



**Tuberculose: a importância da investigação de novos fármacos
no contexto do desenvolvimento de estirpes de Mtb resistentes
aos fármacos disponíveis**

Yaryna Sofiya Buzan

Dissertação para obtenção de grau Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes
dos Santos Cristiano

2022



**Tuberculose: a importância da investigação de novos fármacos
no contexto do desenvolvimento de estirpes de Mtb resistentes
aos fármacos disponíveis**

Yaryna Sofiya Buzan

Dissertação para obtenção de grau Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes
dos Santos Cristiano

2022

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

“Declaro ser autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados são devidamente citados no texto e constam na listagem de referências incluída.”

“Copyright” de Yaryna Sofiya Buzan

“A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

Agradecimentos

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me deram o tal indispensável apoio durante toda a minha jornada. Agradeço pelo todo amor e carinho. Pelas palavras certas nos momentos certos. Por me provarem que os sonhos são mais atingíveis do que se pensa. Por me ensinarem que a família é o tesouro mais valioso e tão necessário. E por todos os sacrifícios que fizeram para me dar uma vida melhor ...

Um obrigado, maior que o universo, ao meu namorado Fernando, pelo todo amor, carinho e sobretudo paciência e apoio tão imprescindível. Pela facilidade que me roubava sorrisos e me mantinha de bom humor, mesmo nos piores momentos. Eternamente agradecida por caminhar ao meu lado e me apoiar e participar na minha evolução, profissional e pessoal.

Aos meus amigos, Roxane, Yana, Maria e João obrigada por todos os momentos, pela vossa ajuda e sobretudo por todo o companheirismo que tiveram para comigo. À Catarina, tenho muito a agradecer pela amizade que certamente levarei para a vida e, claro, um obrigada por todos os momentos de diversão e histórias engraçadas durante a rotina universitária. Sem dúvida que todos contribuíram de alguma forma para a formação da pessoa que sou hoje e pelo sucesso obtido no meu percurso académico. Sem vocês, não teria sido a mesma coisa.

Dedico meu especial agradecimento à professora Doutora Maria de Lurdes Cristiano por ter aceite ser a minha orientadora da dissertação. Agradeço pelo gosto que me incutiu na disciplina Química Farmacêutica que culminou nesta monografia. Um enorme obrigado pela total disponibilidade que sempre apresentou e a todo o trabalho rigoroso que introduziu neste trabalho.

Agradeço às minhas orientadoras de estágio, Dra. Francisca Santos e Dra. Joaquina Poeiras, por me familiarizarem com a realidade profissional, por me ensinarem, na prática, a importância do farmacêutico na comunidade e da importância que o tema desta dissertação realmente acarreta.

E, por fim, quero agradecer à Universidade do Algarve por me ter acolhido tão calorosamente, pela bagagem de conhecimentos, experiências e oportunidades que me forneceu e pela oportunidade de conhecer pessoas fantásticas que levarei para sempre em meu coração.

Resumo

A tuberculose (TB) é uma doença bacteriana causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Este agente infeccioso é responsável por um grande número de infetados (1/3 da população mundial), podendo a infecção apresentar-se sob duas formas: ativa (sintomática) e latente (assintomática).

O tratamento de TB resultante de infecção por estirpes de Mtb suscetíveis baseia-se na terapêutica de 1ª linha, que compreende a administração de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol. Para TB resultante de estirpes de Mtb infetante resistentes aos fármacos de 1ª linha recorre-se à terapêutica de 2ª linha.

O tratamento atual da TB é eficaz, porém evidencia toxicidade e necessidade de tratamentos prolongados, o que prejudica a adesão à terapêutica. O panorama é agravado pelo surgimento de novas estirpes de Mtb resistentes aos fármacos tuberculostáticos em uso, constituindo a TB resistente um dos maiores problemas de saúde pública, principalmente em países menos desenvolvidos. É de primordial importância aprofundar o conhecimento relativamente aos mecanismos de ação, limitações e respetivos mecanismos de resistência dos fármacos em uso, bem como identificar novos alvos terapêuticos de Mtb, para desenvolver novos fármacos contra a TB que contornem os problemas existentes.

A presente dissertação resume o estado da arte relativamente às estratégias atuais de tratamento da TB e aos avanços científicos no desenvolvimento de novos fármacos para combater esta doença. São abordadas as características da TB e o seu impacto global, as terapêuticas disponíveis e suas limitações, bem como as perspectivas futuras na descoberta de novos alvos terapêuticos e no desenvolvimento de novos fármacos. A autora deste trabalho focou particularmente o estudo dos mecanismos de ação e estudos de relação estrutura-atividade dos fármacos antituberculosos atuais, relacionando-os com estudos de “*docking*” e com os genes responsáveis pelas mutações que criam estirpes resistentes, bem como a pesquisa de moléculas de classes químicas promissoras que atuam em alvos terapêuticos diferentes.

Palavras-chave: Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, fármacos antimicobacterianos, resistências, novos alvos terapêuticos, desenho racional de fármacos

Abstract

Tuberculosis (TB) is a bacterial disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). This infectious agent is responsible for a large number of infections around the world (1/3 of the world population), and the infection may assume two forms: active (symptomatic) and latent (asymptomatic).

The treatment of TB resulting from infection by susceptible strains of Mtb is based on first-line therapy protocols, which comprise the administration of rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol. For TB resulting from strains of infectious Mtb resistant to 1st-line drugs, 2nd-line therapy is used.

Current TB treatment is effective, yet it shows toxicity and the need for prolonged treatments, which impairs adherence to the therapy. This scenario is worsened by the emergence of new strains of Mtb resistant to the tuberculostatic drugs in use, making resistant TB one of the biggest public health problems, especially in less developed countries. It is thus of paramount importance to deepen the knowledge regarding the mechanisms of action, limitations and respective mechanisms of resistance of the drugs in use, as well as to identify new therapeutic targets of Mtb, so as to develop new drugs against TB that circumvent the existing problems.

This dissertation summarizes the state of the art regarding current TB treatment strategies and scientific advances in the identification of new targets and development of new drugs to combat this disease. Emphasis is given to the characteristics of TB and its global impact, the therapies available and their limitations, as well as future perspectives in the discovery of new therapeutic targets and in the development of better drugs. The author of this work particularly focused on the study of mechanisms of action and the structure-activity relationship studies of current antituberculous drugs, relating them to “docking” studies and the genes responsible for the mutations that create resistant strains, as well as the research of molecules of promising chemical classes that act on different therapeutic targets.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, antimycobacterial drugs, resistance, new therapeutic targets, rational drug design

Índice de figuras

Figura 1.1 – Cronologia das descobertas dos compostos usados no tratamento da tuberculose (TB), desde a Segunda Guerra Mundial até 2000.....	9
Figura 1.2 – Taxas de incidência da TB no mundo por 100000 habitantes, em 2020.....	10
Figura 1.3 – Estrutura da parede celular de Mtb.....	14
Figura 1.4 – Interação entre Mtb e a resposta inflamatória do hospedeiro.....	16
Figura 1.5 – Mecanismos envolvidos na ativação de macrófagos e linfócitos T por micobactérias.....	18
Figura 1.6 – História natural da doença no hospedeiro imunocomprometido após a exposição a partículas contendo Mtb.....	20
Figura 1.7 – Ciclo de transmissão de Mtb.....	21
Figura 1.8 – Patogenicidade de TB.....	23
Figura 2.1 – Mecanismo de ação da isoniazida.....	38
Figura 2.2 – Súmula dos resultados dos estudos de relação estrutura-atividade (SAR) da isoniazida.....	39
Figura 2.3 – Representação do mecanismo de interação da rifampicina com o sítio ativo da subunidade β da ARN polimerase.....	40
Figura 2.4 – Súmula dos resultados dos estudos de SAR da rifampicina.....	41
Figura 2.5 – Representação dos mecanismos de ação de pirazinamida.....	42
Figura 2.6 – Súmula dos resultados dos estudos de SAR da pirazinamida.....	43
Figura 2.7 – Modelação da sobreposição do sítio ativo do etambutol (azul claro) com o dissacárido D-arabinose (amarelo), ambos ligados à subunidade EmbB.....	43

