redução da dosagem e da duração dos esquemas terapêuticos, bem como serem menos tóxicos e possibilitar a coadministração de medicamentos necessários ao tratamento de outras patologias (*e.g.* infecção por HIV, diabetes) sem que haja interações prejudiciais para o hospedeiro (Koul *et al.*, 2011). Estes fármacos também necessitam de ter novos e diferentes mecanismos de ação para que sejam eficazes contra estirpes sensíveis e resistentes (Ginsberg & Spigelman, 2007; Koul *et al.*, 2011). Adicionalmente, o facto de ser preciso desenvolver e validar novos modelos animais, biomarcadores (*e.g.* sequências de DNA bacteriano, compostos associados à ativação de TLRs), “surrogate endpoints” e abordagens pré-clínicas e regulatórias — para uma melhor previsão da duração e eficácia do tratamento da TB, assim como para otimização e testagem de combinações de fármacos e diminuição da duração dos ensaios clínicos — também constituem desafios associados ao tratamento da TB (Ginsberg & Spigelman, 2007; Koul *et al.*, 2011). A juntar a estes e aos anteriormente referidos, a falta de capacidade de realizar ensaios clínicos em países com elevada incidência de TB [*e.g.* Brasil, Índia, Papua-Nova Guiné, Serra Leoa (WHO, 2022a)] e a escassez de incentivos financeiros e políticos para o combate desta patologia agravam ainda mais a dificuldade de desenvolvimento de novos fármacos e regimes terapêuticos anti-TB (Ginsberg & Spigelman, 2007; Koul *et al.*, 2011). Deste modo, e tendo em conta que os objetivos do desenvolvimento de novos fármacos são conseguir erradicar de forma segura e rápida tanto a TB ativa como em fase de latência — provocada por estirpes de *Mtb* sensíveis e/ou resistentes — e permitir a coadministração de fármacos anti-TB e de medicamentos necessários ao tratamento de outras doenças (Ginsberg & Spigelman, 2007; Koul *et al.*, 2011), deve, então, dar-se atenção a certos aspetos. Tal, implica que, aquando do desenvolvimento dos fármacos anti-TB, é imperativo: dar primazia a combinações promissoras de fármacos; introduzir modificações químicas em estruturas de fármacos já conhecidos, de forma a melhorar a atividade bactericida, a tolerância, a segurança, os perfis de resistência e as propriedades farmacocinéticas/farmacodinâmicas; aumentar o conhecimento biológico de *Mtb* e da TB para otimização do tratamento desta patologia; entender a ligação entre tolerância e resistência nas várias subpopulações de *Mtb*; e, prevenir a reativação ou progressão da TB latente (Dartois & Rubin, 2022; Koul *et al.*, 2011).

Porém, apesar de todas as dificuldades supramencionadas, existe um conjunto de fármacos candidatos sob desenvolvimento ativo para tratamento da TB, cujo progresso é acompanhado numa “pipeline” de fármacos anti-TB (Working Group on New TB Drugs, n.d.-b). Esta é composta por uma etapa de identificação de compostos com atividade bactericida e otimização dos mesmos (“hit to lead”), uma de desenvolvimento pré-clínico (realizada *in vitro*, *in vivo* e modelos animais) e uma de desenvolvimento clínico (realizada em humanos) (Alffenaar *et al.*, 2022; Working Group on New TB Drugs, n.d.-b). A etapa de desenvolvimento pré-clínico compreende uma fase de otimização das eficácia, seletividade e propriedades de vários compostos (“lead optimization”) seguida da seleção de um fármaco candidato que, depois, é sujeito a uma fase crítica de compromisso para a síntese do princípio ativo do fármaco e para a testagem da segurança toxicológica do mesmo (“Good Manufacturing Practice”/“Good Laboratory Practice toxicology”). Já a etapa de desenvolvimento clínico é composta por ensaios multi-fase — fases I, II e III — de forma a avaliar os diferentes compostos e regimes terapêuticos experimentais. A fase I, realizada em ensaios com até 100 participantes, tem o objetivo de estudar a segurança, tolerância, farmacocinética, dosagem e interação entre fármacos, enquanto que a fase II, realizada em ensaios com até três centenas de participantes, visa identificar a dosagem terapêutica ótima do fármaco/regime experimental, bem como determinar a eficácia, a segurança e a tolerância a curto e médio prazo do mesmo. Se este apresentar resultados favoráveis na fase II, passa à fase III. Esta última

consiste em ensaios com até 3000 participantes que tem como objetivo confirmar a segurança e eficácia da nova terapia, de modo a assegurar que são cumpridos os requisitos necessários para se proceder ao registo e comercialização do novo fármaco/regime terapêutico anti-TB (Working Group on New TB Drugs, n.d.-b). Contudo, devido a uma série de fatores (*e.g.* longo período de replicação de Mtb, elevado número de doentes, longa duração dos tratamentos e do acompanhamento posterior), todo este processo de desenvolvimento e testagem de terapias anti-TB é muito moroso, sendo que as fases I, II e III demoram, pelo menos, um, dois e três anos, respetivamente (Dartois & Rubin, 2022; Ginsberg & Spiegelman, 2007). Por isso, apesar de nas últimas décadas existir em estudo uma quantidade considerável de fármacos/regimes terapêuticos anti-TB, apenas um reduzido número destes é que foi aprovado nos últimos anos (Dartois & Rubin, 2022).

Na etapa de desenvolvimento pré-clínico encontram-se em fase de otimização vários compostos que atuam como inibidores de proteínas essenciais à sobrevivência de Mtb [*e.g.* decaprenilfosforil- β -D-ribose 2'-epimerase (DprE1), girase, translocase-1, F-ATP sintase]. Nas seguintes fases desta etapa estão em desenvolvimento fármacos de diferentes classes, entre os quais as oxazolidinonas TBD-09, TBD-10 e OTB-658, as benzotiazinonas NTB-3119 e FNDR-100045 e ainda fármacos de novas classes (*e.g.* JSF-3285, MPL-447, FNDR-20364) (Working Group on New TB Drugs, n.d.-a, 2022). No entanto, desconhecem-se ainda aspetos fundamentais (*i.e.* alvos e mecanismos de ação) acerca da maioria dos fármacos presentes nas diferentes fases da etapa de desenvolvimento pré-clínico. Por exemplo, sabe-se que OTB-658 ao ligar-se, provavelmente, ao local peptidil da subunidade ribossomal 50S (Bozdogan & Appelbaum, 2004) tem uma atividade bacteriostática na fase inicial da infeção, um efeito de esterilização na fase estacionária de crescimento e um baixo potencial de interferência fármaco-fármaco (Guo *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2020). Adicionalmente, também já se determinou que, enquanto que NTB-3119 é um potente inibidor do *DprE1* (Wang *et al.*, 2023), os JSF-3285 e FNDR-20364 são, respetivamente, um inibidor da proteína transportadora β -cetoacil-acil (Rudraraju *et al.*, 2022) e um inibidor da atividade do GTPase associada ao ribossoma (Roubert *et al.*, 2022).

Por outro lado, relativamente aos fármacos que se encontram na etapa de desenvolvimento clínico já foi determinada uma maior quantidade de informações relacionadas com os seus alvos e mecanismos de ação, visto que estes compostos estão em estudo há mais tempo.

Na fase I, existem fármacos de novas classes, entre os quais o GSK-286 (Working Group on New TB Drugs, n.d.-a, 2022) que interfere no catabolismo do colesterol e que consegue penetrar nas lesões de TB, eliminado seletivamente Mtb intracelular (Nuermberger *et al.*, 2022; Reddy *et al.*, 2022). Encontram-se nesta fase do desenvolvimento clínico a benzotiazinona macozinona, a diarilquinolona TBAJ-876 e a oxazolidinona TBI-223 (Working Group on New TB Drugs, n.d.-a, 2022). Enquanto que o primeiro fármaco inibe a síntese de arabinogalactanos ao impossibilitar a atividade do DprE1 e o TBAJ-876 inibe a síntese de ATP ao impedir a atividade da ATP sintase e ao reduzir a concentração de ATP intrabacteriana, o TBI-223 inibe a síntese proteica ao ligar-se ao RNA ribossomal 23S da subunidade 50S do ribossoma, alterando a conformação deste e impedindo, conseqüentemente, que ocorra a ligação ao N-formilmetionil-RNA transferência (Fernandes *et al.*, 2022; Reddy *et al.*, 2022).

Já na fase II existem alguns fármacos de novas classes (*e.g.* TBA-7371e OPC-167832), assim como a benzotiazinona BTZ-043 (Working Group on New TB Drugs, n.d.-a, 2022) que inibem o *DprE1* e, conseqüentemente, a síntese de arabinogalactanos (Fernandes *et al.*, 2022; Kloss *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2022; Trefzer *et al.*, 2012). Nesta fase do desenvolvimento clínico também se encontram as oxazolidinonas delpazolida e sutezolida (Working Group on New TB Drugs, n.d.-a, 2022), que inibem a síntese proteica ao ligarem-se ao RNA ribossomal 23S da subunidade 50S do ribossoma (Fernandes *et al.*, 2022; Reddy *et al.*, 2022), e o β -lactâmico sanfetrinem (Working Group on New TB Drugs, n.d.-

a, 2022) que apresenta atividade bactericida e que é ativo contra *Mtb* intracelular (Ramon-Garcia *et al.*, 2019).

De notar que entre as fases I e II se encontram alguns fármacos, entre os quais o SPR720 e o Talacebec (Working Group on New TB Drugs, n.d.-a, 2022). Enquanto que o primeiro composto inibe a síntese de RNA ao impossibilitar a atividade do DNA girase B, o outro composto inibe a síntese de ATP através da interferência na respiração das micobactérias ao ocorrer a inibição da subunidade QcrB do complexo do citocromo bc1 (Fernandes *et al.*, 2022; Reddy *et al.*, 2022).

Por último, na fase III — apesar de nesta não existir, atualmente, nenhum fármaco “isolado” — encontram-se em estudo ensaios como TB Practecal e ZeNix (Working Group on New TB Drugs, n.d.-a, 2022), sendo que o objetivo destes é avaliar diferentes regimes terapêuticos. No que diz respeito ao TB Practecal, este pretende averiguar a segurança e eficácia de combinações de fármacos novas e já existentes para uso de tratamento oral com duração de seis meses (Berry *et al.*, 2022). Já o ensaio ZeNix visa determinar a segurança e eficácia de diferentes doses do regime constituído por bedaquilina, linezolida e pretomanida, o qual é usado para o tratamento da TB provocada por estirpes resistentes (Conradie *et al.*, 2022).

Ainda que na “pipeline” supramencionada só façam parte fármacos/regimes terapêuticos anti-TB, existem também, atualmente, em desenvolvimento cerca de duas dezenas de vacinas, tanto das tradicionais como das de nova geração (*e.g.* vetores virais, ácidos nucleicos) (WHO, 2022e).

1.7. Azauronas e derivados de Sphaerococcenol A como Fármacos Anti-TB

Para além de todos os fármacos anteriormente referidos, vários compostos são, frequentemente, testados, de modo a determinar se estes mostram atividade bactericida não só contra *Mtb*, mas também contra outros microrganismos. As auronas (Figura 1.6A) e o sphaerococcenol A (Figura 1.7) são exemplos disto mesmo.

As auronas — compostos da família dos flavonoides, que conferem pigmentação amarela a várias plantas (Ono *et al.*, 2006) — foram identificadas como agentes antimicrobianos, antiparasíticos, anti-inflamatórios e/ou anticancerígenos (Zwergel *et al.*, 2012). Com base nestes dados, foi determinado, subsequentemente, que os seus derivados — designados de azauronas (Figura 1.6B) — apresentam atividade tanto contra *Mtb*, como contra *Plasmodium falciparum* (um dos agentes etiológicos da malária) (Campaniço *et al.*, 2019; Carrasco *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2020). Desta forma, as azauronas podem ser vistas como fármacos promissores contra dois dos microrganismos (Campaniço *et al.*, 2019; Carrasco *et al.*, 2016) que mais contribuem para a mortalidade e morbidade associadas a doenças infecciosas (WHO, 2021, 2022a). Todavia, até agora, o espetro de atividade destes fármacos ainda não foi muito explorado e o mesmo acontece com o mecanismo de ação, apesar de se saber que este não envolve a inibição do complexo do citocromo bc1 (Campaniço *et al.*, 2019; Carrasco *et al.*, 2016). Adicionalmente, sabe-se que as azauronas, quando N-acetiladas, têm atividade contra estirpes de *Mtb* e que apresentam nenhuma ou baixa citotoxicidade para células humanas (Campaniço *et al.*, 2019).

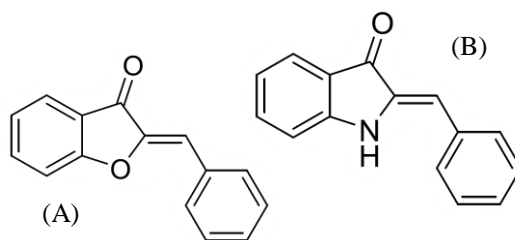


Figura 1.6 "Scaffolds" das Auronas e dos seus derivados. (A) "Scaffold" das Auronas; (B) "Scaffold" das Azauronas.

Também o sphaerococcenol A — bromo-diterpeno isolado da alga vermelha *Sphaerococcus coronopifolius* (Fenical *et al.*, 1976) — e vários dos seus derivados foram identificados como agentes antimicrobianos, antiparasíticos, antivirais, inseticidas e/ou anticancerígenos (Rodrigues *et al.*, 2015; Smyrniotopoulos, Vagias, *et al.*, 2008a). Assim sendo, relativamente à atividade antibacteriana foi, então, determinado que estes compostos halogenados apresentam atividade contra bactérias de Gram-positivo, incluindo bactérias multirresistentes e estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à *meticilina* (MRSA) (Etahiri *et al.*, 2001; Smyrniotopoulos *et al.*, 2010). Porém, apesar do sphaerococcenol A e os seus derivados poderem ser vistos como fármacos promissores contra bactérias que constituem problemas de saúde pública (Rodrigues *et al.*, 2015), ainda não foi avaliada se a sua atividade contra estas bactérias é bactericida ou não. Para além disto, até ao momento, não se tem conhecimento se a atividade antimicrobiana destes compostos abrange as micobactérias, em especial *Mtb*, mas sabe-se que no espetro das bactérias de Gram-negativo eles não apresentam atividade contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Rodrigues *et al.*, 2015).

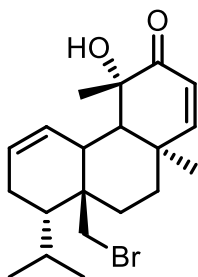


Figura 1.7 Estrutura química do sphaerococcenol A

1.8. Objetivos

Este projeto visa expandir os estudos relativos às azauronas e aos derivados de sphaerococcenol A para posterior avanço em estudos pré-clínicos. Assim, os objetivos deste projeto são:

- Caracterização do espetro de atividade das azauronas e do sphaerococcenol A e dos seus derivados contra diversas espécies bacterianas, incluindo bactérias de Gram-positivo e Gram-negativas, micobactérias não-tuberculosas e micobactérias tuberculosas;
- Determinação da atividade das azauronas em compartimentos intracelulares;
- Avaliação da atividade bactericida das azauronas e do sphaerococcenol A e dos derivados, bem como a cinética dessa mesma atividade;
- Determinação da taxa de resistência espontânea do sphaerococcenol A e dos seus derivados.

2. Materiais e Métodos

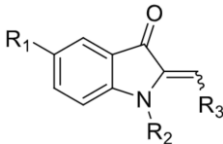



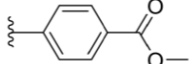

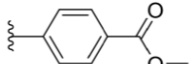
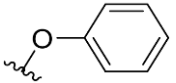
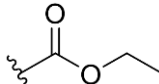
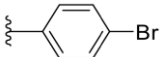
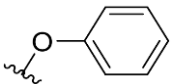
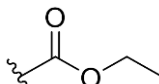
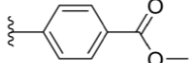
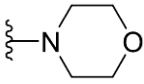

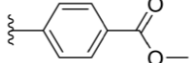
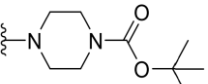
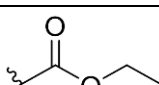
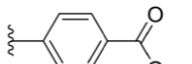
2.1. Compostos

O presente estudo abrangeu a caracterização da atividade antimicrobiana de dois grupos de compostos: azauronas e os derivados de sphaerococcenol A. Estes foram sintetizados, respetivamente, pelos grupos de Química Medicinal e Biologia Química do Instituto de Investigação do Medicamento (iMed) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O processo de síntese química e purificação de todos os compostos e respetivos derivados foi desta forma realizada nos laboratórios de origem no âmbito de diversos projetos em curso e, enviados ao Laboratório de Patogenómica Bacteriana e Resistência para caracterização do espectro de atividade antimicrobiana. Todos os compostos, usados no âmbito deste estudo, foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 1,0 mg/ml, preparadas várias alíquotas e armazenados a -20 °C.

2.1.1 Azauronas

Com vista à caracterização da atividade antimicrobiana, designadamente, a atividade antimicobacteriana, e tendo em conta estudos prévios (Campaniço, 2022), foram selecionadas cinco azauronas N-acetiladas (5a, 5j, 5n, 5v, 5x, 5ad e 5ag) (Tabela 2.1). O manuseamento e manipulação destes compostos, em soluções e meios de cultura, foi realizado na ausência de luz direta dado serem moléculas fotossensíveis.