Figura 2.8 – Súmula dos resultados dos estudos de SAR do etambutol.....	44
Figura 2.9 – Representação esquemática de: (A) Metabolismo do ácido fólico pela Mtb; (B) Inibição do metabolismo do ácido fólico pela administração de ácido para-aminosalicílico....	55
Figura 2.10 – Súmula dos resultados dos estudos de SAR do ácido para-aminosalicílico.....	56
Figura 2.11 – Localização do 1,3-diaminoinositol na molécula de estreptomicina.....	57
Figura 2.12 – Mecanismo de ação da bedaquilina por ação indireta: (A) inibição do transporte de elétrões; e por ação direta: (B) inibição da rotação do anel (c9) e (C) ligação à subunidade ϵ com subsequente inibição da transmissão do sinal.....	58
Figura 2.13 – Súmula dos resultados dos estudos de SAR da bedaquilina.....	59
Figura 2.14 – Esquema de identificação dos aneis β -lactâmicos assinalados pelos círculos na representação da estrutura geral das várias classes dos antibióticos β -lactâmicos.....	60
Figura 2.15 – Representação das estruturas da D-alanina e cicloserina, com os elementos estruturais essenciais para a atividade da molécula assinalados pelos círculos.....	62
Figura 2.16 - Representação do mecanismo de ação da clofazimina.....	64
Figura 2.17 – Súmula dos resultados dos estudos de SAR da clofazimina.....	64
Figura 2.18 – Representação do mecanismo de ação da delamanida.....	65
Figura 2.19 – Súmula dos resultados dos estudos de SAR da delamanida.....	67
Figura 2.20 – Representação do mecanismo de ação da etionamida.....	68
Figura 2.21 – Representação esquemática da síntese do aduto ETH-NADH.....	68

Figura 2.22 – Súmula das interações relevantes para a ação das fluoroquinolonas.....	69
Figura 2.23 – Súmula dos resultados dos estudos de SAR da levofloxacina.....	71
Figura 2.24 – Esquema representativo do mecanismo de ação da linezolida.....	71
Figura 2.25 – Súmula dos resultados dos estudos de SAR da linezolida.....	72
Figura 3.1 – Relação entre o ano de início do tratamento e as taxas de incidência, em percentagem, para vários desfechos derivados do tratamento para TB resistente à rifampicina e MDR-TB.....	82
Figura 4.1 – Candidatos a fármacos antituberculosos atualmente desenvolvidos nos ensaios clínicos e respetiva classe química e alvo terapêutico.....	85
Figura 6.1 – Processo de identificação do SQ109 como novo candidato a fármaco antituberculoso.....	91
Figura 6.2 – Representação das interações a nível molecular do SQ109 (a verde) com o sítio ativo do MmpL3.....	93
Figura 6.3 – Representação esquemática do mecanismo de ação dos inibidores de DprE1.....	93
Figura 6.4 – Representação da estrutura química do BTZ-043, um inibidor covalente de DprE1.....	94
Figura 6.5 – Representação da estrutura do farmacóforo 4-tiazolidinona.....	95
Figura 6.6 – Representação esquemática do composto hit, com o farmacóforo da classe das pirazolopirimidinonas assinalado pelo círculo.....	96
Figura 6.7 – Representação do cluster esx-3.....	96
Figura 6.8 – Representação da estrutura química do composto Tam16, composto líder da classe dos benzofuranos, e do farmacóforo benzofurano assinalado pelo círculo.....	97

Figura 6.9 – A - Modelação da sobreposição do Tam13 com o sítio ativo do Pks13; B – Representação do Tam16 no sítio ativo e dos aminoácidos relevantes para a interação com a molécula.....	98
Figura 6.10 – Representação esquemática da síntese do cumestano a partir do correspondente derivado de benzofurano.....	98
Figura 6.11 – Representação da estrutura química do composto BDM41906 e do farmacóforo 1,2,4-oxadiazol assinalado pelo círculo.....	99
Figura 6.12 – Representação esquemática do mecanismo de ação dos inibidores de GuaB2, com referência a consequências da inibição de GuaB2.....	100
Figura 6.13 – Representação da estrutura química do farmacóforo difenil ureia e dos compostos DPU-1, DPU-2 e DPU-3.....	101

Índice de quadros

Quadro 2.1 - Fármacos usados na quimioterapia de 1ª linha para o tratamento da TB.....35

Quadro 2.2 – Comparação entre a divisão dos fármacos utilizados para o tratamento prolongado da TB resistente, proposta pela OMS em 2016 e em 2019.....46

Quadro 2.3 - Fármacos usados na quimioterapia de 2ª linha para o tratamento da TB.....49

Abreviaturas

a.C. – Antes de Cristo

ACP – Proteína de Transporte de Acila, do inglês: *Acyl-Carrier Protein*

ADN – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês: *Deoxyribonucleic Acid*

ARN – Ácido Ribonucleico, do inglês: *Ribonucleic Acid*

AspS - Aspartil-tARN Sintetase, do inglês: *Aspartyl tRNA-Synthetase*

ATP – Trifosfato de Adenosina, do inglês: *Adenosine Triphosphate*

BCG – Bacilo Calmette Guérin, do inglês: *Bacillus Calmette Guérin*

BHE – Barreira Hematoencefálica, do inglês: *Blood-Brain Barrier*

CD – Proteínas Reguladoras do Complemento, do inglês: *Complement Receptor*

CFP-10 – Proteína de Filtrado de Cultura de 10kDa, do inglês: *10-kDa Culture Filtrate Protein*

CMT – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

COVID-19 – Doença por Coronavírus, do inglês: *Coronavirus Disease*

CYP – Citocromo, do inglês: *Cytochrome*

DprE1 – Decaprenil Fosforibose Epimerase, do inglês: *Decaprenyl-Phosphoribose Epimerase*

ESAT-6 – Antígeno de Secreção Primária de 6kDa, do inglês: *6 kDa Early Secretory Antigenic Target*

ESX-1 – Sistema de Secreção de Proteínas Tipo 1, do inglês: *Secretion System Type 1*

FDA – *Food and Drug Administration*

HSP – Proteína de Choque Térmico, do inglês: *Heat Shock Protein*

HTS – Triagem de alto rendimento, do inglês: *High-throughput screening*

IFN- γ – Interferão gama, do inglês: *Interferon gama*

IGRA – do inglês: *Interferon Gamma Release Assay*

IL – Interleucina, do inglês: *Interleukin*

IMPDH – Inosina Monofosfato Desidrogenase, do inglês: *Inosine Monophosphate Dehydrogenase*

KatG – Catalase Peroxidase, do inglês: *Catalase-Peroxidase*

kDa – Quilodaltons, do inglês: *Kilodaltons*

LAM – Lipoarabinomanano, do inglês: *Lipoarabinomannan*

LM – Lipomanano, do inglês: *Lipomannan*

ManLAM – Lipoarabinomanano Manosilado, do inglês: *Mannose-capped Lipoarabinomannan*

MDR-TB – Tuberculose Multirresistente, do inglês: *Multi-Drug Resistant Tuberculosis*

MHC – Complexo de Histocompatibilidade Major, do inglês: *Major Histocompatibility Complex*

MIC - Concentração Inibitória Mínima, do inglês: *Minimum Inhibitory Concentration*

Mmp13 - Proteína de Membrana de Micobactéria 3, do inglês: *Mycobacterial Membrane Protein Large 3*

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

NAD – Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina, do inglês: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

OMS – Organização Mundial da Saúde, do inglês: *World Health Organization*

PAMP – Padrões Moleculares Associados a Patógenos, do inglês: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PDIM – Dimicocerosato de Ftiocerol, do inglês: *Phthiocerol Dimycocerosates*

PGL – Glicolípídeos fenólicos, do inglês: *Phenolic Glycolipid*

PIM – Fosfatidilinositol manosídeos, do inglês: *Phosphatidylinositol Mannosides*

Pks13 - Policetídeo Sintase 13, do inglês: *Polyketide Synthase 13*

PRR – Recetores de Reconhecimento de Padrões, do inglês: *Pattern Recognition Receptors*

SAR – Relação Estrutura-Atividade, do inglês: *Structure-Activity Relationship*

sHSPs – Pequenas Proteínas de Choque Térmico, do inglês: *Small Heat Shock Protein*

SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida, do inglês: *Acquired Immune Deficiency Syndrome*

SNC – Sistema Nervoso Central, do inglês: *Central Nervous System*

tARN – ARN transportador, do inglês: *Transfer RNA*

TB – Tuberculose

TCR – Recetor de Linfócitos T, do inglês: *T-cell Receptor*

TDM – Dimicolato de Trealose, do inglês: *Trehalose 6,6'-dimycolate*

TDR-TB – Tuberculose Totalmente Resistente, do inglês: *Totally Drug-Resistant Tuberculosis*

Th1 – *T helper* Tipo 1, do inglês: *T helper type 1*

TLR – Recetor semelhante a Toll, do inglês: *Toll-like Receptor*

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa, do inglês: *Tumour Necrosis Factor alfa*

tpX – Tiol Peroxidase, do inglês: *Thiol Peroxidase*

TST – Teste de Sensibilidade à Tuberculina, do inglês: *Tuberculin Skin Test*

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês: *Human Immunodeficiency Virus*

XDR-TB – Tuberculose Extensamente Resistente, do inglês: *Extensively Drug-Resistance Tuberculosis*

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Abstract	III
Índice de figuras	IV
Índice de quadros	VIII
Abreviaturas	IX
Índice.....	1
Capítulo I: Introdução	5
1. Tuberculose	5
1.1. História.....	5
1.2. Epidemiologia.....	9
1.3. Campanhas mundiais de combate à Tuberculose	11
1.4. Mycobacterium tuberculosis.....	12
1.5. Mecanismos de defesa contra infecção por Mtb.....	15
1.5.1. Resposta imunitária inata.....	15
1.5.2. Resposta imunitária adquirida	17
1.6. Mecanismos de patogenicidade do Mtb.....	19
1.6.1. Transmissão	20
1.6.2. Infecção primária.....	21
1.6.2.1 Tuberculose ativa e latente	22
1.6.3. Infecção secundária	23
1.6.4. Tuberculose disseminada.....	24
1.7. Mecanismos de fuga ao sistema imunitário e fatores de virulência.....	24
1.7.1. Sistema de secreção ESX-1	25
1.7.2. Fatores lipídicos da superfície celular	25
1.7.2.1 Ácidos micólicos	25

1.7.2.2	Sulfolípidos.....	26
1.7.2.3	PDIM	26
1.7.2.4	TDM	26
1.7.2.5	LAM e ManLAM	26
1.7.2.6	PGLs	27
1.7.2.7	PIMs.....	27
1.7.3.	Proteínas de choque térmico.....	27
1.7.4.	Glicoproteína 19kDa.....	28
1.7.5.	Enzima KatG e enzima TpX.....	28
1.7.6.	SecA-2	28
1.7.7.	Pili tipo IV e tipo curli	28
1.8.	Fatores de risco e importância da coinfeção Tuberculose/VIH	29
1.9.	Diagnóstico	30
1.10.	Prevenção	32
Capítulo II: Atual Quimioterapia e Resistências.....		34
2.	Quimioterapia da TB	34
2.1.	Quimioterapia de 1ª linha.....	34
2.1.1.	Isoniazida.....	37
2.1.2.	Rifampicina	39
2.1.3.	Pirazinamida	41
2.1.4.	Etambutol.....	43
2.2.	Quimioterapia de 2ª linha.....	45
2.2.1.	Ácido para-aminosalicílico.....	55
2.2.2.	Aminoglicosídeos	57
2.2.3.	Bedaquilina	58
2.2.4.	Carbapenemas.....	61
2.2.5.	Cicloserina/Terizidona.....	62

2.2.6.	Clofazimina	64
2.2.7.	Delamanida	66
2.2.8.	Etionamida/Protionamida	68
2.2.9.	Fluoroquinolonas	70
2.2.10.	Linezolida	72
2.3.	Quimioterapia na TB latente/ prevenção da reativação	74
2.4.	Quimioterapia em condições especiais	76
2.4.1.	Gravidez.....	76
2.4.2.	Amamentação	77
2.4.3.	Crianças	78
2.4.4.	Indivíduos VIH positivos.....	79
3.	MDR-TB e XDR-TB e dados epidemiológicos	81
4.	Desafios Atuais e o Papel do Farmacêutico na sua Resolução	84
Capítulo III: Estratégias no combate às resistências		87
5.	Estratégias para o desenho de compostos contra Mtb.....	87
5.1.	<i>Screening</i> baseado em estrutura.....	88
5.2.	<i>Screening</i> baseado no alvo	88
5.3.	<i>Screening</i> fenotípico	88
5.4.	Outras estratégias	89
6.	Descoberta de novos alvos terapêuticos para TB.....	91
6.1.	Derivados de Etilenodiamina e MmpL3	92
6.2.	Benzotiazinonas e DprE1	94
6.3.	4-tiazolidinonas e AspS	96
6.4.	Pirazolopirimidinonas e ESX-3	97
6.5.	Moléculas com anel benzofurano e Pks13.....	98
6.6.	1,2,4-Oxadiazóis e EthR	100
6.7.	Difenil-ureias e GuaB2	101

Conclusão.....	103
Bibliografia.....	105

Capítulo I: Introdução

1. Tuberculose

Em humanos, a tuberculose (TB) é uma infecção que pode ser provocada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ou por *Mycobacterium africanum*. No entanto, a incidência desta está restringida à África Ocidental, sendo responsável por 40 a 50% dos casos de TB nessa região. (1,2) Estas duas espécies fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), que compreende um grupo de bactérias do género *Mycobacterium* capazes de causar TB em seres humanos e em outros mamíferos. No conjunto de espécies que causam TB noutros mamíferos incluem-se, por exemplo, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. orygis*, *M. mungii*, *M. caprae* e *M. bovis*. (1,3)

A porta de entrada principal do Mtb é a inalação por via respiratória e, atingindo o alvo principal que são os macrófagos localizados nos alvéolos pulmonares, pode desenvolver a doença, isso é, a forma ativa de TB, que se caracteriza por sintomas como tosse que persiste mais de 3 semanas, perda de peso, febre e sudorese noturna. (4,5) A TB afeta principalmente os pulmões (TB pulmonar), podendo contudo afetar praticamente todos os órgãos do organismo humano (TB extrapulmonar). (6)

Os indivíduos saudáveis que são infetados pelo Mtb geralmente não desenvolvem sintomatologia porque o seu sistema imunológico impede que o Mtb provoque a doença. No entanto, o agente patogénico permanece inativo no organismo e pode ser reativado se o indivíduo se tornar imunocomprometido. (7)

1.1. História

Vários autores formularam hipóteses de que o género *Mycobacterium* apareceu há mais de 150 milhões de anos, de que há 3 milhões de anos o antecedente de Mtb infetou os homínidos da zona Este da África e de que há 20 a 15 mil anos surgiu o antepassado das estirpes de Mtb presentes na atualidade. (6,8)

Desde 8000 antes de Cristo (a.C.), a época a que reportam as primeiras evidências das afeções pela TB, observadas em ossos (9), que a TB figura entre as doenças mais antigas que assolam a humanidade. Algumas múmias egípcias também apresentaram deformidades ósseas típicas de uma infecção por Mtb, ocorridas em 2400 a.C. (8,9)

Em 460 a.C., Hipócrates reconheceu a TB (na altura conhecida como tísica) como uma doença hereditária (porque ocorria em toda a família) e fatal para muitos jovens. (9,10) Na mesma altura, Isócrates propôs a teoria de que a TB poderia ser uma doença infecciosa e Aristóteles sugeriu que TB seria de natureza contagiosa. (8)

No século II, Clarissimus Galen, o físico pessoal do imperador romano Marcus Aurelius, descreveu a TB como uma doença infecciosa e transmissível, associando-lhe sintomas como febre, sudorese, tosse e expectorações com sangue e indicando que a terapêutica deveria incluir a ingestão de leite, fígados de lobo e urina de elefantes, respirar ar puro e realizar viagens marítimas. (8,10)

Em 1679 o cientista holandês Francis Sylvius de la Boe forneceu, no documento com a designação *Opera Medica*, a primeira descrição dos tubérculos nos pulmões (atualmente conhecidos como “granulomas”) como manifestação patológica característica da doença, bem como da sua progressão para abscessos, cavidades e empiema, nos pulmões e em outros locais. La Boe associou TB e escrófula (doença dos gânglios linfáticos do pescoço, (8,10) uma patologia que atualmente se designa por “tuberculose linfonodal” ou “tuberculose ganglionar”. (9) Em 1689 o físico inglês Richard Morton publicou o seu trabalho “*Phthisiologia*”, onde descrevia a patologia das várias formas de tísica, tubérculos e escrófula. Morton e La Boe consideravam que a tísica era uma doença hereditária e Morton acreditava que se podia transmitir através de contactos próximos. (10)

Em 1699 foi emitido um decreto pela República de Lucca em que consta a primeira referência oficial à natureza infecciosa de TB. Mais tarde, em 1735, a Junta de Saúde da República ordenou a notificação e isolamento dos doentes em locais específicos para o seu tratamento, proibindo a admissão em hospitais públicos. (8)

Em 1779, o cirurgião britânico Percivall Pott descreveu a doença de Pott, atualmente conhecida como “espondilite tuberculosa”, mostrando que TB pode afetar outros órgãos além de pulmões. (9)

No século XIX persistiu a discussão quanto à origem etiopatológica da TB, bem como a sua associação com escrófula e com os tubérculos. Em 1810, o físico francês Gaspard-Laurent Bayle of Vernet descreveu no seu trabalho, *Recherches sur la phthisie pulmonaire*, que os tubérculos afetam os pulmões e também o resto do corpo. (8,10) Em 1816 Laennec inventou o estetoscópio, que usava para ouvir e diagnosticar os doentes com TB. (10) As teorias defendidas por Vernet foram suportadas pelo médico francês Theophile Laennec, levando a que, em 1819,

se considerasse que os tubérculos pulmonares e extrapulmonares fazem parte da primeira fase de TB. (8,10) No entanto, a informação relativa à etiologia da TB surgiria apenas em 1882, graças ao trabalho de Robert Koch.