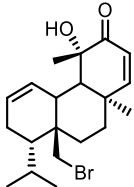
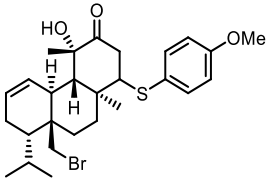
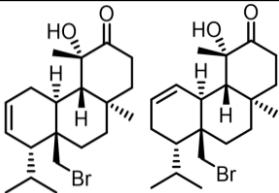
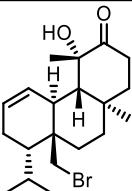
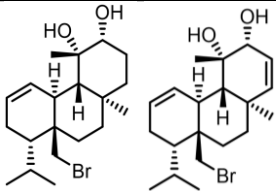
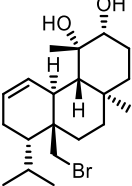
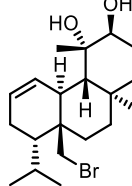
Tabela 2.1 "Scaffold" das azauronas e substituintes das azauronas testadas. Adaptado de (Campaniço, 2022)

			
Composto	R ₁	R ₂ (N-substituinte)	R ₃
5a	H		
5j	H		
5n	Br		
5v			
5x			
5ad			
5ag			

2.1.2 Derivados de Sphaerococcenol A

No que diz respeito ao sphaerococcenol A (MFSA) — bromo-diterpeno isolado a partir de *Sphaerococcus coronopifolius* — e aos seus derivados foram selecionados sete compostos, incluindo dois compostos cuja composição resulta da mistura de duas moléculas derivadas distintas (MF132 e MF139) (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 Estruturas químicas do MFSA e dos seus derivados

MFSA	
	
MF97	MF132
	
MF135	MF139
	
MF153F8	MF153F15
	

2.2. Isolados e Estirpes de Espécies Bacterianas

Com o intuito de caracterizar o espectro de atividade das azauronas e dos derivados de sphaerococcenol A estudados, foram selecionadas, consoante os resultados obtidos ao longo do estudo, diversas espécies de bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo e micobactérias (Tabela 2.3). Desta forma, foram incluídas estirpes de referência provenientes de diversas coleções de culturas e estirpes de isolados clínicos provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Patogenômica Bacteriana e Resistência, sendo que todas estas estirpes apresentam diferentes fenótipos e mecanismos de resistência. Adicionalmente, com o objetivo de caracterizar a atividade antimicobactericida, foram incluídas diversas espécies de micobactérias de crescimento rápido e de crescimento lento (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 Isolados e Estirpes de Espécies Bacterianas

Grupo Bacteriano	Isolado	Espécie	Observações
Gram-negativo	ATCC25922	<i>Escherichia coli</i>	
	ATCC27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Gram-positivo	ATCC6633	<i>Bacillus subtilis</i>	Resistente à Vancomicina/Teicoplanina (<i>vanA</i>)
	CIP 64.63	<i>Bifidobacterium longum</i>	
	ATCC11420	<i>Enterococcus faecalis</i>	
	ATCC51299	<i>Enterococcus faecalis</i>	
	H164	<i>Enterococcus faecalis</i>	
	CIP 103525	<i>Enterococcus flavescens</i>	
	CIP 106999	<i>Enterococcus galinarum</i>	
	CIP 5855	<i>Enterococcus hirae</i>	
	CIP A159	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
		<i>Listeria innocua</i>	
	CIP 53.160	<i>Micrococcus luteus</i>	
	ATCC6538	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	ATCC9144	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	ATCC25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	
ATCC43866	<i>Staphylococcus aureus</i>		
CIP 106414	<i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA MRSA; Resistência Intermédia à Vancomicina (VISA)	
ATCC12228	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
Micobactérias		<i>Mycobacterium aurum</i>	Micobactéria não-tuberculosa de crescimento rápido
	G67	<i>Mycobacterium africanum</i>	Micobactéria tuberculosa de crescimento lento; Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	ATCC25291	<i>Mycobacterium avium</i>	Micobactéria não-tuberculosa de crescimento lento; Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
	INIAV11887	<i>Mycobacterium bovis</i>	Micobactéria tuberculosa de crescimento lento; Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	ATCC35734	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	Micobactéria tuberculosa de crescimento lento; Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
		<i>Mycobacterium canettii</i>	Micobactéria tuberculosa de crescimento lento; Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	IMHT146/11	<i>Mycobacterium colombiense</i>	Micobactéria não-tuberculosa de crescimento lento; Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
		<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Micobactéria não-tuberculosa de crescimento rápido
	GL1/17	<i>Mycobacterium intercellulare</i>	Micobactéria não-tuberculosa de crescimento lento; Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
	ATCC27294	Mtb	Micobactéria tuberculosa de crescimento lento; Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ATCC607	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Micobactéria não-tuberculosa de crescimento rápido	

Com a exceção das micobactérias de crescimento lento, a cultura das demais espécies bacterianas foi realizada em meio Mueller-Hinton Agar (MHA) com incubação a 37 °C por um período de 18h ou, de 72h (micobactérias de crescimento rápido). A cultura de micobactérias de crescimento lento foi realizada em meio de Lowenstein-Jensen (Becton-Dickinson) com incubação a 37 °C por um período de 3-4 semanas, à exceção de *M. bovis* cuja cultura foi realizada em meio de Middlebrook 7H10 (Becton-Dickinson) suplementado com suplemento de ácido oleico, albumina, dextrose e Catalase (OADC) 10% (p/v), glicerol 0,5% e piruvato de sódio 75mM. Todas as culturas de micobactérias de crescimento lento foram realizadas no Laboratório de Biossegurança de Nível 3 (BSL-3) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

2.3. Atividade Antibacteriana das Azauronas e dos Derivados de Sphaerococcol A

Todos os ensaios com vista ao *screening* e caracterização da atividade antimicrobiana dos compostos incluídos no estudo foi realizada de acordo com os procedimentos padrão e normas estabelecidos pelo EUCAST (“European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”) para testes realizados por microdiluição em meio líquido (EUCAST, 2022). Este método baseia-se na observação de crescimento dos microrganismos ao longo de um conjunto de diluições seriadas de 1:2, sendo que no presente estudo, geralmente, respeita o intervalo de 0,125-32,0 ou 64,0 µg/mL. Isto permite, então, a determinação da concentração mínima inibitória (MIC), designada como a concentração mais baixa que inibe o crescimento bacteriano visível a olho nu.

O procedimento da determinação das MICs para as bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo e micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido foi realizado em meio de Mueller-Hinton líquido (MHB) com uma concentração final do microrganismo correspondente a aproximadamente 5×10^5 CFU/mL. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços de fundo em U, inicialmente preparadas de forma a conterem o dobro do intervalo de concentrações pretendido em cada linha e num volume de 50 µL. O inóculo foi preparado através da preparação de uma suspensão ajustada à escala de McFarland 0,5 seguida de uma diluição 1:100 em MHB, após a qual foi adicionado a cada poço um volume igual ao meio previamente preparado de modo a atingir um volume final de 100 µL. Em todos os ensaios foi incluído um controlo do solvente usado na proporção máxima utilizada (5-10%), um controlo positivo (sem composto) e um controlo negativo (controlo de esterilidade do meio). As microplacas foram incubadas a 37 °C “overnight” (ca. 18h), com exceção dos testes que envolveram as micobactérias cujo tempo de incubação foi de 72h. Após o período de incubação, os resultados foram registados através da observação de crescimento visível a olho nu num espelho invertido, considerando-se a MIC como a concentração mais baixa a inibir a formação de crescimento visível. Foram realizadas entre duas a três réplicas para cada ensaio.

A determinação das MICs para as micobactérias pertencentes aos MTBC e MAC seguiu os mesmos princípios gerais, embora com as adaptações em vigor para o teste de suscetibilidade para micobactérias mais recentemente aprovado pelo EUCAST (Schön *et al.*, 2021): i) os poços periféricos foram preenchidos com água destilada estéril com o propósito de minimizar a evaporação durante incubações prolongadas; ii) o volume final por poço foi de 200 µL; iii) além dos controlos já mencionados incluiu-se um controlo de inóculo a 1%, preparado por duas diluições sucessivas 1:10 do inóculo utilizado. Para estes ensaios, usou-se como meio de cultura o meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC 10% e glicerol 0,5%, tendo a preparação do inóculo e subsequente inoculação das microplacas sido realizada em BSL-3. As microplacas foram incubadas a 37 °C, tendo sido registados os resultados ao 10º e 14º dia de incubação e considerados os resultados no primeiro dia em que se observou crescimento visível no controlo positivo a 1%.

Para a seleção dos valores das MICs finais, foi considerado o valor concordante entre pelo menos duas réplicas, sendo que os resultados foram representados graficamente com o auxílio do software *GraphPad Prism 8.0.2* (GraphPad Software, 2019a).

2.3.1. Atividade Antibacteriana das Azauronas na presença de Inibidores de Bombas de Efluxo

O Para determinação das MICs na presença de inibidores de efluxo, foram testadas a reserpina e a clorpromazina (CPZ), utilizando o mesmo princípio anteriormente descrito, mas assegurando uma

concentração constante dos inibidores [80 µM reserpina e 22,5 µM CPZ (Li *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2016)]

Estes ensaios foram realizados para as azauronas 5a, 5j e 5x contra *S. aureus* (ATCC25923), *Escherichia coli* e micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido (*M. aurum*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*). Adicionalmente, testou-se a azaurona 5a na presença de inibidores de efluxo contra Mtb e BCG.

Os valores finais foram considerados como os valores das MIC obtidas que apresentaram concordância em pelo menos duas réplicas.

2.4. Concentração Mínima Inibitória (MBC)

A MBC foi determinada para o composto MF153F8 nas espécies e isolados bacterianos contra os quais demonstrou atividade. O ensaio foi realizado no seguimento da determinação da MIC em microplaca, através de “spot plating” por inoculação de gotas de 5 µL provenientes dos poços onde foram obtidos os resultados das MICs em meio MHA, seguido de incubação a 37 °C “overnight”. Considerou-se a MBC como a concentração mínima que resulta na morte bacteriana, classificando-se a atividade do composto como bactericida quando o rácio MBC/MIC ≤ 4 µg/mL, ou, bacteriostático quando este mesmo rácio > 4 µg/mL (Mogana *et al.*, 2020).

2.5. Curvas de Morte na presença da Azaurona 5a e do derivado MF153F8

Com o intuito de determinar a atividade bactericida ao longo de um intervalo de tempo definido e compreender a cinética de morte induzida pelos compostos em estudo, procedeu-se à determinação da curva de morte para a azaurona 5a contra Mtb e para composto MF153F8 contra *E. faecalis* (ATCC11420), *S. aureus* (ATCC25923) e *M. smegmatis*.

Para a determinação da cinética de morte exercida pela azaurona 5a em Mtb, preparou-se, a partir de uma cultura em meio LJ com 3-4 semanas, uma suspensão bacteriana ajustada à escala de McFarland 0,5, subsequentemente diluída 1:100 em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC 10%, glicerol 0,5% e composto 5a 8xMIC (Campaniço, 2022) num volume total final de 1,5 mL. Esta suspensão foi incubada a 37 °C com agitação por um período de 48 h durante o qual foram retiradas amostras de 100 µL para determinação do número de CFU/mL às 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h e 48 h através da preparação de diluições seriadas 1:10 (10^0 - 10^{-3}) inoculadas por espalhamento em meio gelosado de Middlebrook 7H10 suplementado com OADC 10% e glicerol 0,5%. A contagem de colónias foi efetuada após um período de incubação a 37 °C durante três a quatro semanas. Todo o procedimento com esta bactéria foi realizado em ambiente BSL-3.

Para as restantes espécies, o procedimento foi semelhante, embora tenha sido realizada em meio MHB suplementado com MF153F8 4xMIC/8xMIC (32 µg/mL), nos mesmos timepoints, com a determinação do número de CFUs/mL realizado por plaqueamento em meio MHA, com incubação a 37 °C durante 24 h (bactérias de Gram-positivo) ou 72 h (micobactérias).

Todos os ensaios realizados foram feitos em triplicado e incluíram um controlo de crescimento na ausência de composto.

Com recurso ao software *GraphPad Prism* 8.0.2 (GraphPad Software, 2019a), realizou-se a representação gráfica dos resultados obtidos com transformação logarítmica de base 10 do número de CFUs/mL (\log_{10} CFU/mL) em função do tempo de incubação, de modo a representar-se cada uma das curvas de morte na presença da azaurona 5a e do derivado MF153F8. A atividade bactericida — ocorrência de 99,9% de morte bacteriana — foi definida como a diminuição \log_{10} CFU/mL ≥ 3 num determinado intervalo de tempo (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999; Sim *et al.*, 2014).

2.6. Citotoxicidade da Azaurona 5a em células THP-1

De modo a avaliar a atividade das azauronas no compartimento intracelular foi utilizada uma linha celular monocítica (THP-1), passível de diferenciação em macrófagos. Procedeu-se previamente à determinação da citotoxicidade da azaurona 5a nesta linha celular utilizando um intervalo de concentrações que variou entre 0,125-64,0 $\mu\text{g/mL}$. Para tal, procedeu-se à cultura de células THP-1 em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal de bovino 10%, glutamina 1%, piruvato de sódio 1%, aminoácidos não-essenciais 1%, penicilina-STR 1% e HEPES 1%, até se atingir 10^6 células/mL. Após isto procedeu-se à distribuição de 5×10^4 células por poço em placa de 96 poços de fundo plano, ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com acetato de miristato de forbol (PMA) a 200 nM, de modo a permitir a diferenciação celular durante três dias a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. Depois da diferenciação, confirmada por observação microscópica num microscópio invertido, procedeu-se à mudança de meio para meio RPMI 1640 suplementado sem PMA e incubou-se a 37 °C com 5% de CO₂ durante 24 h, procedendo-se, em seguida, à substituição do meio por meio RPMI 1640 suplementado com o composto 5a nas concentrações supramencionadas. A concentração de DMSO presente em cada poço não ultrapassou 1% (v/v). Ao fim de sete dias de incubação, adicionou-se 20 μL Alamar Blue 10% (v/v) num volume de 180 μL e, após 24 h a 37 °C com 5% de CO₂, transferiu-se o sobrenadante para uma microplaca de fundo escuro e procedeu-se à leitura da fluorescência a 570/595 nm num aparelho Cytation 7 (BioTek). Os ensaios incluíram controlos positivos com células THP-1 em meio de RPMI 1640 na ausência de composto e controlos negativos com células THP-1 em meio de RPMI 1640 na presença de DMSO em diferentes concentrações (2,5%, 5% e 10%).

Os dados obtidos foram analisados de modo a obter-se o valor correspondente à concentração inibitória média (IC50), normalizados face aos valores de fluorescência obtidos na ausência de composto, e representados graficamente com o auxílio do software *GraphPad Prism* 8.0.2 (GraphPad Software, 2019b).

2.7. Atividade *ex vivo* da Azaurona 5a num modelo de infeção com macrófagos

A atividade *ex-vivo* das azauronas contra Mtb foi determinada em células infetadas THP-1 diferenciadas, utilizando a azaurona 5a em concentrações inferiores à IC50 previamente determinada (0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$).

Numa microplaca, distribuiu-se 5×10^4 de células THP-1 em meio RPMI 1640 suplementado com PMA 200 nM e incubou-se a 37 °C durante três dias de modo a atingir a diferenciação em macrófagos. Seguidamente, e após confirmação da diferenciação por observação microscópica num microscópio invertido, as células foram incubadas em meio RPMI 1640 sem PMA durante 24 h a 37 °C com 5% de CO₂. A infeção das células THP-1 com Mtb foi realizada numa multiplicidade de infeção de 10:1, preparando-se um inóculo ajustado à escala de McFarland 0,5. Depois de 3 h de incubação a 37

°C, lavou-se as células três vezes com tampão fosfato-salino (PBS) 1x e adicionou-se amicacina 200 µg/mL, a qual ficou a atuar 1 h. As células foram lavadas três vezes com PBS 1x e distribuiu-se meio RPMI 1640 sem suplementação com antibióticos, mas suplementado com o fármaco 5a nas diferentes concentrações supramencionadas. Para além deste composto, foram também preparados controlos com isoniazida 1 µg/mL e rifampicina 1 µg/mL. Após dois e cinco dias, efetuou-se a recolha pós-infeção através da lise com Triton X-100 1% durante 5 min. O lisado foi, consequentemente, diluído até 10^{-9} e realizou-se “spot plating” em meio Middlebrook 7H10 suplementado com OADC 10% e glicerol 0,5%, deixando-se a incubar a 37 °C durante duas a três semanas, após as quais se contou o número de colónias que surgiram. Todo o procedimento foi realizado em ambiente de BSL-3 utilizando uma proporção de DMSO máxima por poço de 1%.

Os dados obtidos foram representados graficamente e sujeitos a uma análise estatística onde não se assumiu uma distribuição normal dos valores obtidos pelo que se utilizou o teste Mann-Whitney (não-paramétrico) considerando os níveis de significância estatística de $p < 0,05$ e $p < 0,01$ através do software *GraphPad Prism* 8.0.2 (GraphPad Software, 2019c).

3. Resultados e Discussão

3.1. Azauronas

As azauronas — compostos derivados das auronas — já mostraram ter atividade tanto contra *Mtb* como contra *Plasmodium falciparum*, porém pouco mais se sabe sobre o seu espectro de atividade e o mesmo acontece relativamente ao seu mecanismo de ação (Campaniço *et al.*, 2019; Carrasco *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2020). Deste modo, os ensaios inframencionados visam caracterizar o espectro de atividade das azauronas, avaliar a atividade bactericida e a cinética das mesmas, bem como determinar a sua atividade em compartimentos intracelulares.

3.1.1. Espectro de atividade das azauronas

Com o objetivo de compreender melhor a atividade antimicrobiana das azauronas N-acetiladas, procurou-se caracterizar, inicialmente, a sua atividade frente a espécies bacterianas de Gram-negativo e de Gram-positivo, elegendo-se para este efeito estirpes de referência de *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, e *S. aureus*. Em paralelo, dado existirem dados prévios relativos à atividade anti-TB das azauronas N-acetiladas, procurou-se também numa primeira fase avaliar a atividade antimicobacteriana deste grupo de moléculas contra micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido: *M. aurum*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*. Foi, para tal, determinada a MIC por microdiluição em meio líquido (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Atividade antibacteriana de azauronas contra bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo e micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido

Composto	MIC µg/mL						
	<i>Escherichia coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i> (ATCC11420)	<i>S. aureus</i> (ATCC25923)	<i>M. aurum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. smegmatis</i>
5a	> 64 (> 187,58 µM)	> 64 (> 187,58 µM)	> 64 (> 187,58 µM)	32 (93,79 µM)	> 64 (> 187,58 µM)	> 64 (> 187,58 µM)	> 64 (> 187,58 µM)
5j	> 64 (> 209,63 µM)	> 64 (> 209,63 µM)	> 64 (> 209,63 µM)	64 (209,63 µM)	> 64 (> 209,63 µM)	> 64 (> 209,63 µM)	> 64 (> 209,63 µM)
5n	> 64 (> 166,58 µM)	> 64 (> 166,58 µM)	> 64 (> 166,58 µM)	> 64 (> 166,58 µM)	> 64 (> 166,58 µM)	> 64 (> 166,58 µM)	> 64 (> 166,58 µM)
5v	> 64 (> 138,13 µM)	> 64 (> 138,13 µM)	> 64 (> 138,13 µM)	> 64 (> 138,13 µM)	> 64 (> 138,13 µM)	> 64 (> 138,13 µM)	> 64 (> 138,13 µM)
5x	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)
5ad	> 64 (> 193,63 µM)	> 64 (> 193,63 µM)	> 64 (> 193,63 µM)	> 64 (> 193,63 µM)	64 (193,63 µM)	> 64 (> 193,63 µM)	> 64 (> 193,63 µM)
5ag	> 64 (> 123,17 µM)	> 64 (> 123,17 µM)	> 64 (> 123,17 µM)	> 64 (> 123,17 µM)	> 64 (> 123,17 µM)	> 64 (> 123,17 µM)	> 64 (> 123,17 µM)

A partir dos dados obtidos, pode afirmar-se que as azauronas selecionadas não apresentaram atividade contra as espécies estudadas, verificando-se na maioria das situações MICs > 64 µg/mL. Tendo em conta que estes compostos apresentam atividade contra *Mtb* (Campaniço *et al.*, 2019), os resultados sugerem que as azauronas aparentam ser fármacos com um espectro de atividade restrito ao MTBC e, eventualmente, micobactérias não-tuberculosas de crescimento lento (*i.e.* MAC). De forma a poder verificar-se esta hipótese, e dado que os estudos anteriores destinados à caracterização da atividade deste grupo de moléculas compreenderam apenas ensaios contra o *M. tuberculosis sensu stricto*, foi determinada a atividade das azauronas para um maior número de espécies pertencentes ao MTBC (*Mtb*,

M. africanum, *M. bovis* e *M. canettii*) e também ao MAC (*M. avium*, *M. colombiense* e *M. intracellulare*) (Figura 3.1).

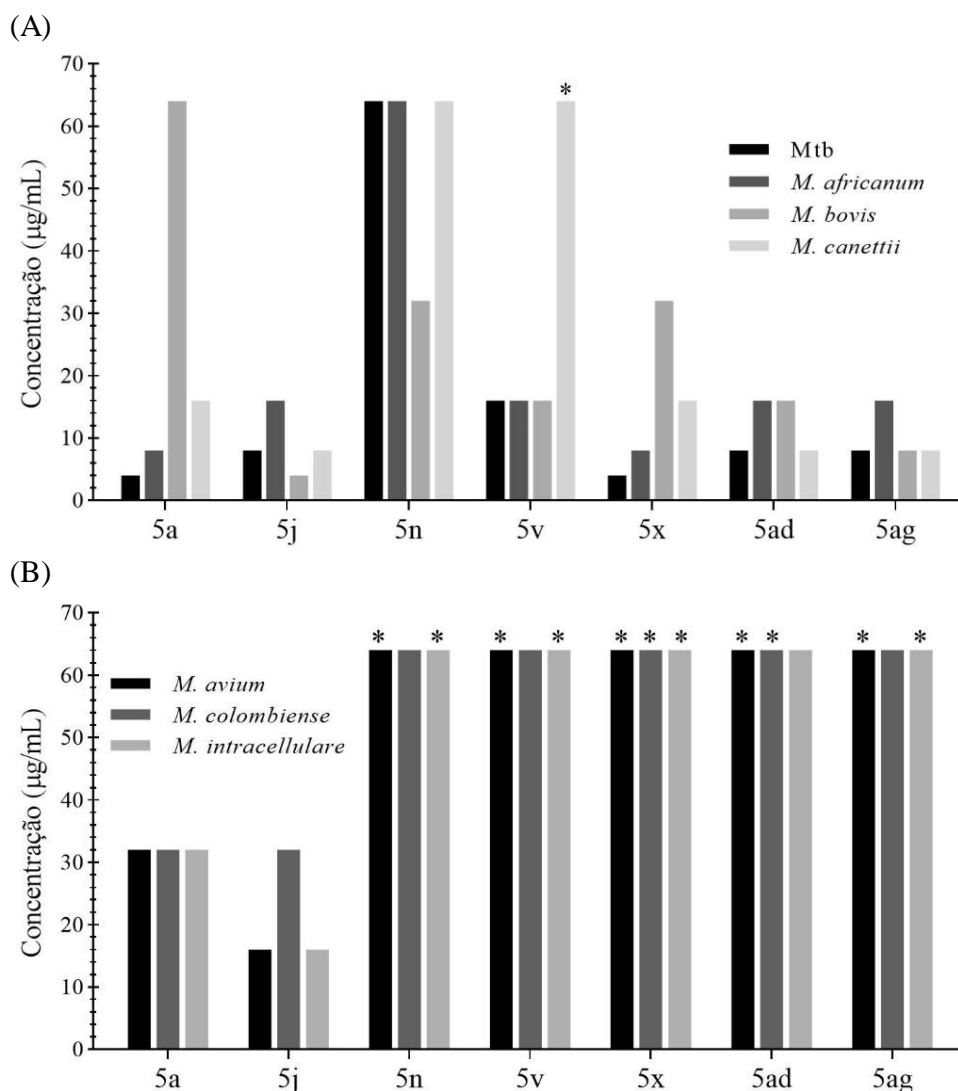


Figura 3.1 Representação gráfica dos valores das MICs das azauronas testadas obtidas para as micobactérias pertencentes ao MTBC e ao MAC. O símbolo * corresponde a valor de MIC > 64 µg/mL. **(A)** Atividade antibacteriana de azauronas contra micobactérias pertencentes ao MTBC; **(B)** Atividade antibacteriana de azauronas contra micobactérias pertencentes ao MAC.

Os valores das MICs obtidas para as micobactérias que pertencem ao MTBC e ao MAC (Figura 3.1) revelam, de facto, uma maior eficácia das azauronas contra as micobactérias tuberculosas de crescimento lento. Verificou-se que a larga maioria das azauronas testadas apresentam atividade associada a valores de MIC reduzidos (≤ 16 µg/mL) para as estas micobactérias (Figura 3.1A), sendo que apenas as azauronas 5a e 5j apresentam alguma atividade contra as micobactérias não-tuberculosas de crescimento lento e, mesmo assim, essa atividade apenas é conseguida com valores de MIC ≥ 16 µg/mL (Figura 3.1B). Portanto, pode concluir-se que as azauronas têm, na sua maioria, um espectro de atividade que compreende apenas as micobactérias pertencentes ao MTBC.

No entanto, as azauronas são compostos com pouca estabilidade metabólica e tempos de semivida curtos (*e.g.* azaurona 5a tem 21 min de semivida) (Campaniço *et al.*, 2023), daí que os resultados obtidos para estas micobactérias não apresentem uma grande concordância entre as várias espécies do MTBC (Figura 3.1A) nem dentro da mesma espécie (resultados para Mtb de Figura 3.1A *vs.* resultados presentes em Campaniço *et al.*, 2023). Mesmo assim, pode retirar-se conclusões acerca do modo como a filogenia influencia a atividade das azauronas e de como a estrutura dos seus diferentes derivados influencia a atividade contra essas micobactérias. Em primeiro lugar, a atividade das azauronas é, na sua maioria, mais semelhante entre as micobactérias que estão filogeneticamente mais próximas já que a atividade demonstrada por estas moléculas para a micobactéria mais próxima do ancestral comum do MTBC (*i.e.* *M. canettii*) é, geralmente, intermédia quando comparada com *M. bovis* e com as linhagens humanas (*i.e.* Mtb e *M. africanum*) e, porque a atividade das azauronas entre estas últimas apresenta alguma coerência — atividade dos fármacos contra Mtb é, em geral, duas vezes maior do que contra *M. africanum* — enquanto que a atividade das azauronas contra a linhagem animal (*i.e.* *M. bovis*) apresenta algumas disparidades quando comparadas com a atividade contra as linhagens humanas. Estes factos indiciam, que o processo evolutivo das diferentes espécies compreendeu perda/ganho de características (Bespiatykh *et al.*, 2021; Brosch *et al.*, 2002; Kanabalan *et al.*, 2021) associadas ou não uma maior eficácia das azauronas. Por último, tendo em conta a estrutura das azauronas (Tabela 2.1) e focando apenas nos resultados de Mtb — contra a qual estes fármacos tem boa seletividade (Campaniço *et al.*, 2019, 2023) e são mais eficazes (Figura 3.1A) —, pode afirmar-se que tanto a eficácia como a potência da atividade das azauronas são características que estão dependentes dos seus diferentes substituintes. A substituição de R₁ parece promover a eficácia dos fármacos, enquanto que a combinação das substituições de R₂ e R₃ parece ser determinante da potência dos mesmos. Em relação à eficácia, as azauronas que apresentam um hidrogénio em R₁ aparentam ter maior atividade que as outras que apresentam nesse local um grupo substituinte de maiores dimensões (*e.g.* 5j *vs.* 5n e 5ad), pois este pode dificultar a passagem do composto pelas membranas das micobactérias. Já relativamente à outra característica da atividade antibacteriana, as azauronas que apresentam N-acetil como substituinte em R₂ têm maior potência quando o substituinte em R₃ é um *para*-bromo-benzeno (*e.g.* 5a *vs.* 5j), enquanto que as que apresentam N-carbamoil como substituinte em R₂ têm maior potência quando o substituinte em R₃ é um ácido carboxílico (*e.g.* 5v *vs.* 5x), o que mostra que, possivelmente, as substituições de R₂ e R₃ estão dependentes uma da outra para conferir potência ao fármaco. Todavia, todas estas ilações retiradas acerca do modo como a estrutura das azauronas influenciam a sua atividade não estão totalmente de acordo com estudos prévios (Campaniço *et al.*, 2023), pois, tal como referido anteriormente, as azauronas estudadas apresentam pouca estabilidade.

Portanto, apesar de através dos resultados supramencionadas se poder admitir que as azauronas apresentam atividade contra micobactérias pertencentes ao MTBC, mas que são inativas ou têm ligeira atividade contra as restantes espécies bacterianas em estudo, pouco se pode afirmar sobre o mecanismo de ação destes fármacos. Deste modo, é útil saber, por exemplo, se a presença de inibidores de bombas de efluxo pode ou não alterar a atividade das azauronas contra essas bactérias. Esta hipótese tem como ponto de partida o facto de as bombas de efluxo serem estruturas membranares com elevada promiscuidade que permitem a regulação do meio intracelular bacteriano ao expulsarem uma grande gama de substratos estruturalmente diferentes (*e.g.* metabolitos secundários, antibióticos, moléculas de quorum sensing) para o meio extracelular (Du *et al.*, 2018; Gygli *et al.*, 2017; Song & Wu, 2016). Se estes substratos forem antibióticos, as bombas de efluxo funcionarão como mecanismos de tolerância/resistência a estes, através da constante manutenção de concentrações subletais dos antibióticos (Laws *et al.*, 2022), promovendo, então, a emergência e estabelecimento de mutações de resistência nas populações bacterianas (Gygli *et al.*, 2017). Desta forma, a presença de inibidores de bombas de efluxo compromete o transporte dos antibióticos para o meio extracelular, o que leva à

acumulação desses no interior das bactérias e consequente aumento da eficácia dos antibióticos e diminuição do fenótipo de resistência dessas populações bacterianas (Sharma *et al.*, 2019; Song & Wu, 2016). Logo, como a combinação dos inibidores das bombas de efluxo com os antibióticos permite elucidar se o mecanismo de ação destes últimos envolve ou não bombas de efluxo, selecionou-se três das azauronas para determinar se as suas atividades antibacteriana sofrem alterações na presença dos inibidores de bombas de efluxo reserpina e CPZ. Os valores das MICs obtidas na presença destes inibidores para algumas das espécies contra as quais as azauronas não apresentam atividade encontram-se apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Atividade antibacteriana das azauronas 5a, 5j e 5x na presença dos inibidores de bombas de efluxo reserpina e CPZ contra *E. coli*, *S. aureus*, micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido

Inibidor de Bomba de Efluxo	Composto	MIC µg/mL				
		<i>Escherichia coli</i>	<i>S. aureus</i> (ATCC25923)	<i>M. aurum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. smegmatis</i>
Reserpina	5a	> 64 (> 187,58 µM)	64 (187,58 µM)	> 64 (> 187,58 µM)	> 64 (> 187,58 µM)	> 64 (> 187,58 µM)
	5j	> 64 (> 209,63 µM)	> 64 (> 209,63 µM)	> 64 (> 209,63 µM)	> 64 (> 209,63 µM)	> 64 (> 209,63 µM)
	5x	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)
CPZ	5a	> 64 (> 187,58 µM)	> 64 (> 187,58 µM)	> 64 (> 187,58 µM)	> 64 (> 187,58 µM)	64 (187,58 µM)
	5j	> 64 (> 209,63 µM)	> 64 (> 209,63 µM)	> 64 (> 209,63 µM)	> 64 (> 209,63 µM)	> 64 (> 209,63 µM)
	5x	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)	> 64 (> 149,73 µM)

As azauronas 5a, 5j e 5x foram selecionadas para este ensaio com os inibidores de bombas de efluxo, uma vez que são os compostos que apresentam melhor atividade tanto contra bactérias de Gram-positivo (Tabela 3.1) como contra micobactérias pertencentes aos MTBC e MAC (Figura 3.1) e porque permitem a comparação da sua atividade devido às suas estruturas apresentarem semelhanças (Tabela 2.1). Tendo isto em conta e que nem a reserpina nem a CPZ aparentam alterar a atividade dessas azauronas contra bactérias de Gram-negativo e Gram-positivo nem contra micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido (Tabela 3.1 vs. Tabela 3.2), pode afirmar-se que o mecanismo de ação das azauronas não deve envolver as bombas de efluxo que sejam inibidas pela reserpina ou pela CPZ e que se encontrem presentes nestas bactérias, ou seja, não devem envolver algumas das bombas de efluxo que constituem as superfamílias “major facilitator” e “*resistance-nodulation-division*” (Pule *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2019). Porém, no caso de Mtb, os inibidores de bombas de efluxo reserpina e CPZ apresentam também diversos alvos putativos pertencentes a outras superfamílias (*i.e.* “small multidrug resistance” e “ATP-binding cassette”) (Laws *et al.*, 2022; Song & Wu, 2016), sendo que nenhum destes alvos são genes que se encontrem nas regiões diferenciadoras (RDs) que estão ausentes de BCG. Desta forma, testou-se a azaurona 5a contra Mtb e BCG na ausência e na presença de reserpina e de CPZ (Tabela 3.3) de modo a perceber-se se a presença dos inibidores das bombas de efluxo e/ou dessas regiões diferenciadoras é capaz de modular a atividade das azauronas.

Tabela 3.3 Atividade antibacteriana da azaurona 5a na presença dos inibidores de bombas de efluxo reserpina e CPZ contra Mtb e BCG

Inibidor de Bomba de Efluxo	MIC µg/mL	
	Mtb	BCG
Sem inibidor	4 (11,72 µM)	4 (11,72 µM)
Reserpina	4 (11,72 µM)	4 (11,72 µM)
CPZ	2 (5,86 µM)	2 (5,86 µM)

A partir destes dados, pode afirmar-se que a presença de CPZ aumenta a atividade da azaurona 5a contra Mtb e BCG, enquanto que a presença de reserpina não altera a atividade deste fármaco. Contudo, para ambos os inibidores de bombas de efluxo, o fator de modulação ($MIC_{\text{antibiótico}} / MIC_{\text{antibiótico} + \text{inibidor}}$) é inferior a quatro, pelo que não existe um efeito modulatório da resistência em Mtb nem em BCG (Coelho *et al.*, 2015; Šimunović *et al.*, 2021) e, como tal, o mecanismo de ação da azaurona 5a não deve envolver as bombas de efluxo destas espécies que sejam inibidas pela reserpina ou pela CPZ.

Adicionalmente, poderão fazer-se algumas comparações entre a atividade da azaurona 5a contra *M. bovis* e BCG. Como referido anteriormente, BCG consiste num mutante atenuado de *M. bovis* que não apresenta virulência, pelo que os genomas destas duas estirpes, apesar de serem na sua maioria idênticos, apresentam algumas diferenças. Estas consistem na ausência de três grandes regiões cromossomais em BCG, as quais são designadas de RD1, RD2 e RD3 (Mahairas *et al.*, 1996). A RD1 contém vários genes responsáveis por fatores de virulência e antigénios imunogénicos, incluindo os genes *esxA* e *esxB* que codificam, respetivamente, o ESAT-6 (*EsxA*) e a CFP-10 (*EsxB*) (Demangel *et al.*, 2004; Etna *et al.*, 2015). Já a RD2 possui uma sequência de elementos repetitivos e o gene *mpt64* responsável pela proteína imunogénica Mpt64 (Mahairas *et al.*, 1996), enquanto que a RD3 contém genes que codificam proteínas envolvidas na biogénese de fagos (Pym *et al.*, 2002). Sabendo isto, bem como que valores das MICs obtidos para *M. bovis* e BCG (Figura 3.1A e Tabela 3.3), poderia afirmar-se que a ausência de pelo menos uma das RDs é essencial para que as azauronas apresentem atividade. Porém, também se sabe que essas RDs são específicas das espécies pertencentes ao MTBC — com exceção de BCG — (Bespiatykh *et al.*, 2021; Mahairas *et al.*, 1996) e que a atividade dos fármacos é semelhante contra Mtb e BCG (Tabela 3.3), pelo que essa hipótese tem de ser descartada e, como tal, as RDs não devem ter influência na atividade das azauronas. No entanto, quando se tem em conta que é contra as micobactérias pertencentes ao MTBC que estes fármacos têm melhor atividade, então seria de esperar que a presença de RD1, RD2 e/ou RD3 fosse essencial para a atividade destes, pois as espécies sobre as quais as azauronas não têm atividade (*i.e.* micobactérias pertencentes ao MAC e micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido) não apresentam estas RDs. Assim, apesar de alguns dos resultados serem contraditórios, pode admitir-se que o mecanismo de ação das azauronas aparenta estar associado a componente(s) específico(s) das micobactérias que pertencem ao MTBC.

3.1.2. Curva de morte de Mtb na presença da azaurona 5a

Os ensaios de determinação das MICs supramencionados — apesar de consistirem no modelo farmacocinético-farmacodinâmico mais comum para avaliação da eficácia dos agentes antimicrobianos

— apresentam algumas limitações, entre as quais o facto de não permitirem perceber o efeito da atividade dos fármacos contra os microrganismos e respetiva viabilidade ao longo do tempo (Mueller *et al.*, 2004). De modo a adquirir uma visão mais completa da farmacodinâmica as azauronas, procurou-se quantificar a dinâmica de morte bacteriana ao longo do tempo. Tendo sido determinados os valores das MICs para Mtb (Figura 3.1), realizou-se o ensaio de curva de morte para esta micobactéria na presença da azaurona 5a a 8xMIC (Campaniço, 2022) (Figura 3.2).