Durante a revolução industrial, a partir da segunda metade do século XVIII, as condições de vida pioraram significativamente devido aos ambientes de trabalho extremamente carentes a habitações mal ventiladas e sobrelotadas, com saneamento primitivo ou inexistente, e desnutrição, que levaram a um aumento significativo da TB. Nesta altura a TB era responsável por 1/4 de todas as mortes na Europa e América do Norte e, em 1838 e 1839 foi responsável por 1/3 das mortes entre comerciantes e trabalhadores ingleses. (8) Na altura, a TB era conhecida como a “peste branca”, devido à extrema palidez e anemia que os doentes com TB apresentavam. (8,10)

No século XIX foram notáveis os avanços no diagnóstico de TB, bem como no seu tratamento. No dia 24 de março de 1882 (atualmente conhecido como o dia nacional da TB), o físico alemão Robert Koch, utilizando um método colorimétrico por ele desenvolvido, baseado em azul de metileno, conseguiu isolar e visualizar a bactéria em partículas contaminadas com Mtb, expelidas através de tosse ou espirro dos doentes. (1,8,9) O trabalho de Koch sobre a TB consistiu em três passos: identificação de uma bactéria nos tecidos infetados, cultura do agente patogénico suspeito no soro animal e subsequente inoculação em animais de laboratório. (8,11) Foi este trabalho que permitiu esclarecer as dúvidas relativas à etiologia da doença, clarificando que todas as formas da doença são resultado da infeção por um único agente patogénico. (10) Robert Koch recebeu o Prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1905 graças às suas descobertas na luta contra a TB e o Mtb foi batizado em seu nome, passando a ser também conhecido como “bacilo de Koch”. (9,12,13) Robert Koch tentou criar uma cura para a TB, designada por “tuberculina”, que consistia num extrato de glicerina da bactéria, contudo não obteve sucesso. A tuberculina foi futuramente adaptada como método de teste de despiste da presença de TB latente. (14)

No final do século XIX e início do século XX foi registado um declínio da mortalidade por TB, muito antes da descoberta dos primeiros antibióticos para combater Mtb. Graças às descobertas de Koch sobre a infeciosidade do Mtb, a instalação de sanatórios, que tinham como objetivo isolar os doentes do resto da comunidade, começou a ter grande influência na melhoria dos cuidados que os doentes com TB recebiam e consequente diminuição da taxa de mortalidade. (9,13,15) Em 1854 Hermann Brehmer instalou o primeiro sanatório, nas

montanhas silesianas, uma zona isolada e a grande altitude, em Görbersdorf, Silésia (atual Polónia). (13,15) O benefício da construção dos sanatórios a elevadas altitudes foi explicado pelo físico Henri-Clermont Lombard, que em 1856 defendeu a exposição ao ar rarefeito (de baixa pressão e pouca variedade e concentração de gases), derivada da altitude, bem como à pressão reduzida do oxigénio no sangue, como propriedades curativas. (15)

Nos sanatórios o tratamento dos doentes passava pela alimentação frequente e abundante, aeroterapia (acesso ao ar puro), repouso, exercício físico moderado e helioterapia (exposição à luz solar). Helioterapia não era prescrita para doentes com febre, mas sim para doentes crónicos, uma vez que ativava a produção de vitamina D que por sua vez ativava os macrófagos. Para além disso, a exposição à luz solar contribuía para a libertação de óxido nítrico, com propriedades antimicrobianas, de fontes enzimáticas e não enzimáticas da imunidade inata do indivíduo. (15)

O avanço na história da TB também resultou da descoberta de raios-X pelo físico alemão Wilhelm Konrad von Roentgen, em 1895, o que facilitou o diagnóstico da TB nos doentes e possibilitou um melhor acompanhamento terapêutico dos mesmos. (9,15)

A intervenção cirúrgica foi, durante muitos anos, a única opção terapêutica para os doentes antes do aparecimento dos primeiros antibióticos eficazes no combate ao Mtb. Em 1943, foi desenvolvido por Selman Waksman o primeiro antibiótico eficaz contra Mtb, a estreptomicina, que passou a estar disponível quatro anos mais tarde, pelo menos na Europa e na América do Norte. (9,11) Por volta da mesma altura o cientista Jörgen Lehmann descobriu a capacidade do ácido para-aminosalicílico de destruir a bactéria, (13) e em 1952 foram documentadas as propriedades bactericidas da isoniazida, que passou a ser prescrita na primeira linha terapêutica contra TB. Nessa altura foram descobertos outros antibióticos como pirazinamida, cicloserina, etionamida, etambutol, canamicina, capreomicina, rifampicina, entre outros (Figura 1.1). (9,13,14)

O aparecimento dos fármacos mudou drasticamente o prognóstico de TB, levando ao encerramento da maioria dos sanatórios, uma vez que com o tratamento recebido os doentes rapidamente reverteriam os sintomas e, através de estudos, comprovou-se não haver diferença nos resultados clínicos ou infeção dos próximos, entre tratamentos farmacológicos recebidos no sanatório ou a nível domiciliar. (13,15)

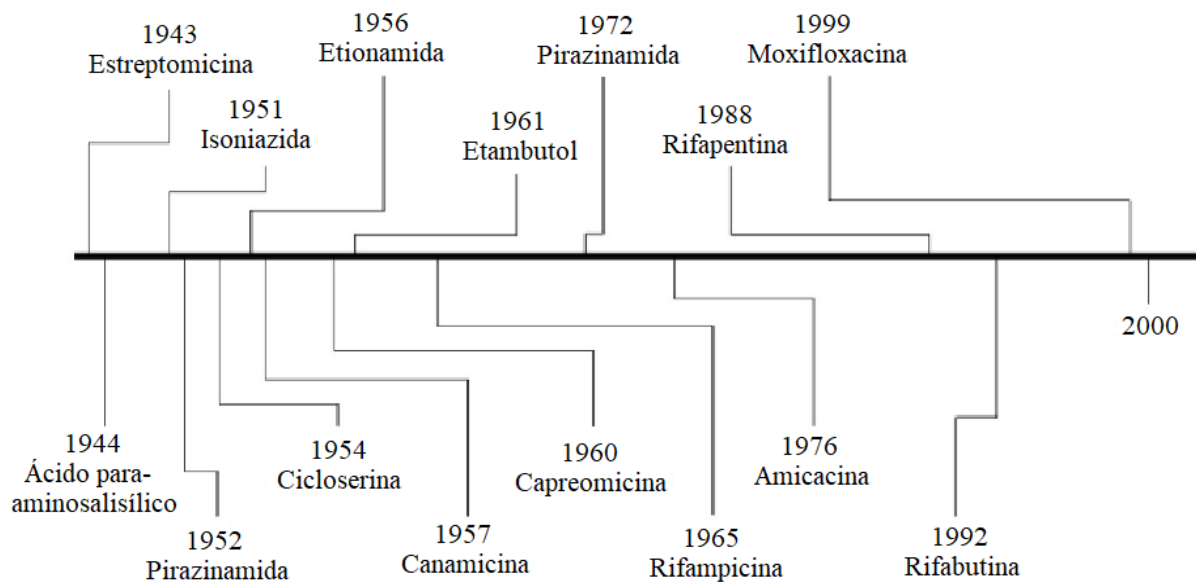


Figura 1.1 - Cronologia das descobertas dos compostos usados no tratamento da tuberculose (TB), desde a Segunda Guerra Mundial até 2000 (adaptado de (14))

Um aspeto comum para todos os fármacos descobertos, foi o gradual desenvolvimento de resistências por Mtb ao longo do tempo, sendo este um grave problema até os dias de hoje. (9)

1.2. Epidemiologia

De acordo com o Relatório Sobre a Tuberculose da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2019 a TB foi a 13ª causa de morte em todo o mundo e, após a doença por coronavírus (COVID-19), a segunda causa de morte por um único agente infeccioso, em 2020. (16)

Devido às circunstâncias que acompanhavam a pandemia COVID-19, em 2020 houve um aumento na taxa de mortalidade, mas também uma redução do número de casos de TB diagnosticados e notificados. De entre as circunstâncias que assumiram um papel significativo na redução da taxa de notificação de casos de TB podemos apontar a menor capacidade do Sistema de Saúde para fornecer serviços e a menor capacidade dos doentes para procurarem atendimento por profissionais de saúde, devido a confinamentos obrigatórios e a restrições associadas, bem como a preocupações e medos sobre os riscos de frequentar unidades de saúde durante uma pandemia e incertezas no diagnóstico devido às semelhanças dos sintomas relacionados à TB e COVID-19. (16)

Estima-se que 9,9 milhões de pessoas desenvolveram TB em 2020, tendo a doença causado aproximadamente 1,3 milhões de mortes entre pessoas com resultado negativo à infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) e cerca de 214000 entre pessoas VIH

positivas. (4,16) As taxas de incidência da TB no mundo, em 2020, podem ser vistas na representação gráfica na Figura 1.2.

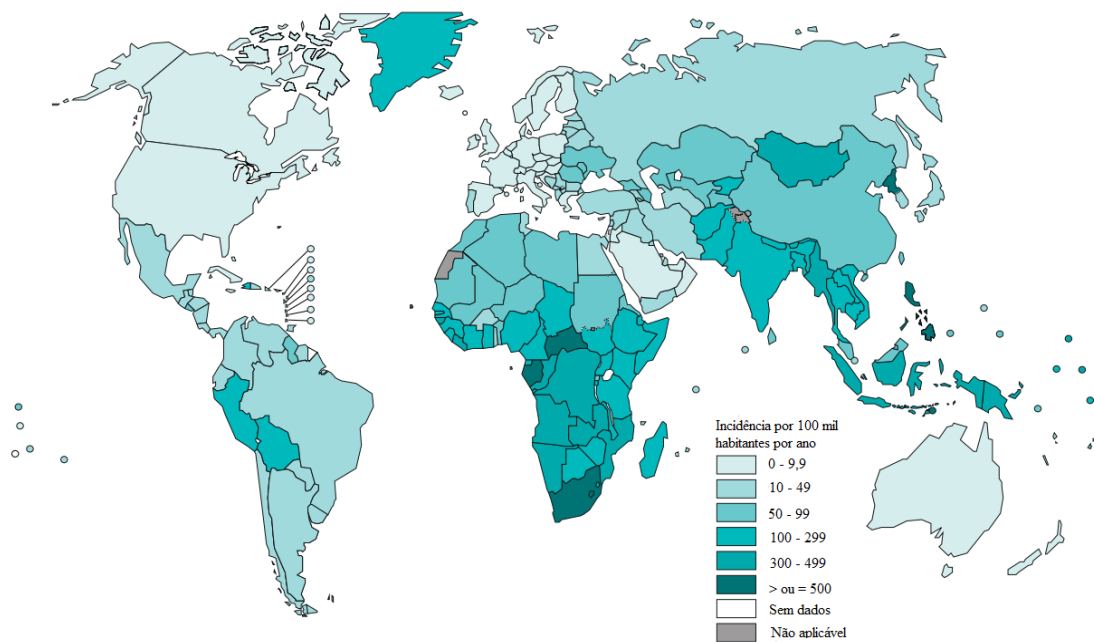


Figura 1.2 - Taxas de incidência da TB no mundo por 100000 habitantes, em 2020 (adaptado de (16))

De acordo com o Programa Nacional da Direção-Geral da Saúde Portugal registou em 2020 “uma diminuição efetiva dos casos de TB” e o Relatório Global da Tuberculose indica que Portugal desceu dos “cerca de 1800” casos em 2019 para 1445 casos em 2020. (17)

Sabe-se que 13 dos 15 países com maior número de casos de TB se situam na África. (9) De acordo com a OMS, em 2020 8% dos casos de TB coexistiam com a infeção por VIH, com maior proporção de coinfeção no continente africano, excedendo 50% em certas partes da África Meridional. (16) Globalmente, em 2020, cerca de 84% das mortes por TB entre pessoas VIH negativas e 85% do total combinado de mortes por TB em pessoas VIH negativas e VIH positivas ocorreram nas regiões da OMS da África e do Sudeste Asiático. A Índia foi responsável por 38% das mortes globais por TB entre pessoas VIH negativas e por 34% do número total combinado de mortes por TB em pessoas VIH negativas e VIH positivas. (16)

Apesar do continente africano apresentar um maior número de casos de infeção, mais de metade de novos casos derivam de 5 países do continente asiático: Bangladesh, Índia, Indonésia, Paquistão e Filipinas. Esse facto foi comprovado pelos resultados de um estudo dos anos de vida ajustados por incapacidade, revelando a perda de 42% dos anos de vida ativa devido à doença. (9)

Estima-se que 40% da população indiana seja portador de TB, tornando a Índia o país com maior número de casos ativos da doença. Apesar da mortalidade e da incidência de TB na Índia terem diminuído nos últimos anos, foi registado um aumento de incidência de estirpes de Mtb resistentes aos fármacos, nomeadamente 2,2% e 15% para os novos casos e para os doentes que já receberam tratamento anterior, respetivamente. (9)

Em 10 anos, 3 a 4% da população mundial diagnosticada com TB pela primeira vez revelou perdas de eficácia dos fármacos convencionais, crescendo a proporção para 18 a 21% em pacientes que já haviam sido expostas à medicação (mais de 50% desses casos surgiram em países da antiga União Soviética). (16)

1.3. Campanhas mundiais de combate à Tuberculose

Em 1993 a OMS reconheceu a TB como uma epidemia que afeta cerca de um terço da população mundial. (16) Em articulação com o Programa Nacional de Controlo da Tuberculose, a OMS desenvolveu iniciativas em países mais pobres, por exemplo na Índia, que envolveram o compromisso político e administrativo de monitorização sistemática, tratamento supervisionado e diagnóstico de qualidade. O programa salvou 37 milhões de vidas entre 1990 e 2013, reduzindo a taxa de mortalidade por TB em 45% e a de prevalência em 41%. (9) Um dos principais problemas dos países pobres reside na adesão à terapêutica, pela dificuldade de convencer os residentes a tomarem os medicamentos durante, pelo menos, 12 meses, mesmo na ausência de sintomas. Observando esta falha na educação dos pacientes, muitos países implementaram o programa *Directly Observed Treatment Short-Course*, lançada pela OMS em 1995, onde os doentes ficam sujeitos a monitorização apertada durante apenas 6 meses, com o objetivo de encontrar o regime terapêutico eficaz para cada doente, bem como para diminuir a prevalência de estirpes resistentes de Mtb. (9,11,14) Entre 1995 e 2008 foram curados 36 milhões de casos de TB com a ajuda deste programa, tendo sido evitadas 6 milhões de mortes pela doença. (9)

Em 2014, a OMS lançou o Plano Nacional Pelo Fim da Tuberculose (do inglês, *End TB Strategy*), estabelecendo, numa reunião decorrida em setembro de 2018, objetivos, a alcançar até 2030: reduzir o número de mortes anuais por TB em 90%; diminuir a incidência de novos casos de TB em 80% (comparativamente com os dados registados em 2015). (16)

Em 2018, a OMS, ainda lançou outra iniciativa, *Find.Treat.All*, em colaboração com a *Stop TB*, que tem como objetivo a deteção e tratamento de 40 milhões de pessoas com TB no período de 2018 a 2022. (6)

Existem outras campanhas, como Fundo das Nações Unidas para a Infância (do inglês, *United Nations Children's Emergency Fund*), que visa a melhoria do crescimento e desenvolvimento infantil, a diminuição da mortalidade infantil, o saneamento e higiene das águas, bem como um melhor acesso a vacinas, tornando a vacinação com o bacilo Calmette Guérin (BCG) numa iniciativa global. (6,9,11) A OMS recomenda o fornecimento da vacina BCG como parte dos programas nacionais de imunização infantil, de acordo com os dados epidemiológicos de TB em cada país. Em 2017, 158 países adotaram a vacinação com BCG, dos quais 120 relataram uma cobertura de pelo menos 90%. (6)

Em Portugal, a vacina BCG fazia parte do Programa Nacional de Vacinação até 1 de janeiro de 2017. Uma vez que, em 2015, o país conseguiu reduzir a taxa de incidência da doença para 20 pessoas por 100 mil habitantes, e por iniciativa da Direção Geral da Saúde, hoje em dia a vacina BCG só é administrada, à nascença, às crianças que pertencem a grupos de risco, por exemplo as crianças provenientes de países com muitos casos de TB e as que vivem ou convivem com portadores de infeção VIH/síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). (18)

Têm vindo a ser criados vários programas governamentais e organizações não-governamentais, por exemplo a organização não-governamental “Americares”, que fornece ajuda médica e humanitária em caso de emergências ambientais. Contudo muito deve ainda ser feito para melhorar o acesso aos cuidados de saúde e fornecer apoio a pessoas desprivilegiadas e a populações vulneráveis. (9)

1.4. Mycobacterium tuberculosis

A espécie Mtb pertence ao domínio *Bacteria*, filo *Actinobacteria*, classe *Actinobacteria*, subclasse *Actinobacteridae*, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e género *Mycobacterium*. (1,19)

As bactérias do género *Mycobacterium* podem ser divididas em 4 grupos principais, com base em diferenças epidemiológicas, associação com a doença e a capacidade de crescer *in vitro*: os que pertencem ao CMT (principal causa da TB), *Mycobacterium leprae* (o agente causador da lepra ou hanseníase), que é a única micobactéria que não cresce *in vitro*, *Mycobacterium ulcerans* (causadora de úlceras pela produção da toxina micolactona) e micobactérias não tuberculosas. (1,3,20) Do último grupo mencionado, podemos dar como exemplos do *M. avium* complex, *M. kansasii* e *M. abscessus* que, tal como o Mtb, também podem infetar o ser humano, causando infeções pulmonares mas não TB. (20,21)

O Mtb faz parte das micobactérias, mais especificamente do CMT, que são bactérias Gram-positivas, de forma bacilar, aeróbias, imóveis, incapazes de formar esporos, com 1 a 4 µm de comprimento e 0,3 a 0,6 µm de largura. (3,6,20,22)