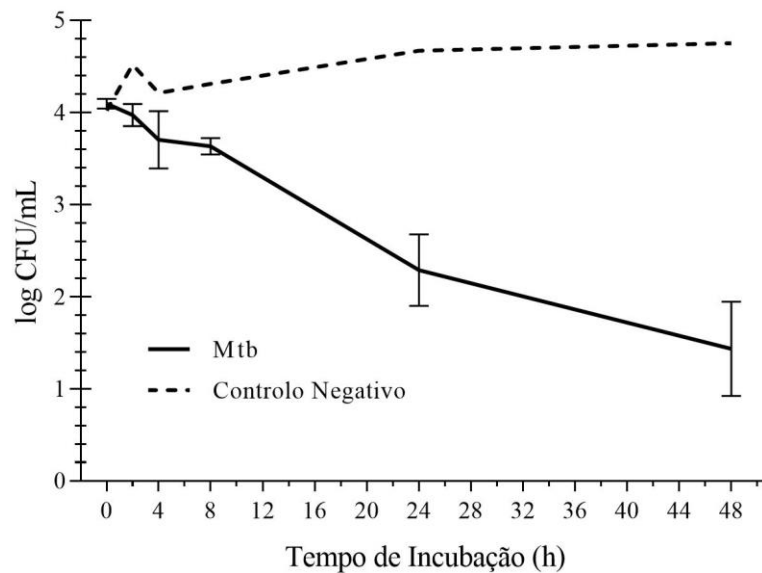


Figura 3.2 Curva de morte de Mtb na presença da azaurona 5a. As barras de erro correspondem ao desvio padrão associado às réplicas de cada “timepoint”.

O perfil cinético representado na Figura 3.2 mostra que a azaurona 5a apresenta uma atividade bacteriostática contra Mtb, uma vez que ocorre uma redução do \log_{10} CFU/mL < 3 relativamente ao inóculo inicial. Isto significa que, mesmo após 48 h de exposição ao antibiótico, menos de 99,9% da população bacteriana é eliminada, sendo apenas o seu crescimento inibido.

Todavia, é de salientar que todos os resultados supramencionados nem sempre refletem o que acontece *in vivo*. A razão de isto acontecer deve-se ao facto de estes ensaios *in vitro* (*i.e.* determinação das MICs, curva de morte com concentração de antibiótico constante) não terem em conta que organicamente ocorrem flutuações na concentração dos fármacos, nem que estes se ligam a proteínas/estruturas e sofrem distribuição tecidular. Logo, apesar destes ensaios *in vitro* poderem, de certa forma, prever a potência da interação fármaco-microrganismo e serem bons modelos matemáticos, apresentam limitações nas previsões e correlações a nível clínico (Mueller *et al.*, 2004).

3.1.3. Atividade *ex vivo* da azaurona 5a contra Mtb num modelo de infeção em macrófagos

Apesar dos valores das MICs (Figura 3.1) e da conclusão retirada a partir da curva de morte (Figura 3.2) serem considerados dos parâmetros que melhor refletem a eficácia dos antibióticos, todos os resultados obtidos nos ensaios supramencionados não têm em conta vários fatores inerentes ao organismo do hospedeiro (*e.g.* níveis de albumina, presença de outros fármacos em circulação) (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021) que podem afetar a atividade das azauronas. Assim, o

facto de dada estirpe bacteriana ser suscetível a estas, aquando desses ensaios, não garante por si só que apresentem sucesso *in vivo*. Logo, de modo a obter-se uma visão mais próxima do que ocorre *in vivo*, realizaram-se ensaios *ex vivo* para a determinação da atividade antibacteriana das azauronas em estudo — especificamente do composto 5a — num ambiente controlado com alterações mínimas comparativamente às condições naturais. Determinou-se, primeiramente, a citotoxicidade desse composto em macrófagos diferenciados de células monocíticas humanas THP-1 (Figura 3.3).

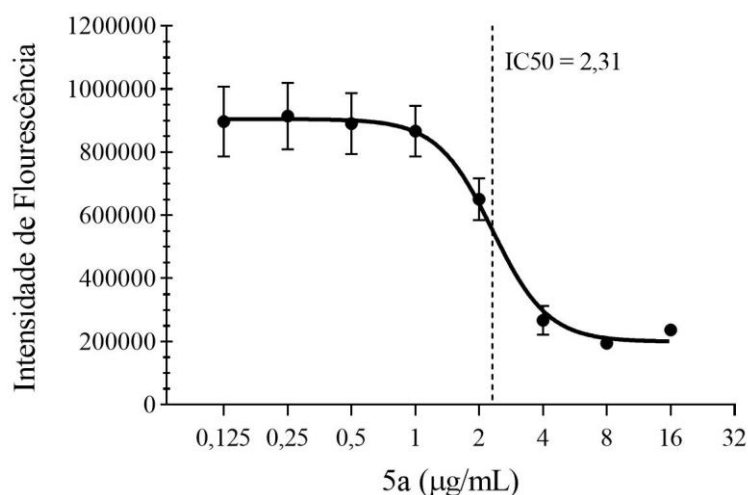


Figura 3.3 Curva dose-resposta do fármaco 5a contra macrófagos diferenciados de células THP-1. As barras de erro correspondem ao desvio padrão associado às réplicas de cada concentração testada. De notar que os pontos correspondentes às concentrações 32 e 64 µg/mL não se encontram representados, visto terem sido considerados “outliers”.

A citotoxicidade de um dado fármaco pode ser avaliada pelo índice de seletividade — quociente do valor de IC50 pelo valor da MIC —, sendo que quando é menor que um o composto é considerado tóxico e que quando é maior ou igual a 10 o composto é considerado não-tóxico e seletivo (Adamu *et al.*, 2014; Elisha *et al.*, 2017; Mobbili *et al.*, 2023). Dado que o valor obtido de IC50 para os macrófagos diferenciados de células THP-1 na presença da azaurona 5a foi 2,31 µg/mL (Figura 3.3) e que o valor da MIC deste mesmo composto obtido para Mtb foi 4 µg/mL (Figura 3.1), pode concluir-se que a azaurona 5a é tóxica para os macrófagos, uma vez que o valor do índice de seletividade é igual a 0,58 (índice de seletividade < 1). Estes resultados contrastam parcialmente com os resultados obtidos, em estudos prévios em que se determinou uma reduzida citotoxicidade para células renais embrionárias humanas 293T (Campaniço, 2022), pelo que reforçam a necessidade de avaliação de citotoxicidade em diferentes linhas celulares. Para efeitos de avaliação da atividade deste composto *ex vivo* em modelo de infeção de macrófagos os resultados aqui obtidos são especialmente relevantes, uma vez que os macrófagos desempenham um papel central no controlo da replicação de Mtb no organismo do hospedeiro. Isto porque constituem a primeira-linha de defesa e também um nicho de replicação intracelular, pelo que estas células irão apresentar baixa viabilidade não só por causa da presença do agente patogénico, mas também do composto, tornando-se difícil distinguir os efeitos citotóxicos do composto dos mecanismos citotóxicos inerentes à replicação do agente patogénico. Procurou-se, contudo, averiguar a atividade da azaurona 5a num modelo de infeção com macrófagos utilizando para o efeito concentrações inferiores à IC50 para esta linha celular diferenciada. (Figura 3.4).

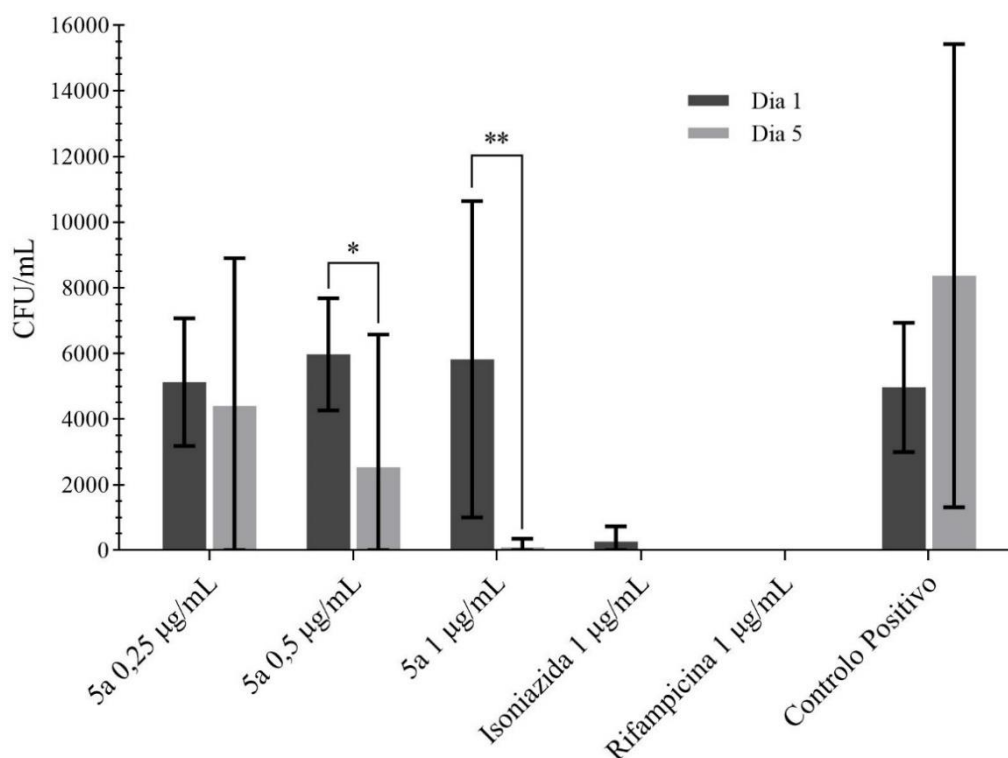


Figura 3.4 Representação gráfica da viabilidade de Mtb quando num sistema macrófago-Mtb na presença da azaurona 5a (0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1 µg/mL), bem como de isoniazida 1 µg/mL e rifampicina 1 µg/mL (controlos negativos). As barras de erro correspondem ao desvio padrão associado às réplicas de cada ensaio para cada dia. As diferenças significativas entre os resultados dos dois dias para cada ensaio correspondente encontram-se representadas por * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Sabendo que, para garantir a viabilidade dos macrófagos, as concentrações testadas da azaurona 5a são mais baixas que o valor de IC₅₀ (Figura 3.3), era expectável que houvesse crescimento bacteriano ao longo do tempo, visto que essas concentrações seriam insuficientes para inibir o crescimento bacteriano já que a MIC obtida para Mtb é superior (Figura 3.1). Todavia, verificou-se uma diminuição da viabilidade bacteriana ao longo do tempo de um modo consistente com um efeito de dose-resposta, apesar de as micobactérias terem sido sujeitas a concentrações de composto inferiores à MIC correspondente (Figura 3.4). Logo, num contexto de infeção, parece decorrer em consequência da interação entre o agente patogénico e o macrófago uma ação sinérgica entre a azaurona 5a e os mecanismos de controlo de replicação intracelular dos macrófagos. Adicionalmente, pode afirmar-se que o efeito sinérgico aumenta com a concentração do composto 5a, tendo-se observado reduções de 14,15%, 57,60% e 98,47% quando o sistema macrófago-Mtb é sujeito ao composto nas concentrações 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1 µg/mL, respetivamente (Figura 3.4). Estes resultados contribuem para a expansão do conhecimento relativo à atividade antimicrobiana das azauronas enquanto moléculas com atividade anti-TB e poderão auxiliar na síntese de novos derivados menos citotóxicos, mais estáveis e que possam manter os mesmos níveis de atividade *in vitro*.

3.2. Sphaerococcenol A e os seus derivados

O sphaerococcenol A — bromo-diterpeno isolado da alga vermelha *Sphaerococcus coronopifolius* (Fenical *et al.*, 1976) — e vários dos seus derivados já mostram ter atividade contra

vários microrganismos (Rodrigues *et al.*, 2015; Smyrniotopoulos, Vagias, *et al.*, 2008a), entre eles bactérias de Gram-positivo, incluído bactérias multirresistentes e estirpes de MRSA (Etahiri *et al.*, 2001; Smyrniotopoulos *et al.*, 2010). Todavia, não se sabe se esta atividade é bactericida ou não e ainda está por esclarecer se o espectro de atividade destes compostos abrange micobactérias. Portanto, os ensaios inframencionados visam avaliar a atividade bactericida e a cinética do sphaerococcol A e dos seus derivados, bem como caracterizar os seus espectros de atividade e determinar a taxa de resistência espontânea provocada por estes compostos.

3.2.1. Espectro de atividade de Sphaerococcol A e dos seus derivados

O sphaerococcol A (MFSA) e os seus derivados foram testados contra bactérias de Gram-negativo (*Escherichia coli* e *P. aeruginosa*) e de Gram-positivo (*E. faecalis* e *S. aureus*), bem como contra micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido (*M. smegmatis*) e Mtb. Os valores das MICs correspondentes aos ensaios encontram-se apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 Atividade antibacteriana de MFSA e dos seus derivados contra bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo, bem como contra micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido e micobactérias tuberculosas

Composto	MIC µg/mL					
	<i>Escherichia coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i> (ATCC11420)	<i>S. aureus</i> (ATCC25923)	<i>M. smegmatis</i>	Mtb
MFSA	> 64 (> 167,80 µM)	> 64 (> 167,80 µM)	> 64 (> 167,80 µM)	64 (167,80 µM)	> 64 (> 167,80 µM)	> 32 (> 83,90 µM)
MF97	> 64 (> 122,70 µM)	> 64 (> 122,70 µM)	> 64 (> 122,70 µM)	> 64 (> 122,70 µM)	> 64 (> 122,70 µM)	> 32 (> 61,35 µM)
MF132	> 64 (> 83,46 µM)	> 64 (> 83,46 µM)	> 64 (> 83,46 µM)	> 64 (> 83,46 µM)	> 64 (> 83,46 µM)	> 32 (> 41,73 µM)
MF135	> 64 (> 166,92 µM)	> 64 (> 166,92 µM)	> 64 (> 166,92 µM)	> 64 (> 166,92 µM)	> 64 (> 166,92 µM)	> 32 (> 83,46 µM)
MF139	> 64 (> 83,24 µM)	> 64 (> 83,24 µM)	32 (41,62 µM)	16 (20,81 µM)	64 (83,24 µM)	> 32 (> 41,62 µM)
MF153F8	> 64 (> 166,05 µM)	> 64 (> 166,05 µM)	16 (41,51 µM)	8 (20,75 µM)	8 (20,75 µM)	> 32 (> 83,02 µM)
MF153F15	> 64 (> 166,05 µM)	> 64 (> 166,05 µM)	64 (166,05 µM)	32 (83,02 µM)	64 (166,05 µM)	> 32 (> 83,02 µM)

A partir destes dados, pode afirmar-se que apenas os compostos MF153F8 e MF153F15 e a mistura de compostos MF139 é que apresentam atividade contra algumas das espécies bacterianas em estudo, mais concretamente contra *E. faecalis*, *S. aureus* e *M. smegmatis*. Deste modo, podem retirar-se algumas conclusões. Primeiro, tendo em conta as estruturas químicas de todos os compostos testados (Tabela 2.2), a presença do grupo hidroxilo, em vez do grupo carbonilo, é a responsável pela atividade dos compostos (*e.g.* MF153F8 *vs.* MF135) e a sua posição no plano é a responsável pela eficácia desta atividade (*e.g.* MF153F8 *vs.* MF153F15). Para além disto, os fármacos que apresentam atividade quando se encontram em mistura de compostos apresentam menor potência, pois, as MICs aumentam para o dobro (*e.g.* MF153F8 *vs.* MF139). Também se pode concluir que o facto do MFSA e de nenhum dos seus derivados apresentarem atividade contra Mtb, mas alguns deles apresentarem contra *M. smegmatis*, pode indicar duas coisas: que o mecanismo de ação destes compostos envolve algum processo relacionado com a replicação bacteriana, pelo que os diferentes ritmos de crescimento das micobactérias

influencia a atividade antibacteriana dos fármacos, sendo que nem todos os que são eficazes para as micobactérias de crescimento lento o são para as de crescimento rápido e *vice-versa* (Thomson & Yew, 2009); e/ou que as poucas diferenças estruturais e bioquímicas entre as micobactérias tuberculosas e as não-tuberculosas influenciam essa atividade antibacteriana. Por último, nenhum dos fármacos apresenta atividade contra bactérias de Gram-negativo, mas alguns apresentam contra bactérias de Gram-positivo. Esta diferença na atividade antibacteriana pode, então, dever-se à falta de permeabilidade dos compostos, o que dificulta a sua passagem através da membrana externa das bactérias de Gram-negativo.

Assim, tendo em conta que estudos prévios corroboram o facto de derivados de sphaerococenol A apresentarem atividade contra bactérias de Gram-positivo (Etahiri *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2015) e que o composto MF153F8 apresentou uma boa eficácia, determinou-se, em seguida, a atividade deste para um amplo espectro de bactérias de Gram-positivo (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 Atividade de MF153F8 contra diferentes bactérias de Gram-positivo. Quando o quociente do valor de MBC pelo valor da MIC é menor ou igual a quatro, o composto MF153F8 é considerado bactericida, enquanto que se isso não se mostrar verdadeiro, então o composto MF153F8 é considerado bacteriostático.

Bactérias Gram-positivas	MIC (µg/mL)	MIC (µM)	MBC (µg/mL)	Definição
<i>Bacillus subtilis</i>	8	20,75	8	Bactericida
<i>Bifidobacterium longum</i>	8	20,75	8	Bactericida
<i>E. faecalis</i> (ATCC11420)	16	41,51	> 64	Bacteriostático
<i>E. faecalis</i> (ATCC51299)	16	41,51	32	Bactericida
<i>E. faecalis</i> [H164 (vanA)]	16	41,51	16	Bactericida
<i>E. flavescens</i>	16	41,51	> 64	Bacteriostático
<i>E. galinarum</i>	16	41,51	16	Bactericida
<i>E. hirae</i>	16	41,51	> 64	Bacteriostático
<i>Lactobacillus plantarum</i>	8	20,75	16	Bactericida
<i>Listeria innocua</i>	16	41,51	16	Bactericida
<i>Micrococcus luteus</i>	4	10,38	8	Bactericida
<i>S. aureus</i> (ATCC6538)	> 64	> 166,05	-	-
<i>S. aureus</i> (ATCC9144)	8	20,75	16	Bactericida
<i>S. aureus</i> (ATCC25923)	8	20,75	16	Bactericida
<i>S. aureus</i> (ATCC43866)	8	20,75	16	Bactericida
<i>S. aureus</i> (CIP 106414)	8	20,75	16	Bactericida
<i>S. epidermidis</i>	16	41,51	16	Bactericida

Apesar de, entre as espécies testadas, *Micrococcus luteus* ser aquela que apresenta maior sensibilidade ao fármaco MF153F8, este apresenta, para praticamente todas as bactérias de Gram-positivo — à exceção dos casos em que a MIC ou a MBC são muito elevadas (*i.e.* *S. aureus* ATCC6538, *E. faecalis* ATCC11420, *E. flavescens* e *E. hirae*) —, uma atividade antibacteriana promissora, sendo esta sobretudo bactericida, ou seja, promotora da morte bacteriana.