Apesar de ser classificada como bactéria Gram-positiva, devido à espessa camada de peptidoglicano, o Mtb apresenta uma segunda membrana, designada por membrana externa, tal como as bactérias Gram-negativas, mas de natureza cerosa, com alto teor de lípidos e relativamente impermeável. Essa membrana externa é composta internamente por ácidos micólicos e externamente por lípidos livres. (20,23,24)

A parede celular do Mtb apresenta, no seu core, peptidoglicanos (ácidos N-glicolimurâmicos) ligados covalentemente aos arabinogalactanos (um polissacárido composto por D-arabinose e D-galactose), que por sua vez se apresentam ligados covalentemente aos ácidos micólicos (ácidos gordos de cadeia longa de alto peso molecular, com 60 a 90 carbonos). (20,23)

Para além disso, a parede celular contém outros glicolípidos no espaço periplasmático, nomeadamente o lipomanano (LM), o lipoarabinomanano (LAM) e o lipoarabinomanano manosilado (ManLAM) e os glicolípidos na membrana externa que não estão covalentemente ligados (ou lípidos livres), tais como sulfolípidos, dimicocerosato de ftiocerol (PDIM), dimicolato de trealose (TDM), glicolípídeos fenólicos (PGL) e fosfatidilinositol manosídeos (PIM). Todos os glicolípidos mencionados desempenham um papel importante na interação com os recetores das células do hospedeiro e na modulação da resposta imunitária. (1,19,22) Toda a estrutura da parede celular se apresenta detalhadamente descrita na Figura 1.3.

O primeiro genoma de Mtb que foi sequenciado, do Mtb H37Rv, revelou que o genoma apresenta 44 milhão de pares de bases, codificando 4018 genes, sendo que 9% dos genes codificam proteínas dedicadas ao metabolismo lipídico, à construção duma parede celular complexa e rica em lípidos, bem como à síntese de proteínas necessárias para exploração de lípidos do hospedeiro que servem como fonte de carbono. Exemplos dessas proteínas são os domínios N-terminais, cujos genes são muito conservados ao longo das gerações, de prolina-glutamina e prolina-prolina-glutamina, que também participam no metabolismo lipídico, na construção da parede celular e na modulação do sistema imunitário. (1)

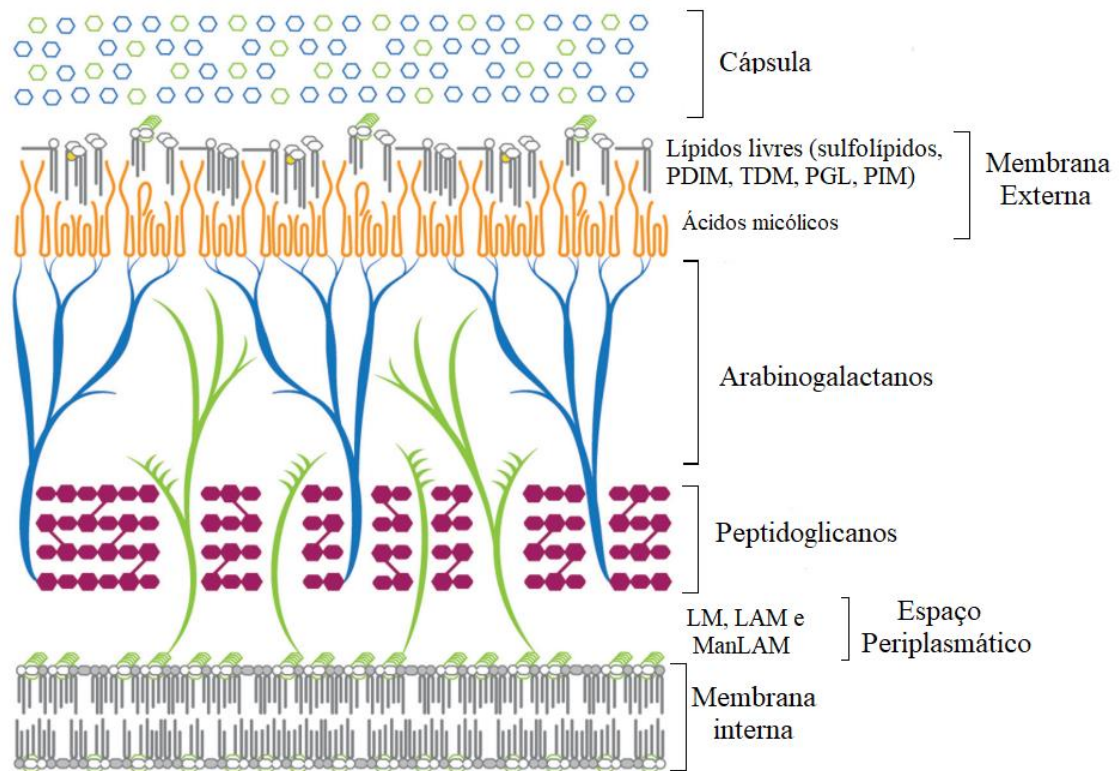


Figura 1.3 - Estrutura da parede celular de Mtb. LM = Lipomanano, LAM = Lipoarabinomanano, ManLAM = Lipoarabinomanano Manosilado, PDIM = Dimicocerosato de Ftiocerol, TDM = Dimicolato de Trealose, PGL = Glicolípidos Fenólicos, PIM = Fosfatidilinositol Manosídeos (adaptado de (1,19,22))

A natureza lipídica da parede celular do Mtb atribui várias vantagens à bactéria para garantir a sua sobrevivência no organismo do hospedeiro, bem como dentro das células do sistema imunitário: capacidade de formar biofilmes, resistência a ambiente ácido, hidrofobicidade extrema, impermeabilidade a vários fármacos, resistência à secagem e propriedades imunoestimuladoras distintas. (6,19,22)

Apesar da vantagem da impermeabilidade que a complexidade da parede celular do Mtb fornece, acaba por ser alvo terapêutico de vários medicamentos de primeira linha no tratamento da TB, tais como a isoniazida, o etambutol e etionamida, uma vez que o seu mecanismo de ação passa pela inibição da síntese dos componentes da parede celular. (1)

Embora classificadas como Gram-positivas, as micobactérias não são coradas pela coloração de Gram, mas pelos métodos de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun, que utilizam a carbolfucsina ou fucsina fenicada como corante e o azul de metileno como corante de contraste. (19) São microrganismos que retêm a cor vermelha da carbolfucsina mesmo após o descoloramento com solução álcool-ácido, devido à natureza lipídica da parede celular

(principalmente devido à presença do ácido micólico), por isso são conhecidos como bactérias ácido-álcool resistentes. (3,19,20)

O Mtb apresenta uma taxa de crescimento muito lenta, demorando 12 a 24 horas para completar uma divisão, sendo o tempo necessário para cultivar uma cultura cerca de 21 dias (9,22) Algumas razões metabólicas apresentadas são a presença dum único operão para ácido ribonucleico ribossômico, taxa de replicação de ácido desoxirribonucleico (ADN) lenta, necessidade de absorção de nutrientes do hospedeiro através duma parede celular extremamente impermeável com requisitos para a sua construção muito exigentes. (1,22)

1.5. Mecanismos de defesa contra infecção por Mtb

O Mtb necessita ultrapassar todos os mecanismos de defesa do hospedeiro para causar a doença, sendo as membranas mucosas e o muco das vias respiratórias superiores, as primeiras barreiras naturais que contactam com o agente patogénico. Na presença duma infecção, o organismo do hospedeiro desencadeia uma resposta imunológica inata, que posteriormente estimula o desenvolvimento da resposta imune adaptativa ou adquirida. A resposta inata é a primeira linha de defesa contra os agentes patogénicos. É mediada essencialmente por células fagocitárias, não é específica e não tem memória imunológica. Já a resposta imune adaptativa apresenta elevada especificidade antigénica e memória imunológica, devido à diferenciação das células B e T (Figura 1.4). (25)

1.5.1. Resposta imunitária inata

Os macrófagos alveolares são as primeiras células que respondem ao estímulo da invasão dos alvéolos pulmonares pelo Mtb quando este é inalado pelo hospedeiro. Os macrófagos são células do sistema imunitário que participam na resposta imune inata e têm como principal objetivo fagocitar qualquer substância considerada “*non-self*”. (26)

Alguns recetores de reconhecimento de padrões (PRRs), tais como os recetores semelhantes a Toll (TLRs), são expressos nas células que participam na resposta imunitária inata, como os macrófagos e células dendríticas. Esses PRRs, principalmente os TLR2 e TLR4, são responsáveis pela ativação da resposta inata contra Mtb, que induzem a uma resposta inflamatória e antimicrobiana, benéfica para o hospedeiro. (26,27) Esses recetores interagem com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são algumas moléculas que compõem a membrana lipídica da bactéria, nesse caso Mtb, tais como lipoproteínas 19 quilodatos (kDa) e 27kDa, glicoproteína 38kDa, LAM e Man-LAM. (26) Essa interação conduz à cascata de sinalização que por sua vez leva à produção de citocinas pró-inflamatórias

pelos macrófagos, como a interleucina (IL)-12, que ativa a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ), IL-2 e quimiocinas. (22,26,28)