Dos dados da Tabela 3.5 também se pode afirmar que o composto MF153F8, relativamente a ser bactericida ou bacteriostático, apresenta uma atividade heterogénea entre as diferentes espécies/estirpes de *Enterococcus*, mas que essa atividade é homogénea entre as diferentes espécies/estirpes de *Staphylococcus*. Dentro deste último género, a atividade antibacteriana é igual para todas as estirpes de *S. aureus* testadas (exceto *S. aureus* ATCC6538), independentemente de estas serem sensíveis à metilina (*S. aureus* ATCC9144, *S. aureus* ATCC25923) ou serem MRSA (*S. aureus*

ATCC43866, *S. aureus* CIP 106414) ou serem VISA (*S. aureus* CIP 106414). Estes resultados estão, então, de acordo com estudos realizados anteriormente (Smyrniotopoulos *et al.*, 2010; Smyrniotopoulos, Vagias, *et al.*, 2008b), nos quais já tinha sido determinado que vários derivados de sphaerococcenol A são ativos tanto contra estirpes de *S. aureus* sensíveis como resistentes à meticilina. Deste modo, pode admitir-se que o mecanismo de ação do fármaco MF153F8 e dos outros derivados de sphaerococcenol A não depende do gene *mecA*, o qual é responsável pela resistência à meticilina e outros β -lactâmicos (*e.g.* oxacilina, cefalosporinas) em *S. aureus* (Opal & Pop-Vicas, 2015). Adicionalmente, devido ainda se estar numa fase preliminar do estudo da atividade antimicrobiana destes derivados, fica por esclarecer a discrepância entre o facto de *S. aureus* ATCC6538 ser resistente a MF153F8, mas de as outras estirpes de *S. aureus* não o serem.

3.2.2. Curvas de morte na presença de MF153F8

Como referido anteriormente, os ensaios de determinação das MICs não conferem informação acerca da atividade dos fármacos contra os microrganismos ao longo do tempo e da viabilidade dos mesmos. Por isso, de modo a ter-se uma visão mais completa da farmacodinâmica do fármaco MF153F8 e sabendo os valores das MICs obtidos para *E. faecalis* (ATCC11420), *S. aureus* (ATCC25923) e *M. smegmatis* (Tabela 3.4), realizaram-se ensaios destinados à determinação da curva de morte para estas espécies na presença desse composto com o propósito de melhor caracterizar a cinética de morte na presença do composto (Figura 3.5).

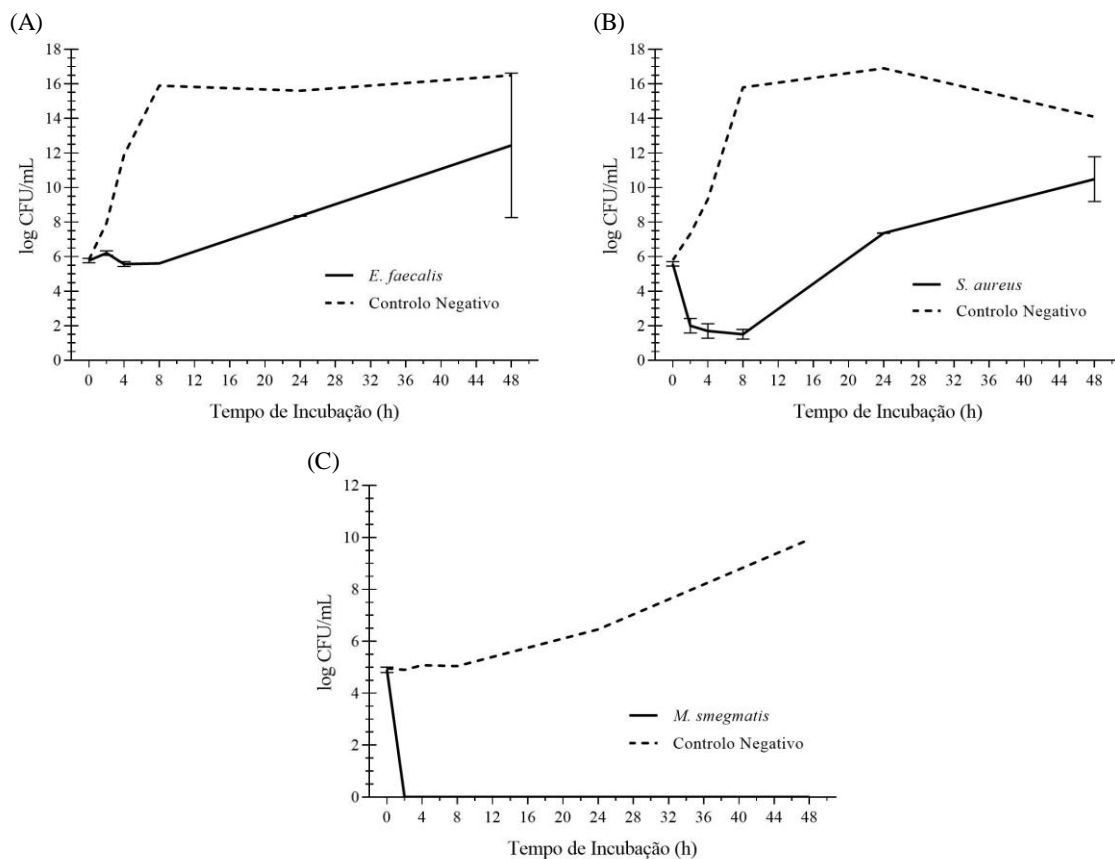


Figura 3.5 Curvas de morte de bactérias de Gram-positivo e de micobactéria de crescimento rápido na presença de MF153F8. As barras de erro correspondem ao desvio padrão associado às réplicas de cada “timepoint”. (A) Curva de morte de *E. faecalis* na presença de MF153F8; (B) Curva de morte de *S. aureus* na presença de MF153F8; (C) Curva de morte de *M. smegmatis* na presença de MF153F8.

Os perfis cinéticos representados na Figura 3.5 mostram que o fármaco MF153F8 se comporta de maneira distinta dependendo se está a atuar contra bactérias de Gram-positivo (Figura 3.5A/B) ou contra uma micobactéria de crescimento rápido (Figura 3.5C).

No caso das bactérias de Gram-positivo, o composto MF153F8 tem um comportamento semelhante, mas com ligeiras diferenças, podendo ser dividido em duas partes. Até às 8h há um decréscimo na viabilidade bacteriana, sendo que este é diferente para ambas as espécies, uma vez que o fármaco apresenta um tipo de atividade antibacteriana para cada uma delas. Ou seja, para *E. faecalis*, o composto MF153F8 apresenta uma atividade bacteriostática (redução do \log_{10} CFU/mL < 3) (Figura 3.5A), enquanto que, para *S. aureus*, apresenta uma atividade bactericida (redução do \log_{10} CFU/mL > 3) (Figura 3.5B). Ainda que estes resultados se encontrem de acordo com os da Tabela 3.5, após as 8h isso deixa de acontecer, pois a população remanescente readquire a capacidade de multiplicação na presença do composto ainda que este se encontre a uma concentração superior à MIC. Tal pode significar que, mesmo tendo havido inibição do crescimento de *E. faecalis* e de pelo menos 99,9% da população de *S. aureus* ter sido eliminada, houve, em cada um dos casos, subpopulações bacterianas que conseguiram sobreviver e superar o stress conferido pelo fármaco MF153F8. Todavia, sabe-se que, para estas duas espécies, essas subpopulações emergiram devido a um fenómeno de tolerância. Este deve-se ao facto de as subpopulações, que emergiram após a interrupção do crescimento bacteriano, ao serem, depois, expostas a um meio sem stress (*i.e.* ausência do composto MF153F8), deixarem de apresentar resistência contra o fármaco, visto que voltam a adquirir as mesmas MICs que tinham antes de serem sujeitas a esse stress (*i.e.* presença do composto MF153F8) (Tabela 3.6). Outra hipótese poderá estar relacionada com a estabilidade da molécula ao longo do tempo. No entanto, desconhece-se a estabilidade desta molécula ou potencial para ser metabolizada pelo que serão necessários estudos adicionais com vista à sua análise de estabilidade e determinação do tempo de semivida.

Tabela 3.6 Comparação dos valores das MICs antes e depois das bactérias serem expostas ao fármaco MF153F8

Bactérias Gram-positivas	MIC μ g/mL	
	Antes de exposição	Depois de exposição
<i>E. faecalis</i> (ATCC11420)	16 (41,51 μ M)	16 (41,51 μ M)
<i>S. aureus</i> (ATCC25923)	8 (20,75 μ M)	8 (20,75 μ M)

Já no caso de *M. smegmatis*, pode afirmar-se que o composto MF153F8 apresenta uma atividade bactericida rápida, uma vez que logo ao fim de 2h ocorre uma redução do \log_{10} CFU/mL > 3 relativamente ao inóculo inicial (Figura 3.5C), o que significa que pelo menos 99,9% da população bacteriana é eliminada. Este efeito é mantido ao longo do tempo, pelo que se pode admitir que o fármaco MF153F8 é eficaz contra *M. smegmatis* e que pode ser promissor contra outras micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido (*e.g.* *M. aurum*, *M. fortuitum*).

No entanto, tal como mencionado anteriormente, deve ter-se em atenção que todos os resultados supramencionados nem sempre refletem o que acontece *in vivo*. Porém, como determinado em estudos prévios (Rodrigues *et al.*, 2015; Smyrniotopoulos, Quesada, *et al.*, 2008), o composto MFSA é tóxico para várias linhas celulares cancerígenas (*e.g.* HepG-2, LoVo, A549), mas os seus derivados que não têm nem grupos hidroxiperoxilo nem grupos hidroxilo em posições adicionais — comparativamente à estrutura de MFSA — apresentam baixa toxicidade para as linhas celulares pulmonares cancerígenas NSCLC-N6-L16 e A549. Logo, sabendo que o composto MF153F8 não apresenta nem grupos

hidroxiperoxilo nem grupos hidroxilo em posições adicionais (Tabela 2.2) e que apresenta atividades antibacterianas eficazes contra bactérias de Gram-positivo e *M. smegmatis* (Tabela 3.4), pode admitir-se que este fármaco é promissor não só para o tratamento de infecções provocadas por bactérias de Gram-positivo, mas também por micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido. Por isso, será necessário realizar ensaios com vista à determinação da citotoxicidade deste composto específico e, eventualmente, avaliar a sua atividade em ensaios *ex vivo*.

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

Atualmente, a resistência aos antimicrobianos por parte de uma variada gama de bactérias é considerada uma das maiores ameaças à saúde pública (C. J. Murray *et al.*, 2022) e, como tal, a descoberta e implementação de novas terapias para minimizar esta ameaça constitui um objetivo prioritário. O presente estudo contribui para este objetivo através da caracterização da atividade antibacteriana de duas famílias de compostos, (*i.e.* derivados de azauronas e de Sphaerococcenol A) com potencial terapêutico para a TB e infeções por bactérias de Gram-positivo, respetivamente. A TB, foi, até à emergência da COVID-19, a principal causa de morte causada por um único agente infeccioso (Mtb) (WHO, 2022a), porém também as bactérias de Gram-positivo, tais como MRSA ou *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (Ayobami *et al.*, 2020; Gajdács, 2019), figuram enquanto microrganismos de elevada prioridade para investigação e desenvolvimento devido apresentarem elevada importância clínica e de saúde pública (C. J. Murray *et al.*, 2022). Para a TB, a situação torna-se ainda mais grave devido à emergência de estirpes de Mtb resistentes aos fármacos já existentes (WHO, 2022d).

Relativamente aos derivados das azauronas, os mesmos mostram-se promissores para o combate à TB, não só por parecerem ser seletivos para micobactérias pertencentes ao MTBC, mas também por apresentarem uma atividade bacteriostática contra Mtb, sendo capazes de inibir o crescimento desta bactéria em baixas concentrações combinado com uma atividade sinérgica com os macrófagos. No entanto, os ensaios realizados não permitiram elucidar com consistência acerca do mecanismo de ação dos fármacos nem como a estrutura destes influencia a atividade dos mesmos. Sabe-se que na presença dos inibidores de bombas de efluxo não ocorre alteração da atividade das azauronas, porém é prioritário voltar a repetir os ensaios de determinação das MICs — tanto na presença como na ausência dos inibidores de bombas de efluxo — de forma a poder ter-se mais confiança nas conclusões retiradas, pois os compostos mostraram-se instáveis. Por um lado, se os resultados continuarem a mostrar grande variabilidade dentro da mesma espécie e entre diferentes espécies será necessário efetuar modificações com vista a priorizar a estabilidade ou realizar nova seleção tendo esta propriedade como prioritária. De facto, em estudos prévios (Campaniço, 2022), foi mostrado que a azaurona 5a apresentava maior instabilidade, pelo que se deve proceder à repetição dos ensaios utilizando derivados mais estáveis. Por outro lado, se os resultados se mostrarem mais coerentes deve proceder-se a mais ensaios para melhor compreensão do mecanismo de ação das azauronas. Estes ensaios devem consistir no isolamento de mutantes espontâneos para se identificar as variantes associadas às resistências. Isto já foi tentado, mas sem sucesso, sendo que, ao contrário do anteriormente realizado (Campaniço, 2022), nos ensaios realizados houve demasiado crescimento, pelo que, no futuro, se deve tentar isolar mutantes na presença de compostos mais estáveis porque o sucedido poderá dever-se à estabilidade do composto em meio e a 37°C que não é compatível com as incubações prolongadas necessárias para o crescimento de mutantes de Mtb. Adicionalmente, deve realizar-se ensaios para determinação da atividade dos derivados das azauronas em modelos de persistência não-replicativa com vista à caracterização da sua atividade em formas latentes de TB, uma vez que não existem muitas terapias eficazes contra a fase de latência e porque esta constitui é um dos principais fatores que leva ao aumento das taxas de incidência da TB (WHO, 2014). Por fim, em trabalhos futuros também se deve procurar reduzir a citotoxicidade associada a estes derivados, contudo tem de se ter noção que poderá não ser possível aumentar o valor de IC50 e manter a atividade, bem como desacoplar o mecanismo de citotoxicidade do mecanismo de atividade antibacteriano dos macrófagos.

Já sobre os derivados de sphaerococcenol A, e apesar de este ser um estudo piloto, pode concluir-se que, apesar de não terem atividade contra o agente etiológico da TB, tratam-se de moléculas promissoras para estudos mais completos orientados para tratamento de infeções provocadas por

bactérias de Gram-positivo — incluindo estirpes com diferentes graus de resistência a outros antibióticos —, patologias estas que também são causa de grande morbidade e mortalidade devido à contínua emergência de espécies resistentes. Estes derivados mostraram também ser promissores contra micobactérias não-tuberculosas, porém não se sabe se esta atividade só ocorre para as de crescimento rápido ou se também engloba as de crescimento lento, pelo que, futuramente, se deve realizar ensaios de determinação das MICs para todas estas micobactérias não-tuberculosas. Os ensaios realizados permitiram elucidar acerca do modo como a estrutura destes fármacos influencia a atividade dos mesmos, sendo que aqueles que apresentam um grupo hidroxilo à frente do plano em vez de um grupo carbonilo são os que têm maior eficácia. Esta informação permitirá expandir a biblioteca de compostos já sintetizados e informar estudos de estrutura-atividade. Foi ainda possível determinar que os derivados de sphaerococcenol A aparentam ter uma atividade bactericida contra micobactérias não-tuberculosas de crescimento rápido, mas que apresentam uma atividade bacteriostática contra as bactérias de Gram-positivo, gerando um fenómeno de tolerância. Em trabalhos futuros, deve ser prioritário expandir os conhecimentos sobre a citotoxicidade dos derivados de sphaerococcenol A e se estes provocam resistências espontâneas nas bactérias. Porém, relativamente a este último ponto, de uma forma preliminar, não se conseguiu isolar mutantes, o que pode indicar que a resistência a estes compostos não é facilmente adquirida por mutagénese *de novo*.

Em conclusão, este trabalho contribui com dados referentes ao espetro de atividade quantitativa dos derivados de azauronas e sphaerococcenol A, elucidando acerca das suas características enquanto moléculas com atividade antibacteriana e potencial para desenvolvimento enquanto novos fármacos antimicrobianos.

Referências Bibliográficas

- Adamu, M., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2014). The antibacterial activity, antioxidant activity and selectivity index of leaf extracts of thirteen South African tree species used in ethnoveterinary medicine to treat helminth infections. *BMC Veterinary Research*, *10*, 52. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-52>
- Ahmad, F., Rani, A., Alam, A., Zarin, S., Pandey, S., Singh, H., Hasnain, S. E., & Ehtesham, N. Z. (2022). Macrophage: A Cell With Many Faces and Functions in Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, *13*, 747799. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.747799>
- Alffenaar, J. W. C., de Steenwinkel, J. E. M., Diacon, A. H., Simonsson, U. S. H., Srivastava, S., & Wicha, S. G. (2022). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-tuberculosis drugs: An evaluation of *in vitro*, *in vivo* methodologies and human studies. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 1063453. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1063453>
- Alnimr, A. M. (2015). Dormancy models for *Mycobacterium tuberculosis*: A minireview. *Brazilian Journal of Microbiology*, *46*(3), 647. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140507>
- Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Göhlmann, H. W. H., Neefs, J. M., Winkler, H., van Gestel, J., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., Williams, P., de Chaffoy, D., Huitric, E., Hoffner, S., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Lounis, N., & Jarlier, V. (2005). A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, *307*(5707), 223–227. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1106753/SUPPL_FILE/ANDRIES.SOM.PDF
- Anes, E., Azevedo-Pereira, J. M., & Pires, D. (2021). Cathepsins and Their Endogenous Inhibitors in Host Defense During *Mycobacterium tuberculosis* and HIV Infection. *Frontiers in Immunology*, *12*, 726984. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.726984/BIBTEX>
- Anthony, R. M., den Hertog, A. L., & van Soolingen, D. (2018). ‘Happy the man, who, studying nature’s laws, Thro’’ known effects can trace the secret cause.’ Do we have enough pieces to solve the pyrazinamide puzzle?’ *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(7), 1750–1754. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKY060>
- Aubry, A., Pan, X. S., Fisher, L. M., Jarlier, V., & Cambau, E. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* DNA Gyrase: Interaction with Quinolones and Correlation with Antimycobacterial Drug Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *48*(4), 1281–1288. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1281-1288.2004>
- Ayobami, O., Willrich, N., Reuss, A., Eckmanns, T., & Markwart, R. (2020). The ongoing challenge of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Europe: an epidemiological analysis of bloodstream infections. *Emerging Microbes & Infections*, *9*(1), 1180. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1769500>
- Azam, M. A., & Jayaram, U. (2015). Inhibitors of alanine racemase enzyme: a review. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *31*(4), 517–526. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1050010>
- Baggio, D., & Ananda-Rajah, M. R. (2021). Fluoroquinolone antibiotics and adverse events. *Australian Prescriber*, *44*(5), 164. <https://doi.org/10.18773/AUSTPRESCR.2021.035>

Bahuguna, A., & Rawat, D. S. (2020). An overview of new antitubercular drugs, drug candidates, and their targets. *Medicinal Research Reviews*, 40, 263–292. <https://doi.org/10.1002/MED.21602>

Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G., & Jacobs, W. R. (1994). inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 263(5144), 227–230. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8284673>

Barclay, W. R., & Russe, H. (1955). The *in vitro* Action of Cycloserine on *M. tuberculosis*. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases*, 72(2), 236–241.

Bardou, F., Raynaud, C., Ramos, C., Laneelle, M. A., & Laneelle, G. (1998). Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, 144(9), 2539–2544.

Berry, C., du Cros, P., Fielding, K., Gajewski, S., Kazounis, E., McHugh, T. D., Merle, C., Motta, I., Moore, D. A. J., & Nyang'wa, B. T. (2022). TB-PRACTECAL: study protocol for a randomised, controlled, open-label, phase II–III trial to evaluate the safety and efficacy of regimens containing bedaquiline and pretomanid for the treatment of adult patients with pulmonary multidrug-resistant tuberculosis. *Trials*, 23, 484. <https://doi.org/10.1186/S13063-022-06331-8/TABLES/4>

Bespiatykh, D., Bespyatykh, J., Mokrousov, I., & Shitikov, E. (2021). A Comprehensive Map of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Regions of Difference. *MSphere*, 6(4), e00535-21. <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00535-21>

Blondeau, J. M. (2004). Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of Ophthalmology*, 49(suppl. 2). <https://doi.org/10.1016/J.SURVOPHTHAL.2004.01.005>

Bloom, B. R., Atun, R., Cohen, T., Dye, C., Fraser, H., Gomez, G. B., Knight, G., Murray, M., Nardell, E., Rubin, E., Salomon, J., Vassall, A., Volchenkov, G., White, R., Wilson, D., & Yadav, P. (2017). Tuberculosis. In K. Holmes, S. Bertozzi, B. Bloom, & *et al.* (Eds.), *Major Infectious Diseases* (3rd ed.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525174/>

Böddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Helmut, B., & Böttger, E. C. (1990). Detection and Identification of Mycobacteria by Amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(8), 1751–1759.

Bos, K. I., Harkins, K. M., Herbig, A., Coscolla, M., Weber, N., Comas, I., Forrest, S. A., Bryant, J. M., Harris, S. R., Schuenemann, V. J., Campbell, T. J., Majander, K., Wilbur, A. K., Guichon, R. A., Steadman, D. L. W., Cook, D. C., Niemann, S., Behr, M. A., Zumarraga, M., ... Krause, J. (2014). Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature*, 514(7523), 497. <https://doi.org/10.1038/NATURE13591>

Bottai, D., Frigui, W., Sayes, F., Di Luca, M., Spadoni, D., Pawlik, A., Zoppo, M., Orgeur, M., Khanna, V., Hardy, D., Mangenot, S., Barbe, V., Medigue, C., Ma, L., Bouchier, C., Tavanti, A., Larrouy-Maumus, G., & Brosch, R. (2020). TbD1 deletion as a driver of the evolutionary success of modern epidemic *Mycobacterium tuberculosis* lineages. *Nature Communications*, 11, 684. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14508-5>

Bozdogan, B., & Appelbaum, P. C. (2004). Oxazolidinones: Activity, mode of action, and mechanism of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23(2), 113–119. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2003.11.003>

Brites, D., & Gagneux, S. (2015). Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and Homo sapiens. *Immunological Reviews*, 264(1), 6–24. <https://doi.org/10.1111/imr.12264>

Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., Van Soolingen, D., & Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3684–3689. <https://doi.org/10.1073/PNAS.052548299>

Brown-Elliott, B. A., & Philley, J. V. (2017). Rapidly Growing Mycobacteria. *Microbiology Spectrum*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.TNMI7-0027-2016>

Buzic, I., & Giuffra, V. (2020). The paleopathological evidence on the origins of human tuberculosis: a review. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 61(1 Suppl 1), E3–E8. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/JPMH2020.61.1S1.1379>

Bycroft, M., Hubbard, T. J. P., Proctor, M., Freund, S. M. V., & Murzin, A. G. (1997). The Solution Structure of the S1 RNA Binding Domain: A Member of an Ancient Nucleic Acid–Binding Fold. *Cell*, 88(2), 235–242. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81844-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81844-9)

Calmette, A., & Guérin, C. (1909). Sur quelques propriétés du bacille tuberculeux d'origine bovine, cultivé sur bile de bœuf glycinée. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances de l'Académie Des Sciences*, 149, 716–718.

Calmette A., Guérin C., & Weill-Hallé B. (1924). Essais d'immunisation contre l'infection tuberculeuse. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 96, 787–796.

Cambier, C. J., Falkow, S., & Ramakrishnan, L. (2014). Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, 159(7), 1497–1509. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.024>

Cambier, C. J., Takaki, K. K., Larson, R. P., Hernandez, R. E., Tobin, D. M., Urdahl, K. B., Cosma, C. L., & Ramakrishnan, L. (2014). Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature*, 505(7482), 218–222. <https://doi.org/10.1038/nature12799>

Campaniço, A. (2022). *Development of new drug leads for Tuberculosis*. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Campaniço, A., Carrasco, M. P., Njoroge, M., Seldon, R., Chibale, K., Perdigão, J., Portugal, I., Warner, D. F., Moreira, R., & Lopes, F. (2019). Azaaurones as Potent Antimycobacterial Agents Active against MDR- and XDR-TB. *ChemMedChem*, 14(16), 1537–1546. <https://doi.org/10.1002/cmde.201900289>

Campaniço, A., Harjivan, S. G., Freitas, E., Serafini, M., Gaspar, M. M., Capela, R., Gomes, P., Jordaan, A., Madureira, A. M., André, V., Silva, A. B., Duarte, M. T., Portugal, I., Perdigão, J., Moreira, R., Warner, D. F., & Lopes, F. (2023). Structural Optimization of Antimycobacterial Azaaurones Towards Improved Solubility and Metabolic Stability. *ChemMedChem*. <https://doi.org/10.1002/cmde.202300410>

Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., & Darst, S. A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, *104*(6), 901–912. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00286-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00286-0)

Carrasco, M. P., Machado, M., Gonçalves, L., Sharma, M., Gut, J., Lukens, A. K., Wirth, D. F., André, V., Duarte, M. T., Guedes, R. C., dos Santos, D. J. V. A., Rosenthal, P. J., Mazitschek, R., Prudêncio, M., & Moreira, R. (2016). Probing the Azaaurone Scaffold against the Hepatic and Erythrocytic Stages of Malaria Parasites. *ChemMedChem*, 2194–2204. <https://doi.org/10.1002/CMDC.201600327>

Chakraborty, S., Gruber, T., Barry, C. E., Boshoff, H. I., & Rhee, K. Y. (2013). Para-Aminosalicylic Acid Acts as an Alternative Substrate of Folate Metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, *339*(6115), 91. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1228980>

Chakraborty, S., & Rhee, K. Y. (2015). Tuberculosis Drug Development: History and Evolution of the Mechanism-Based Paradigm. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *5*(8), 1–11. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A021147>

Champoux, J. J. (2001). DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, *70*, 369–413. www.annualreviews.org

Chapman, J. S., Dyerly, M. D., & Powell, D. R. (1964). Social and Other Factors in Intrafamilial Transmission of Tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease*, *90*(1), 48–60.

Chen, X., Hashizume, H., Tomishige, T., Nakamura, I., Matsuba, M., Fujiwara, M., Kitamoto, R., Hanaki, E., Ohba, Y., & Matsumoto, M. (2017). Delamanid kills dormant mycobacteria *in vitro* and in a Guinea pig model of tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(6), e02402-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02402-16>

Chiaradia, L., Lefebvre, C., Parra, J., Marcoux, J., Burlet-Schiltz, O., Etienne, G., Tropis, M., & Daffé, M. (2017). Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Scientific Reports*, *7*, 12807. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12718-4>

Churchyard, G., Kim, P., Shah, N. S., Rustomjee, R., Gandhi, N., Mathema, B., Dowdy, D., Kasmar, A., & Cardenas, V. (2017). What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview. *Journal of Infectious Diseases*, *216*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix362>

Coelho, T., Machado, D., Couto, I., Maschmann, R., Ramos, D., Groll, A. von, Rossetti, M. L., Silva, P. A., & Viveiros, M. (2015). Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 330. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00330/ABSTRACT>

Cohen, S. B., Gern, B. H., Delahaye, J. L., Adams, K. N., Plumlee, C. R., Winkler, J. K., Sherman, D. R., Gerner, M. Y., & Urdahl, K. B. (2018). Alveolar macrophages provide an early *Mycobacterium tuberculosis* niche and initiate dissemination. *Cell Host & Microbe*, *24*(3), 439–446. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2018.08.001>

Comas, I., Coscolla, M., Luo, T., Borrell, S., Holt, K. E., Kato-Maeda, M., Parkhill, J., Malla, B., Berg, S., Thwaites, G., Yeboah-Manu, D., Bothamley, G., Mei, J., Wei, L., Bentley, S., Harris, S. R., Niemann, S., Diel, R., Aseffa, A., ... Gagneux, S. (2013). Out-of-Africa migration and Neolithic

co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature Genetics*, 45(10), 1182. <https://doi.org/10.1038/NG.2744>

Conradie, F., Bagdasaryan, T. R., Borisov, S., Howell, P., Mikiashvili, L., Ngubane, N., Samoilova, A., Skornykova, S., Tudor, E., Variava, E., Yablonskiy, P., Everitt, D., Wills, G. H., Sun, E., Olugbosi, M., Egizi, E., Li, M., Holsta, A., Timm, J., ... Spigelman, M. (2022). Bedaquiline–Pretomanid–Linezolid Regimens for Drug-Resistant Tuberculosis. *The New England Journal of Medicine*, 387(9), 823. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2119430>

Cook, G. M., Berney, M., Gebhard, S., Heinemann, M., Cox, R. A., Danilchanka, O., & Niederweis, M. (2009). Physiology of Mycobacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 55, 81–319. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(09\)05502-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05502-7)

Coscolla, M., Gagneux, S., Menardo, F., Loiseau, C., Ruiz-Rodriguez, P., Borrell, S., Darko Otchere, I., Asante-Poku, A., Asare, P., Sánchez-Busó, L., Gehre, F., Sanoussi, D., Antonio, M., Affolabi, D., Fyfe, J., Beckert, P., Niemann, S., Alabi, A. S., Grobusch, M. P., ... Brites, D. (2021). Phylogenomics of *Mycobacterium africanum* reveals a new lineage and a complex evolutionary history. *Microbial Genomics*, 7(2), 477. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000477>

Dalmer, O., Walter, E., & Firma, E. (1936). Merck in Darmstadt. Verfahren zur Herstellung von Abkömmlingen der Pyrazinmonocarbonsäure. In *Patentiert im Deutschen Reiche vom 8. Juli 1934 ab. Germany patent 632257 Klasse 12 p Gruppe 6 M 127990 IV a/12 p*.

Damper, P. D., & Epstein, W. (1981). Role of the membrane potential in bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 20(6), 803–808. <https://doi.org/10.1128/AAC.20.6.803>

Daniel, T. M. (2006). The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100(11), 1862–1870. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.08.006>

Dartois, V. A., & Rubin, E. J. (2022). Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. *Nature Reviews Microbiology*, 20, 685–701. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00731-y>

Davis, B. D. (1987). Mechanism of Bactericidal Action of Aminoglycosides. *Microbiological Reviews*, 51(3), 341–350.

Davis, J. M., & Ramakrishnan, L. (2009). The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection. *Cell*, 136(1), 49. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.11.014>

de Steenwinkel, J. E. M., de Knecht, G. J., ten Kate, M. T., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., Kremer, K., van Soolingen, D., & Bakker-Woudenberg, I. A. J. M. (2010). Time–kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), 2582–2589. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKQ374>

Demangel, C., Brodin, P., Cockle, P. J., Brosch, R., Majlessi, L., Leclerc, C., & Cole, S. T. (2004). Cell Envelope Protein PPE68 Contributes to *Mycobacterium tuberculosis* RD1 Immunogenicity Independently of A 10-Kilodalton Culture Filtrate Protein and ESAT-6. *Infection and Immunity*, 72(4), 2170–2176. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2170-2176.2004>

Dobbs, T. E., & Kimmerling, M. E. (2008). *Mycobacterium tuberculosis*. In *AIDS Therapy E-Book*. Elsevier.

Drew, R. H. (2010). Aminoglycosides. In J. Cohen, S. M. Opal, & W. G. Powderly (Eds.), *Infectious Diseases* (3rd ed., Vol. 2, pp. 1373–1381). Mosby. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-04579-7.00137-4>

Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. V., & Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(9), 523–539. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>

Dulberger, C. L., Rubin, E. J., & Boutte, C. C. (2020). The mycobacterial cell envelope — a moving target. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(1), 47–59. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0273-7>

Elisha, I. L., Botha, F. S., McGaw, L. J., & Eloff, J. N. (2017). The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *17*(1), 133. <https://doi.org/10.1186/S12906-017-1645-Z>

Elliott, T. O. J. P., Owolabi, O., Donkor, S., Kampmann, B., Hill, P. C., Ottenhoff, T. H. M., Haks, M. C., Kaufmann, S. H. E., Maertzdorf, J., & Sutherland, J. S. (2015). Dysregulation of Apoptosis Is a Risk Factor for Tuberculosis Disease Progression. *The Journal of Infectious Diseases*, *212*(9), 1469–1479. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIV238>

EMA. (2014a). *Deltyba: EPAR - Product Information*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/deltyba-epar-product-information_en.pdf

EMA. (2014b). *Sirturo: EPAR - Product Information*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/sirturo-epar-product-information_en.pdf

EMA. (2020). *Dovprela: EPAR - Product information*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/dovprela-epar-product-information_en.pdf

Etahiri, S., Bultel-Poncé, V., Caux, C., & Guyot, M. (2001). New bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Journal of Natural Products*, *64*(8), 1024–1027. <https://doi.org/10.1021/NP0002684>

Etna, M. P., Giacomini, E., Pardini, M., Severa, M., Bottai, D., Cruciani, M., Rizzo, F., Calogero, R., Brosch, R., & Coccia, E. M. (2015). Impact of *Mycobacterium tuberculosis* RD1-locus on human primary dendritic cell immune functions. *Scientific Reports*, *5*, 17078. <https://doi.org/10.1038/srep17078>

EUCAST. (2022). *EUCAST reading guide for broth microdilution. version 4.0*. www.eucast.org

FDA. (2012). *Sirturo (bedaquiline) 100 mg Tablets* (Vol. 10, Issue 2). <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/StructuredProductLabeling/default.htm>.

FDA. (2019). *Pretomanid Tablets*.
<https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.

Fedrizzi, T., Meehan, C. J., Grottola, A., Giacobazzi, E., Fregni Serpini, G., Tagliazucchi, S., Fabio, A., Bettua, C., Bertorelli, R., De Sanctis, V., Rumpianesi, F., Pecorari, M., Jousson, O., Tortoli, E., & Segata, N. (2017). Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. *Scientific Reports*, 7, 45258. <https://doi.org/10.1038/srep45258>

Fenical, W., Finer, J., & Clardp, J. (1976). Sphaerococcenol A; A New Rearranged Bromo-Diterpene from the Red Alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Tetrahedron Letters*, 10, 731–734.

Fernandes, G. F. S., Thompson, A. M., Castagnolo, D., Denny, W. A., & Dos Santos, J. L. (2022). Tuberculosis Drug Discovery: Challenges and New Horizons. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(11), 7489–7531. <https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.2C00227>/ASSET/IMAGES/LARGE/JM2C00227_0016.JPG

Forbes, M., Kuck, N. A., & Peets, E. A. (1962). Mode of Action of Ethambutol. *Journal of Bacteriology*, 84(5), 1099–1103.

Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., García, J. S., Morbidoni, H. R., de la Paz Santangelo, M., Cataldi, A. A., & Bigi, F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4(1), 3–66. <https://doi.org/10.4161/viru.22329>

Fox, H. H. (1952). The chemical approach to the control of tuberculosis. *Science*, 116(3006), 129–134. <https://doi.org/10.1126/science.116.3006.129>

Fox, W., Ellard, G. A., & Mitchison, D. A. (1999). Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council Tuberculosis Units, 1946–1986, with relevant subsequent publications. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 3(suppl 2), 231–279.

Fujiwara, M., Kawasaki, M., Hariguchi, N., Liu, Y., & Matsumoto, M. (2018). Mechanisms of resistance to delamanid, a drug for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 108, 186–194. <https://doi.org/10.1016/J.TUBE.2017.12.006>

Gagneux, S. (2018). Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, 16(4), 202–213. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.8>

Gajdács, M. (2019). The Continuing Threat of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS8020052>

Galagan, J. E. (2014). Genomic insights into tuberculosis. *Nature Reviews Genetics*, 15(5), 307–320. <https://doi.org/10.1038/nrg3664>

Germovsek, E., Barker, C. I., & Sharland, M. (2017). What do i need to know about aminoglycoside antibiotics? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 102(2), 89–93. <https://doi.org/10.1136/ARCHDISCHILD-2015-309069>

Gill, C. M., Dolan, L., Piggott, L. M., & McLaughlin, A. M. (2022). New developments in tuberculosis diagnosis and treatment. *Breathe*, 18(1). <https://doi.org/10.1183/20734735.0149-2021>

Ginsberg, A. M., & Spigelman, M. (2007). Challenges in tuberculosis drug research and development. *Nature Medicine*, *13*(3). <http://www.nature.com/naturemedicine>

Gopal, P., Sarathy, J. P., Yee, M., Ragunathan, P., Shin, J., Bhushan, S., Zhu, J., Akopian, T., Kandror, O., Lim, T. K., Gengenbacher, M., Lin, Q., Rubin, E. J., Grüber, G., & Dick, T. (2020). Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase. *Nature Communications*, *11*, 1661. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15516-1>

Goude, R., Amin, A. G., Chatterjee, D., & Parish, T. (2009). The Arabinosyltransferase EmbC Is Inhibited by Ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(10), 4146. <https://doi.org/10.1128/AAC.00162-09>

GraphPad Software. (2019a). (GraphPad Prism 8.0.2).