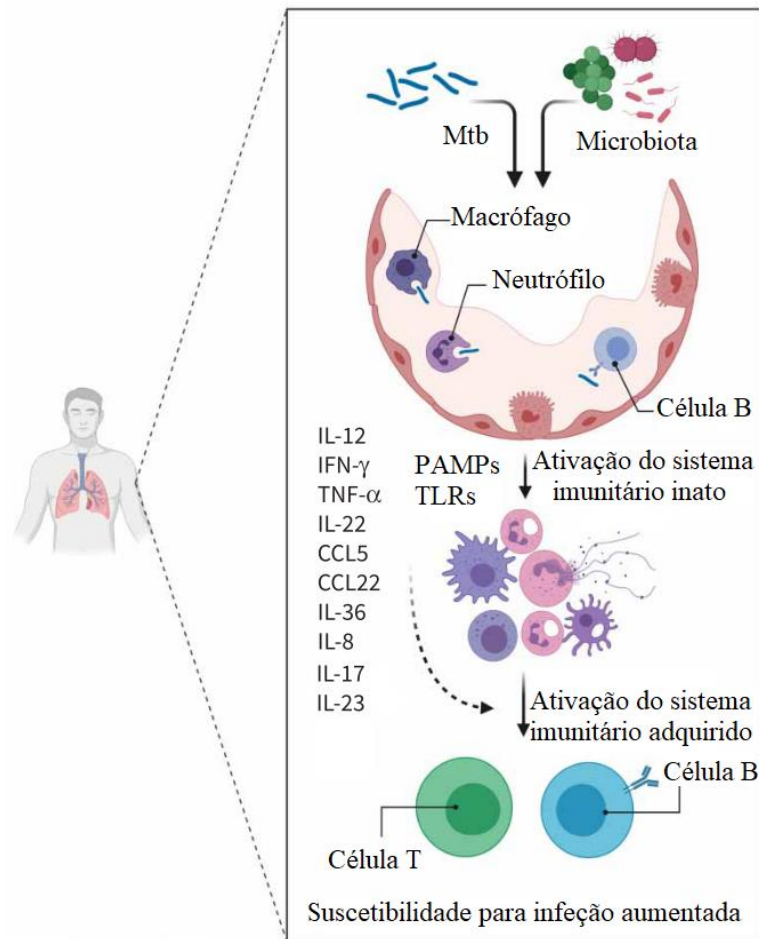


Figura 1.4 - Interação entre Mtb e a resposta inflamatória do hospedeiro. Mtb = *Mycobacterium tuberculosis*, PAMPs = Padrões Moleculares Associados a Patógenos, TLR = Recetor Semelhante a Toll, IL = Interleucina, IFN- γ = Interferon Gama, TNF- α = Fator de Necrose Tumoral Alfa (Adaptado de (28))

Para além dos recetores TLR, os macrófagos interagem com o Mtb e reconhecem-no através de proteínas reguladoras do complemento (como o CD35), recetores de manose, proteína surfactante A e recetor CD14. O recetor CD14 é responsável pelo reconhecimento de lipopolissacarídeo na parede celular do Mtb. (29) As proteínas reguladoras do complemento e os recetores de manose participam na opsonização, ou marcação do agente patogénico para posterior eliminação pelas células fagocitárias. Já a proteína surfactante A atua como uma opsonina, promovendo a ligação dos macrófagos ao Mtb e aumentando a taxa de eliminação do agente patogénico. (26,30)

Após a fagocitose das partículas de Mtb os macrófagos processam-nas e apresentam à sua superfície como antígenos do agente patogénico através do complexo de

histocompatibilidade major (MHC) classe II. (26) Os macrófagos migram até aos gânglios linfáticos, onde interagem com os recetores das células T e B, que por sua vez reconhecem o complexo “MHC tipo II + antígeno” presente à superfície dos macrófagos. (27)

O processo de fagocitose e processamento do antígeno, bem como a apresentação do mesmo através da via MHC-I, às células T, pode também ser executado pelas células dendríticas, pois também fazem parte da resposta imune inata. (26,27)

Nessa altura os macrófagos libertam a IL-12, que estimula a proliferação das células T bem como a sua diferenciação em células T *helper* tipo 1 (Th1) ou células CD4+ do tipo 1, dando início à resposta adquirida. (31)

1.5.2. Resposta imunitária adquirida

As células Th1 produzem a IL-2, responsável pela estimulação de proliferação de células T, ou seja, o aumento do número de células T efetoras, quer as CD4+ quer as CD8+. O IFN- γ é uma outra citocina pró-inflamatória produzida pelas células Th1 que ativa os macrófagos. (32) Para além disso, as células Th1 produzem o TNF- α , uma citocina pró-inflamatória responsável pela ativação duma resposta inflamatória, induzindo febre a nível do hipotálamo e a expressão de adesinas pelo endotélio, o que aumenta a diapedese de neutrófilos e macrófagos até ao local de infeção. (33)

Estudos demonstraram que os componentes da parede celular das micobactérias, como os peptidoglicanos e ácidos micólicos, promovem a transcrição do gene do IFN- γ , que por sua vez leva à produção de quimiocinas CCL5 e CCL22, que apresentam um papel importante na quimiotaxia dos leucócitos. (28)

As células Th1 ativam então os macrófagos através da produção de IFN- γ e da interação entre o recetor de linfócitos T (TCR) da célula Th1 e o MHC-II do macrófago, com o auxílio da co-estimulação pela interação do recetor CD40 do macrófago com o CD40L da célula Th1. (26,30) Uma vez ativado, o macrófago atua através de vários mecanismos para auxiliar a eliminação do Mtb: fagocitose, produção de espécies reativas de oxigénio e azoto, produção de enzimas lisossómicas e através do pH baixo do fagolisossoma. (26)

Um macrófago ativado também produz citocinas quimioatratadoras, que convocam outras células do sistema imunitário, como os linfócitos T, linfócitos B, neutrófilos e monócitos, para o local de infeção. (26) Adicionalmente, o macrófago ativado produz TNF- α que induzirá a

apoptose dos macrófagos infectados, aumentando a taxa de apresentação de antígenos (Mtb processado) às células T e B existentes nos gânglios linfáticos. (34)

A IL-12, também produzida pelos macrófagos, é responsável pela proliferação dos linfócitos T e pela diferenciação dos mesmos em Th1, ou seja, subsiste um ciclo de estimulação mútua entre o Th1 e o macrófago ativado que se baseia na produção de IFN- γ , ativador de macrófagos pelas Th1, e uma vez ativado, o macrófago produz IL-12 que é um ativador de Th1. (22) Uma representação pictorial da interação entre os linfócitos T e os macrófagos encontra-se na Figura 1.5.