GraphPad Software. (2019b). *Row means with SD or SEM calculating Row means with SD, then Nonlinear regression (curve fit) followed by log(inhibitor) vs. response (three parameters)* (GraphPad Prism 8.0.2).

GraphPad Software. (2019c). *t tests (and Nonparametric Tests) using Unpaired Experimental Design followed by Mann-Whitney test* (GraphPad Prism 8.0.2).

Grosset, J. H., & Singer, T. (2013). Streptomycin. In S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2nd ed., pp. 568–569). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01484-4>

Guo, S., Wang, B., Fu, L., Chen, X., Zhang, W., Huang, H., & Lu, Y. (2021). *In vitro* and *In vivo* Activity of Oxazolidinone Candidate OTB-658 against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *65*(11), e00974-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.00974-21>

Gygli, S. M., Borrell, S., Trauner, A., & Gagneux, S. (2017). Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 354–373. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux011>

Hameed, H. M. A., Islam, M. M., Chhotaray, C., Wang, C., Liu, Y., Tan, Y., Li, X., Tan, S., Delorme, V., Yew, W. W., Liu, J., & Zhang, T. (2018). Molecular Targets Related Drug Resistance Mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-*Mycobacterium tuberculosis* Strains. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*(APR), 114. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00114>

Hards, K., Robson, J. R., Berney, M., Shaw, L., Bald, D., Koul, A., Andries, K., & Cook, G. M. (2015). Bactericidal mode of action of bedaquiline. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(7), 2028–2037. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKV054>

Hartkoorn, R. C., Chandler, B., Owen, A., Ward, S. A., Bertel Squire, S., Back, D. J., & Khoo, S. H. (2007). Differential drug susceptibility of intracellular and extracellular tuberculosis, and the impact of P-glycoprotein. *Tuberculosis*, *87*(3), 248–255. <https://doi.org/10.1016/J.TUBE.2006.12.001>

Hartmann, G., Honikel, K. O., Knüsel, F., & Nüesch, J. (1967). The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, *145*(3), 843–844. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(67\)90147-5](https://doi.org/10.1016/0005-2787(67)90147-5)

Hayman, J. (1984). *Mycobacterium ulcerans*: an infection from Jurassic time? *The Lancet*, 324(8410), 1015–1016. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(84\)91110-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(84)91110-3)

Hinshaw, H. C., Feldman, W. H., & Pfuetze, K. H. (1946). Treatment of tuberculosis with streptomycin; a summary of observations on one hundred cases. *Journal of the American Medical Association*, 132(13), 698–701. <https://doi.org/10.1001/JAMA.1946.02870480024007>

Ho, Y. I. I., Chan, C. Y., & Cheng, A. F. B. (1997). In-vitro activities of aminoglycoside-aminocyclitols against mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40(1), 27–32. <https://doi.org/10.1093/JAC/40.1.27>

Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2016). Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(9), a025320. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A025320>

Hsu, T., Hingley-Wilson, S. M., Chen, B., Chen, M., Dai, A. Z., Morin, P. M., Marks, C. B., Padiyar, J., Goulding, C., Gingery, M., Eisenberg, D., Russell, R. G., Derrick, S. C., Collins, F. M., Morris, S. L., King, C. H., & Jacobs, W. R. (2003). The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12420–12425. <https://doi.org/10.1073/pnas.1635213100>

Huang, Z., Luo, Q., Guo, Y., Chen, J., Xiong, G., Peng, Y., Ye, J., & Li, J. (2015). *Mycobacterium tuberculosis*-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas *In vitro*. *PLOS ONE*, 10(6), e0129744. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0129744>

Huitric, E., Verhasselt, P., Andries, K., & Hoffner, S. E. (2007). *In vitro* Antimycobacterial Spectrum of a Diarylquinoline ATP Synthase Inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 4202–4204. <https://doi.org/10.1128/AAC.00181-07>

Ibache-Quiroga, C., Oliveros, J. C., Couce, A., & Blázquez, J. (2018). Parallel evolution of high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* under low and high mutation supply rates. *Frontiers in Microbiology*, 9, 427. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00427/FULL>

Jana, S., & Deb, J. K. (2006). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 140–150. <https://doi.org/10.1007/S00253-005-0279-0/FIGURES/3>

Jia, X., Yang, L., Dong, M., Chen, S., Lv, L., Cao, D., Fu, J., Yang, T., Zhang, J., Zhang, X., Shang, Y., Wang, G., Sheng, Y., Huang, H., & Chen, F. (2017). The bioinformatics analysis of comparative genomics of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) provides insight into dissimilarities between intraspecific groups differing in host association, virulence, and epitope diversity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 88. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00088/FULL>

Jilani, T. N., Avula, A., Gondal, A. Z., & Siddiqui, A. H. (2022). Active Tuberculosis. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513246/>

Jnawali, H. N., & Ryoo, S. (2013). First- and Second-Line Drugs and Drug Resistance. In *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management* (pp. 163–180). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/54960>

Kanabalan, R. D., Lee, L. J., Lee, T. Y., Chong, P. P., Hassan, L., Ismail, R., & Chin, V. K. (2021). Human tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. *Microbiological Research*, 246, 126674. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126674>

Kaufmann, S. H. E., & McMichael, A. J. (2005). Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nature Medicine*, 11(Suppl 4), S33–S44. <https://doi.org/10.1038/NM1221>

Khodursky, A. B., Peter, B. J., Schmid, M. B., DeRisi, J., Botstein, D., Brown, P. O., & Cozzarelli, N. R. (2000). Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: Use of DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9424. <https://doi.org/10.1073/PNAS.97.17.9419>

Kloss, F., Krchnak, V., Krchnakova, A., Schieferdecker, S., Dreisbach, J., Krone, V., Möllmann, U., Hoelscher, M., & Miller, M. J. (2017). *In vivo* Dearomatization of the Potent Antituberculosis Agent BTZ043 via Meisenheimer Complex Formation. *Angewandte Chemie - International Edition*, 56(8), 2187–2191. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201609737>

Koch, A., Mizrahi, V., Digby, & Warner, F., & Warner, D. F. (2014). The impact of drug resistance on *Mycobacterium tuberculosis* physiology: what can we learn from rifampicin? *Emerging Microbes and Infections*, 3, e17. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.17>

Koch, R. (1882). Die Aetiologie der Tuberkulose. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 19, 221–230.

Kotra, L. P., Haddad, J., & Mobashery, S. (2000). Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3249–3256. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3249-3256.2000>

Koul, A., Arnoult, E., Lounis, N., Guillemont, J., & Andries, K. (2011). The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*, 469(7331), 483–490. <https://doi.org/10.1038/nature09657>

Koul, A., Dendouga, N., Vergauwen, K., Molenberghs, B., Vranckx, L., Willebrords, R., Ristic, Z., Lill, H., Dorange, I., Guillemont, J., Bald, D., & Andries, K. (2007). Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. *Nature Chemical Biology*, 3(6), 323–324. <https://doi.org/10.1038/nchembio884>

Koul, A., Vranckx, L., Dhar, N., Göhlmann, H. W. H., Neefs, J.-M., Schulz, M., Lu, P., Mørtz, E., McKinney, J. D., Andries, K., & Bald, D. (2014). Delayed bactericidal response of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline involves remodelling of bacterial metabolism. *Nature Communications*, 5, 3369. <https://doi.org/10.1038/ncomms4369>

Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, 10(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10020165>

Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), a027029. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A027029>

Kuck, N. A., Peets, E. A., & Forbes, M. (1963). Mode of Action of Ethambutol on *Mycobacterium tuberculosis*, Strain H37RV. *American Review of Respiratory Disease*, 87(6), 905–906.

Kundu, S., Biukovic, G., Grüber, G., & Dick, T. (2016). Bedaquiline Targets the ϵ Subunit of Mycobacterial F-ATP Synthase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(11), 6977–6979. <https://doi.org/10.1128/AAC.01291-16>

Laws, M., Jin, P., & Rahman, K. M. (2022). Efflux pumps in *Mycobacterium tuberculosis* and their inhibition to tackle antimicrobial resistance. *Trends in Microbiology*, 30(1), 57–68. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2021.05.001>

Lee, N., & Nguyen, H. (2022). Ethambutol. In *Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition* (pp. 2346–2360). StatPearls Publishing. <https://doi.org/10.1201/9781315152110>

Lehmann, J. (1946a). Determination of pathogenicity of tubercle bacilli by their intermediate metabolism. *The Lancet*, 247(6384), 14–15. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(46\)91184-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(46)91184-1)

Lehmann, J. (1946b). para-Aminosalicylic acid in the treatment of tuberculosis. *The Lancet*, 247(6384), 15–16. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(46\)91185-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(46)91185-3)

Li, G., Zhang, J., Li, C., Guo, Q., Jiang, Y., Wei, J., Qiu, Y., Zhao, X., Zhao, L. L., Lu, J., & Wan, K. (2016). Antimycobacterial activity of five efflux pump inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *The Journal of Antibiotics*, 69, 173–175. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.101>

LoBue, P. A., & Mermin, J. H. (2017). Latent tuberculosis infection: the final frontier of tuberculosis elimination in the USA. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(10), e327–e333. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30248-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30248-7)

Long, E. R. (1958). *The chemistry and chemotherapy of tuberculosis* (3rd ed.). Williams & Wilkins.

Machado, D., Pires, D., Perdigão, J., Couto, I., Portugal, I., Martins, M., Amaral, L., Anes, E., & Viveiros, M. (2016). Ion Channel Blockers as Antimicrobial Agents, Efflux Inhibitors, and Enhancers of Macrophage Killing Activity against Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149326>

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2019). Person-to-Person Bacterial and Viral Diseases. In S. Beaulacant (Ed.), *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed., pp. 923–954). Pearson Education Limited.

Maggi, N., Pasqualucci, C. R., Ballotta, R., & Sensi, P. (1966). Rifampicin: A New Orally Active Rifamycin. *Chemotherapy*, 11(5), 285–292. <https://doi.org/10.1159/000220462>

Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C., & Stover, C. K. (1996). Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of Bacteriology*, 178(5), 1274–1282. <https://doi.org/10.1128/JB.178.5.1274-1282.1996>

Manjunatha, U., Boshoff, H. I. M., & Barry, C. E. (2009). The mechanism of action of PA-824: Novel insights from transcriptional profiling. *Communicative & Integrative Biology*, 2(3), 218. <https://doi.org/10.4161/CIB.2.3.7926>

Marakalala, M. J., Raju, R. M., Sharma, K., Zhang, Y. J., Eugenin, E. A., Prideaux, B., Daudelin, I. B., Chen, P. Y., Booty, M. G., Kim, J. H., Eum, S. Y., Via, L. E., Behar, S. M., Barry, C. E., Mann, M., Dartois, V., & Rubin, E. J. (2016). Inflammatory signaling in human tuberculosis granulomas is spatially organized. *Nature Medicine*, 22(5), 531–538. <https://doi.org/10.1038/nm.4073>

Maroushek, S. R. (2020). Principles of Antimycobacterial Therapy. In *Nelson Textbook of Pediatrics* (21st ed., pp. 1560-1565.e1). Elsevier.

Matsumoto, M., Hashizume, H., Tomishige, T., Kawasaki, M., Tsubouchi, H., Sasaki, H., Shimokawa, Y., & Komatsu, M. (2006). OPC-67683, a Nitro-Dihydro-Imidazooxazole Derivative with Promising Action against Tuberculosis *In vitro* and In Mice. *PLOS Medicine*, 3(11), 2131–2144. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030466>

Mcgrath, M., Gey Van Pittius, N. C., Van Helden, P. D., Warren, R. M., & Warner, D. F. (2014). Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(2), 292–302. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt364>

Meyer, H., & Mally, J. (1912). Hydrazine derivatives of pyridine-carboxylic acids. *Monatshefte Für Chemie Und Verwandte Teile Anderer Wissenschaften*, 33, 393–414.

Mitchison, D. A. (1979). Basic Mechanisms of Chemotherapy. *Chest*, 76(6), 771–780. <https://doi.org/10.1378/chest.76.6.771>

Mitchison, D. A. (1985). The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle*, 66(3), 219–225. [https://doi.org/10.1016/0041-3879\(85\)90040-6](https://doi.org/10.1016/0041-3879(85)90040-6)

Mitra, R., Han, J., Xiang, H., & Bera, S. (2021). Importance of microbial secondary metabolites in health care applications. In A. Kumar, J. Singh, & J. Samuel (Eds.), *Volatiles and Metabolites of Microbes* (pp. 349–383). Academic Press.

Mobbili, G., Romaldi, B., Sabbatini, G., Amici, A., Marcaccio, M., Galeazzi, R., Laudadio, E., Armeni, T., & Minnelli, C. (2023). Identification of Flavone Derivative Displaying a 4'-Aminophenoxy Moiety as Potential Selective Anticancer Agent in NSCLC Tumor Cells. *Molecules*, 28(7), 3239. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28073239/S1>

Mogana, R., Adhikari, A., Tzar, M. N., Ramliza, R., & Wiart, C. (2020). Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* miq. Against bacterial clinical isolates. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2837-5>

Mudde, S. E., Upton, A. M., Lenaerts, A., Bax, H. I., & De Steenwinkel, J. E. M. (2022). Delamanid or pretomanid? A Solomonian judgement! *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(4), 880–902. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAB505>

Mueller, M., De La Peña, A., & Derendorf, H. (2004). Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill Curves versus MIC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(2), 369–377. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.369-377.2004>

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Murray, J. F., Schraufnagel, D. E., & Hopewell, P. C. (2015). Treatment of tuberculosis: A historical perspective. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(12), 1749–1759. https://doi.org/10.1513/ANNALSATS.201509-632PS/SUPPL_FILE/DISCLOSURES.PDF

Nahid, P., Mase, S. R., Migliori, G. B., Sotgiu, G., Bothamley, G. H., Brozek, J. L., Cattamanchi, A., Peter Cegielski, J., Chen, L., Daley, C. L., Dalton, T. L., Duarte, R., Fregonese, F., Robert Horsburgh, C., Khan, F. A., Kheir, F., Lan, Z., Lardizabal, A., Lauzardo, M., ... Ann Raftery, R. N. (2019). Treatment of drug-resistant tuberculosis an official ATS/CDC/ERS/IDSA clinical practice guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200(10), E93–E142. <https://doi.org/10.1164/rccm.201909-1874ST>

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1999). *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline M26-A* (Vol. 19, Issue 18, pp. 13–14). National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Ngabonziza, J. C. S., Loiseau, C., Marceau, M., Jouet, A., Menardo, F., Tzfidia, O., Antoine, R., Niyigena, E. B., Mulders, W., Fissette, K., Diels, M., Gaudin, C., Duthoy, S., Ssengooba, W., André, E., Kaswa, M. K., Habimana, Y. M., Brites, D., Affolabi, D., ... Supply, P. (2020). A sister lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex discovered in the African Great Lakes region. *Nature Communications*, 11, 2917. <https://doi.org/10.1038/S41467-020-16626-6>

Ning, Q., Wang, D., Cheng, F., Zhong, Y., Ding, Q., & You, J. (2021). Predicting rifampicin resistance mutations in bacterial RNA polymerase subunit beta based on majority consensus. *BMC Bioinformatics*, 22, 210. <https://doi.org/10.1186/S12859-021-04137-0/TABLES/3>

Nuermberger, E. L., Martínez-Martínez, M. S., Sanz, O., Urones, B., Esquivias, J., Soni, H., Tasneen, R., Tyagi, S., Li, S. Y., Converse, P. J., Boshoff, H. I., Robertson, G. T., Besra, G. S., Abrahams, K. A., Upton, A. M., Mdluli, K., Boyle, G. W., Turner, S., Fotouhi, N., ... Jiménez, E. (2022). GSK2556286 Is a Novel Antitubercular Drug Candidate Effective *In vivo* with the Potential To Shorten Tuberculosis Treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(6), e00132-22. <https://doi.org/10.1128/AAC.00132-22>

O'Connor, C., & Brady, M. F. (2022). Isoniazid. In *Kucers' The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs* (7th ed., pp. 2321–2345). StatPearls Publishing. <https://doi.org/10.1201/9781315152110>

Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Yamaguchi, M., Nakayama, T., Tanaka, T., Kusumi, T., & Tanaka, Y. (2006). Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(29), 11075. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0604246103>

Opal, S. M., & Pop-Vicas, A. (2015). Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (8th ed., Vol. 1, pp. 235-251.e3). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00018-7>

Oxford Vaccine Group. (2022, January 19). *BCG Vaccine (TB vaccine) | Vaccine Knowledge*. <https://vk.ovg.ox.ac.uk/vk/bcg-vaccine>

Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 221–233. <https://doi.org/10.1038/NRM2125>

Paige, C., & Bishai, W. R. (2010). Penitentiary or penthouse condo: The tuberculous granuloma from the microbe's point of view. *Cellular Microbiology*, 12(3), 301–309. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2009.01424.X>

Palomino, J. C., & Martin, A. (2013). Tuberculosis Clinical Trial Update and the Current Anti-Tuberculosis Drug Portfolio. *Current Medicinal Chemistry*, 20, 3785–3796.

Palomino, J. C., & Martin, A. (2014). Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics*, 3(3), 340. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS3030317>

Papich, M. G. (2016). Spectinomycin, Spectinomycin Dihydrochloride Pentahydrate. In *Saunders Handbook of Veterinary Drugs: Small and Large Animal* (4th ed., pp. 735–736). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00519-2>

Pfyffer, G. E. (2015). Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In J. H. Jorgensen, K. C. Carroll, G. Funke, M. A. Pfaller, M. L. Landry, S. S. Richter, & D. W. Warnock (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (11th ed., pp. 536–569). Wiley.

Piddock, L. J. V., Williams, K. J., & Ricci, V. (2000). Accumulation of rifampicin by *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(2), 159–165. <https://doi.org/10.1093/JAC/45.2.159>

Popplewell, A. G., Miller, J. D., Greene, M. E., & Landwehr, A. (1966). Capreomycin in original treatment cases of pulmonary tuberculosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 135(2), 989–1005.

Pule, C. M., Sampson, S. L., Warren, R. M., Black, P. A., Van Helden, P. D., Victor, T. C., & Louw, G. E. (2016). Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71, 17–26. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv316>

Purwantini, E., & Mukhopadhyay, B. (2013). Rv0132c of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a coenzyme F 420-dependent hydroxymycolic acid dehydrogenase. *PLOS ONE*, 8(12), 81985. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0081985>

Pym, A. S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M., & Cole, S. T. (2002). Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Molecular Microbiology*, 46(3), 709–717. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03237.x>

Ragunathan, P., Cole, M., Latka, C., Aragaw, W. W., Hegde, P., Shin, J., Subramanian Manimekalai, M. S., Rishikesan, S., Aldrich, C. C., Dick, T., & Grüber, G. (2021). *Mycobacterium*

tuberculosis PanD structure-function analysis and identification of a potent pyrazinoic acid-derived enzyme inhibitor. *ACS Chemical Biology*, 16(6), 1039. <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMBIO.1C00131>

Ramanathan, M. R., Howell, C. K., & Sanders, J. M. (2019). Drugs in tuberculosis and leprosy. In S. D. Ray (Ed.), *Side Effects of Drugs Annual* (Vol. 41, pp. 321–338). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/BS.SEDA.2019.08.010>

Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2010.08.003>

Ramirez-Lapausa, M., Menendez-Saldana, A., & Noguerado-Asensio, A. (2015). Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Revista Española de Sanidad Penitenciaria*, 17, 3–11.

Ramond, E., Jamet, A., Coureuil, M., & Charbit, A. (2019). Pivotal Role of Mitochondria in Macrophage Response to Bacterial Pathogens. *Frontiers in Immunology*, 10, 2461. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02461>

Ramon-Garcia, S., Bates, R., González del Río, R., Gamallo, P., Mendoza-Losana, A., Ferrer-Bazaga, S., Thompson, C., & Barros, D. (2019). Sanfetrinem, Repurposing an oral beta-lactam with intracellular activity for the treatment of Tuberculosis. In *Abstract Book of 50th World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union)* (p. S591).

Rao, S. P. S., Alonso, S., Rand, L., Dick, T., & Pethe, K. (2008). The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(33), 11950. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0711697105>

Rawat, R., Whitty, A., & Tonge, P. J. (2003). The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 13886. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2235848100>

Rawlins, M. (2012). The disputed discovery of streptomycin. *The Lancet*, 380(9838), 207. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)61202-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(12)61202-1)

Reddy, D. S., Sinha, A., Kumar, A., & Saini, V. K. (2022). Drug re-engineering and repurposing: A significant and rapid approach to tuberculosis drug discovery. *Archiv Der Pharmazie*, 355, e2200214. <https://doi.org/10.1002/ARDP.202200214>

Riddell, R. W., Stewart, S. M., & Somner, A. R. (1960). Ethionamide. *The BMJ*, 2, 1207–1208.

Riley, R. L., Mills, C. C., Nyka, W., Weinstock, N., Storey, P. B., Sultan, L. U., Riley, M. C., & Wells, W. F. (1959). Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis: a two-year study of contagion in a tuberculosis ward. *American Journal of Epidemiology*, 70(2), 185–196.

Riley, R. L., Mills, C. C., O'Grady, F., Sultan, L. U., Wittstadt, F., & Shivpuri, D. N. (1962). Infectiousness of air from a tuberculosis ward. Ultraviolet irradiation of infected air: comparative infectiousness of different patients. *American Review of Respiratory Disease*, 85(4), 511–525.

Riley R. L., & O'Grady F. (1961). *Airborne infection: transmission and control*. Macmillan Co.

Rodrigues, D., Alves, C., Horta, A., Pinteus, S., Silva, J., Culioli, G., Thomas, O. P., & Pedrosa, R. (2015). Antitumor and antimicrobial potential of bromoditerpenes isolated from the Red Alga, *Sphaerococcus coronopifolius*. *Marine Drugs*, *13*(2), 713–726. <https://doi.org/10.3390/md13020713>

Roubert, C., Fontaine, E., & Upton, A. M. (2022). “Upcycling” known molecules and targets for drug-resistant TB. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 1029044. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.1029044>

Rudraraju, R. S., Daher, S. S., Gallardo-Macias, R., Wang, X., Neiditch, M. B., & Freundlich, J. S. (2022). *Mycobacterium tuberculosis* KasA as a drug target: Structure-based inhibitor design. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 1008213. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.1008213/BIBTEX>

Schatz, A., Bugle, E., & Waksman, S. A. (1944). Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*†. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *55*(1), 66–69. <https://doi.org/10.3181/00379727-55-14461>

Schön, T., Werngren, J., Machado, D., Borroni, E., Wijkander, M., Lina, G., Mouton, J., Matuschek, E., Kahlmeter, G., Giske, C., Santin, M., Cirillo, D. M., Viveiros, M., & Cambau, E. (2021). Multicentre testing of the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination on *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology and Infection*, *27*(2), 288.e1-288.e4. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2020.10.019>

Scorpio, A., & Zhang, Y. (1996). Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Medicine*, *2*(6), 662–667. <https://doi.org/10.1038/nm0696-662>

Sensi, P., Maggi, N., Füresz, S., & Maffii, G. (1966). Chemical modifications and biological properties of rifamycins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *6*, 699–714.

Sensi, P., Margalith, P., & Timbal, M. T. (1959). Rifomycin, a new antibiotic; preliminary report. *Il Farmaco; Edizione Scientifica*, *14*(2), 146–147.

Sharma, A., Gupta, V. K., & Pathania, R. (2019). Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *The Indian Journal of Medical Research*, *149*(2), 145. https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_2079_17

Sheedy, F. J., & Divangahi, M. (2021). Targeting immunometabolism in host defence against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*, *162*(2), 145–159. <https://doi.org/10.1111/imm.13276>

Shi, L., Jiang, Q., Bushkin, Y., Subbian, S., & Tyagi, S. (2019). Biphasic Dynamics of Macrophage Immunometabolism during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *America Society for Microbiology*, *10*(2), e02550-18. <https://doi.org/10.1128/mBio>

Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J. S., Barry, C. E., Wang, H., Zhang, W., & Zhang, Y. (2011). Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*: a potential

mechanism for shortening the duration of tuberculosis chemotherapy. *Science*, 333(6049), 1632. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1208813>

Silva, M. L., Cá, B., Osório, N. S., Rodrigues, P. N. S., Maceiras, A. R., & Saraiva, M. (2022). Tuberculosis caused by *Mycobacterium africanum*: Knowns and unknowns. *PLOS Pathogens*, 18(5), e1010490. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1010490>

Silva Miranda, M., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F., & Altare, F. (2012). The tuberculous granuloma: An unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clinical and Developmental Immunology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/139127>

Sim, J. H., Jamaludin, N. S., Khoo, C. H., Cheah, Y. K., Halim, S. N. B. A., Seng, H. L., & Tiekink, E. R. T. (2014). *In vitro* antibacterial and time-kill evaluation of phosphane-gold(I) dithiocarbamates, R₃PAu[S₂CN(iPr)CH₂CH₂OH] for R = Ph, Cy and Et, against a broad range of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Gold Bulletin*, 47, 225–236. <https://doi.org/10.1007/s13404-014-0144-y>

Šimunović, K., Solnier, J., Alperth, F., Kunert, O., Smole Možina, S., & Bucar, F. (2021). Efflux pump inhibition and resistance modulation in *Mycobacterium smegmatis* by peucedanum ostruthium and its coumarins. *Antibiotics*, 10(9), 1075. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10091075/S1>

Singh, R., Manjunatha, U., Boshoff, H. I. M., Young, H. H., Niyomrattanakit, P., Ledwidge, R., Dowd, C. S., Ill, Y. L., Kim, P., Zhang, L., Kang, S., Keller, T. H., Jiricek, J., & Barry, C. E. (2008). PA-824 Kills Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by Intracellular NO Release. *Science*, 322(5906), 1395. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1164571>

Sköld, M., & Behar, S. M. (2008). Tuberculosis Triggers a Tissue-Dependent Program of Differentiation and Acquisition of Effector Functions by Circulating Monocytes 1. *The Journal of Immunology*, 181(9), 6349–6360. www.jimmunol.org

Smith, A., Pennefather, P. M., Kaye, S. B., & Hart, C. A. (2001). Fluoroquinolones: Place in Ocular Therapy. *Drugs*, 61(6), 747–761.

Smyrniotopoulos, V., Quesada, A., Vagias, C., Moreau, D., Roussakis, C., & Roussis, V. (2008). Cytotoxic bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Tetrahedron*, 64(22), 5184–5190. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.03.042>

Smyrniotopoulos, V., Vagias, C., Rahman, M. M., Gibbons, S., & Roussis, V. (2008a). Brominated diterpenes with antibacterial activity from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1386–1392. <https://doi.org/10.1021/np8001817>

Smyrniotopoulos, V., Vagias, C., Rahman, M. M., Gibbons, S., & Roussis, V. (2008b). Brominated diterpenes with antibacterial activity from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1386–1392. <https://doi.org/10.1021/np8001817>

Smyrniotopoulos, V., Vagias, C., Rahman, M. M., Gibbons, S., & Roussis, V. (2010). Structure and antibacterial activity of brominated diterpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *Chemistry and Biodiversity*, 7(1), 186–195. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800309>

Song, L., & Wu, X. (2016). Development of efflux pump inhibitors in antituberculosis therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 47(6), 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.007>

Stover, C. K., de La Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., Bansal, G. P., Young, J. F., Lee, M. H., Hatfull, G. F., Snapper, S. B., Barletta, R. G., Jacobs, W. R., & Bloom, B. R. (1991). New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*, 351(6326), 456–460. <https://doi.org/10.1038/351456a0>

Stover, C. K., Warrener, P., VanDevanter, D. R., Sherman, D. R., Arain, T. M., Langhorne, M. H., Anderson, S. W., Towell, J. A., Yuan, Y., McMurray, D. N., Kreiswirth, B. N., Barry, C. E., & Baker, W. R. (2000). A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature*, 406, 962–966. www.nature.com

Suárez, I., Fünfer, S. M., Rademacher, J., Fätkenheuer, G., Kröger, S., & Rybniker, J. (2019). The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Deutsches Arzteblatt International*, 116(43), 729–735. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0729>

Supply, P., Marceau, M., Mangenot, S., Roche, D., Rouanet, C., Khanna, V., Majlessi, L., Criscuolo, A., Tap, J., Pawlik, A., Fiette, L., Orgeur, M., Fabre, M., Parmentier, C., Frigui, W., Simeone, R., Boritsch, E. C., Debie, A. S., Willery, E., ... Brosch, R. (2013). Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Genetics* 2013 45:2, 45(2), 172–179. <https://doi.org/10.1038/ng.2517>

Suresh, A. B., Rosani, A., & Wadhwa, R. (2022). Rifampin. In *Encyclopedia of Toxicology* (3rd ed., pp. 134–136). StatPearls Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00781-8>

Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. F., & Arrow, A. S. (1987). Bacterial Uptake of Aminoglycoside Antibiotics. *Microbiological Reviews*, 51(4), 439–457.

Taxonomy browser (Mycobacterium). (n.d.). Retrieved January 2, 2023, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1763&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Taylor, G. M., Stewart, G. R., Cooke, M., Chaplin, S., Ladva, S., Kirkup, J., Palmer, S., & Young, D. B. (2003). Koch's Bacillus - a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology*, 149(11), 3213–3220. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26654-0>

The Actinobacteria, Part A. (2012). In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. 5, pp. 312–317). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4>

The Therapeutic Trials Committee of the Swedish National Association against Tuberculosis. (1950). para-Aminosalicylic Acid Treatment in Pulmonary Tuberculosis. *American Review of Tuberculosis*, 61(5), 597–612. <https://www.jameslindlibrary.org/swedish-national-association-against-tuberculosis-therapeutic-trials-committee-1950/>

Thiriou, J. D., Martinez-Martinez, Y. B., Endsley, J. J., & Torres, A. G. (2020). Hacking the host: exploitation of macrophage polarization by intracellular bacterial pathogens. *Pathogens and Disease*, 78(1), ftaa009. <https://doi.org/10.1093/FEMSPD/FTAA009>

Thomas, J. P., Baughn, C. O., Wilkinson, R. G., & Shepherd, R. G. (1961). A New Synthetic Compound with Antituberculous Activity in Mice: Ethambutol (Dextro-2, 2'- (Ethylenediimino)-di-1-Butanol). *American Review of Respiratory Disease*, 83(6), 891–893.

Thomson, R. M., & Yew, W. W. (2009). When and how to treat pulmonary non-tuberculous mycobacterial diseases. *Official Journal of the Asian Pacific Society of Respiratory - Respiriology*, 14(1), 12–26. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1843.2008.01408.X>

Trefzer, C., Kovierová, Kovierová, †, H. S. ˇ, Buroni, S., Bobovská, Bobovská, A., Nenci, S., Molteni, E., Pojer, F., Pasca, M. R., Makarov, V., Cole, S. T., Riccardi, G., Mikuš Ová, Ová, K., & Johnsson, K. (2012). Benzothiazinones Are Suicide Inhibitors of Mycobacterial Decaprenylphosphoryl-β-D-ribofuranose 2'-Oxidase DprE1. *Journal of the American Chemical Society*, 134, 912–915. <https://doi.org/10.1021/ja211042r>

Trunz, B. B., Fine, P., & Dye, C. (2006). Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *The Lancet*, 367(9517), 1173–1180. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68507-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68507-3)

Umezawa, H. (1958). Kanamycin: Its Discovery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 76(2), 20–26.

van den Bossche, A., Varet, H., Sury, A., Sismeiro, O., Legendre, R., Coppee, J. Y., Mathys, V., & Ceysens, P. J. (2019). Transcriptional profiling of a laboratory and clinical *Mycobacterium tuberculosis* strain suggests respiratory poisoning upon exposure to delamanid. *Tuberculosis*, 117, 18–23. <https://doi.org/10.1016/J.TUBE.2019.05.002>

Vincent, A. T., Nyongesa, S., Morneau, I., Reed, M. B., Tocheva, E. I., & Veyrier, F. J. (2018). The mycobacterial cell envelope: A relict from the past or the result of recent evolution? *Frontiers in Microbiology*, 9, 2341. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02341>

Volkman, H. E., Pozos, T. C., Zheng, J., Davis, J. M., Rawls, J. F., & Ramakrishnan, L. (2010). Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science*, 327(5964), 466–469. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1179663/SUPPL_FILE/VOLKMAN.SOM.PDF

Wang, X., Lang, X., Wang, F., Tan, H., Li, G., Li, P., Hu, J., Wang, B., & Li, Y. (2023). Simultaneous determination of NTB-3119, a novel anti-tuberculosis agent, and its major metabolites in mouse plasma by LC-MS/MS and its application in preclinical pharmacokinetics study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 224, 115172. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2022.115172>

WHO. (n.d.). *BCG vaccine*. Retrieved December 20, 2022, from <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/bcg>

WHO. (2010). Essential first-line antituberculosis drugs. In *Treatment of tuberculosis: Guidelines* (4th ed.).

WHO. (2014). *Draft global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015: Report by the Secretariat*. https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA67/A67_11-en.pdf

WHO. (2015). *The End TB Strategy*. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTML-TB-2015.19>

WHO. (2019). *WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment*.

WHO. (2021). *World Malaria Report 2021*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240040496>

WHO. (2022a). *Global Tuberculosis Report 2022*. <http://apps.who.int/bookorders>.

WHO. (2022b). *The Sustainable Development Goals Report*.

WHO. (2022c). *WHO consolidated guidelines on tuberculosis Module 4: Treatment –Drug-resistant tuberculosis treatment*.

WHO. (2022d). *WHO operational handbook on tuberculosis Module 4: Treatment – drug-susceptible tuberculosis treatment*.

WHO. (2022e). 7. *TB research and innovation*. Global Tuberculosis Report. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022/tb-research-and-innovation>

Working Group on New TB Drugs. (n.d.-a). *Clinical Pipeline*. Retrieved February 27, 2023, from <https://www.newtbdrugs.org/pipeline/clinical>

Working Group on New TB Drugs. (n.d.-b). *Terms of the Global TB Drug Pipeline*.

Working Group on New TB Drugs. (2022, November 3). *2022 Global New TB Drug Pipeline*. https://docs.google.com/presentation/d/0B3BR7L--n_1AQ0c1ZjY5bzF3VnM/edit?resourcekey=0-2_9AtXD5aeK9t_lpHwllcA#slide=id.p1

Yang, D., Taylor, Z. E., Handy, S., Li, S., Liu, J., Stabenow, J., Zalduondo, L., Jonsson, C. B., Altman, E., & Kong, Y. (2020). Identification of Anti-tuberculosis Compounds From Aurone Analogs. *Frontiers in Microbiology, 11*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01004/FULL>

Yeager, R. L., Munroe, W. G. C., & Dessau, F. I. (1952). Pyrazinamide (aldinamide*) in the treatment of pulmonary tuberculosis. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases, 65*(5), 523–546.

Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., & Cole, S. (1992). The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature, 358*, 591–593.

Zhang, Y., & Mitchison, D. (2003). The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 7*(1), 6–21.

Zhang, Y., Permar, S., & Sun, Z. (2002). Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of Medical Microbiology, 51*(1), 42–49.

Zhang, Y., & Yew, W. W. (2015). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Update 2015. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 19*(11), 1276–1289. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0389>

Zhao, H., Wang, B., Fu, L., Li, G., Lu, H., Liu, Y., Sheng, L., Li, Y., Zhang, B., Lu, Y., Ma, C., Huang, H., Zhang, D., & Lu, Y. (2020). Discovery of a Conformationally Constrained Oxazolidinone with Improved Safety and Efficacy Profiles for the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(17), 9316–9339. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00500>

Zhu, C., Liu, Y., Hu, L., Yang, M., & He, Z. G. (2019). Molecular mechanism of the synergistic activity of ethambutol and isoniazid against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16741–16750. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002693>

Zulu, M., Monde, N., Nkhoma, P., Malama, S., & Munyeme, M. (2021). Nontuberculous Mycobacteria in Humans, Animals, and Water in Zambia: A Systematic Review. *Frontiers in Tropical Diseases*, 2, 679501. <https://doi.org/10.3389/fitd.2021.679501>

Zwergel, C., Gaascht, F., Valente, S., Diederich, M., Bagrel, D., & Kirsch, G. (2012). Aurones: Interesting Natural and Synthetic Compounds with Emerging Biological Potential. *Natural Product Communication (NPC)*, 7(3), 389–394.