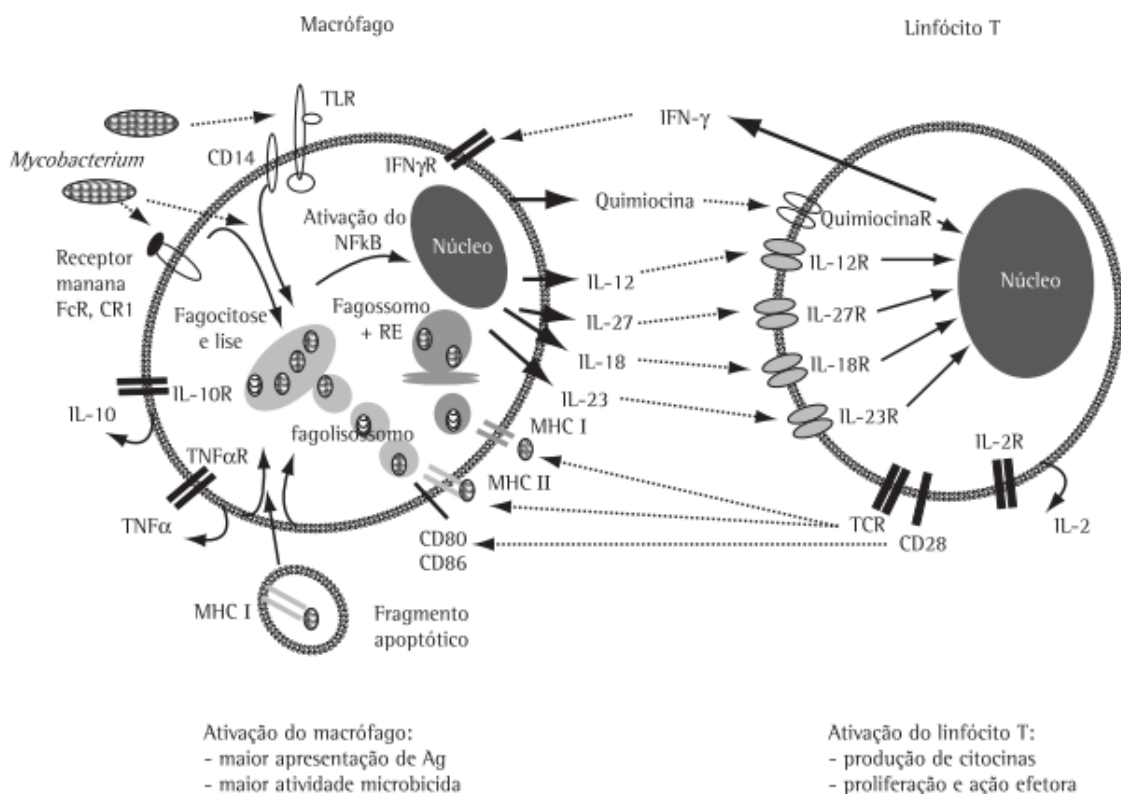


Figura 1.5 - Mecanismos envolvidos na ativação de macrófagos e linfócitos T por micobactérias. Ag = Antígeno, NFκB = Fator Nuclear Kappa B, TLR = Recetor Semelhante a Toll, TCR = Recetor de Linfócitos T, CD = Proteínas Reguladoras do Complemento, FcR = Recetor Para a Porção Fc de Anticorpos, CR – Recetor do Complemento, IL = Interleucina, TNFα = Fator de Necrose Tumoral alfa, TNFαR = Recetor do Fator de Necrose Tumoral alfa, MHC = Complexo de Histocompatibilidade, RE = Retículo Endoplasmático, IFN- γ = Interferão Gama (Adaptado de (35))

Ao mesmo tempo, as células dendríticas, que também apresentam capacidade fagocitária, estimulam as células CD8+ apresentando o agente patogénico via MHC-I. Essa interação resulta de sinais de co-estimulação proveniente da interação de recetores CD80 e CD86 na superfície dos macrófagos e células dendríticas com o recetor CD28 das células T *naive*. A maioria das células nucleadas apresentarão MHC-I à sua superfície depois do contacto

com o agente patogénico e, assim, qualquer célula que apresente MHC-I à sua superfície será eliminada pelas células T CD8+. (27,30,35)

Aquando do confronto entre o Mtb e o sistema imunitário do hospedeiro, desenvolve-se uma reação de hipersensibilidade tipo IV, que é caracterizada pela resposta das células Th1 persistente com ativação de macrófagos e lesão tecidular. (36)

Essa lesão tecidular, no contexto de TB, designa-se por granuloma inflamatório com necrose caseosa e tem como objetivo principal travar a propagação do Mtb. Esses granulomas são constituídos por Mtb livre, macrófagos infetados, macrófagos ativados, células multinucleadas (ou células de *Langerhans*), neutrófilos, células *natural killer*, células dendríticas, linfócitos T e B e fibroblastos. (30,37)

No centro infeccioso do granuloma o pH é baixo, estando presentes óxido nítrico, monóxido de carbono e elevadas concentrações de TNF- α , produzidos pelos macrófagos ativados, a baixas concentrações de oxigénio (estado de hipoxia), derivado do isolamento pelas várias camadas concêntricas de células do sistema imunitário. Este ambiente químico conduz à morte de células e tecidos nessa região, dando origem à necrose caseosa. Todas essas características do meio da zona necrótica são desfavoráveis ao Mtb, levando à expressão de genes envolvidos na indução do estado de latência do Mtb, diminuindo o seu metabolismo, mas são propícias para comunicação através de citocinas entre macrófagos e outras células do sistema imunitário. (26,30)

1.6. Mecanismos de patogenicidade do Mtb

Uma vez inalado, o Mtb inicia o seu ciclo patogénico nas vias aéreas inferiores, nomeadamente nos brônquios, infetando os macrófagos alveolares com o intuito de se replicar no espaço citoplasmático, para depois invadir o espaço pulmonar e extrapulmonar do hospedeiro. O sucesso na invasão das células do sistema imunitário bem como na indução da doença no hospedeiro depende maioritariamente da capacidade do sistema imunitário de travar a infeção. A Figura 1.6 representa a história natural da doença no hospedeiro imunocomprometido. (26)

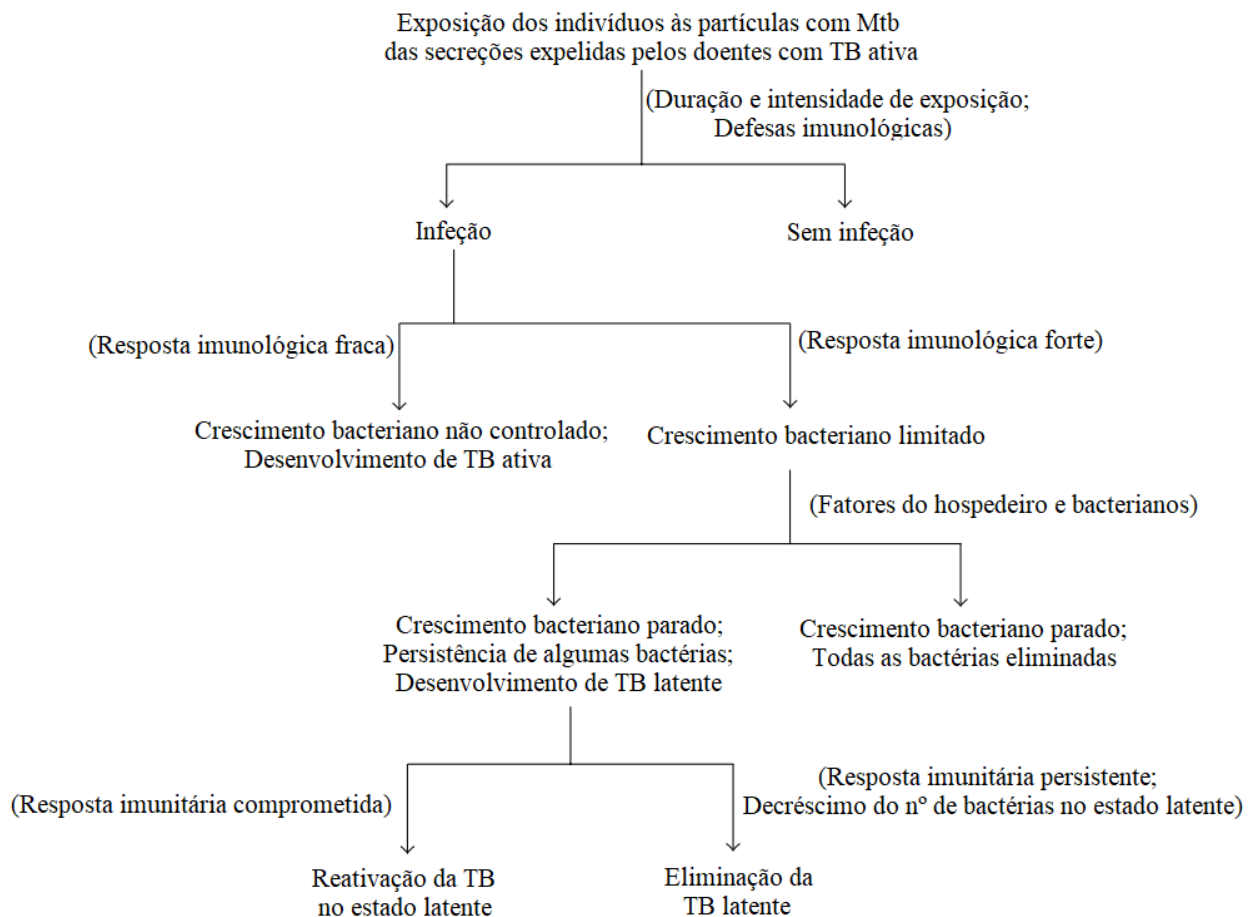


Figura 1.6 - História natural da doença no hospedeiro imunocomprometido após a exposição a partículas contendo Mtb. Mtb = *Mycobacterium tuberculosis*, TB = Tuberculose (adaptado de (26))

1.6.1. Transmissão

O Mtb é transmitido através de partículas enquanto fala, tosse ou espirra (Figura 1.7 A e B). Essas partículas são suficientemente pequenas para ficarem suspensas no ar desde alguns minutos a horas, apresentando 1 a 5 μm de diâmetro (Figura 1.7 C). (19,26,38)

Após inalação, as bactérias presentes nas partículas infetam inicialmente os pulmões, dependendo do risco de infecção de vários fatores, tais como a proximidade com o reservatório (pessoa infetada) e a eficácia do sistema imunitário do hospedeiro (Figura 1.7 D). (38)

Graças ao seu pequeno tamanho, as partículas conseguem evitar as barreiras naturais existentes nos brônquios, atingindo os alvéolos pulmonares, onde são fagocitados pelos macrófagos alveolares, neutrófilos e células dendríticas, após o reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs das células fagocitárias do hospedeiro. Quanto maior é a suscetibilidade do hospedeiro, maior é o risco de infecção das células do sistema imunitário pelo Mtb e progressão dessa infecção para doença, ou seja, estado sintomático da TB (Figura 1.7 E). (19,26)

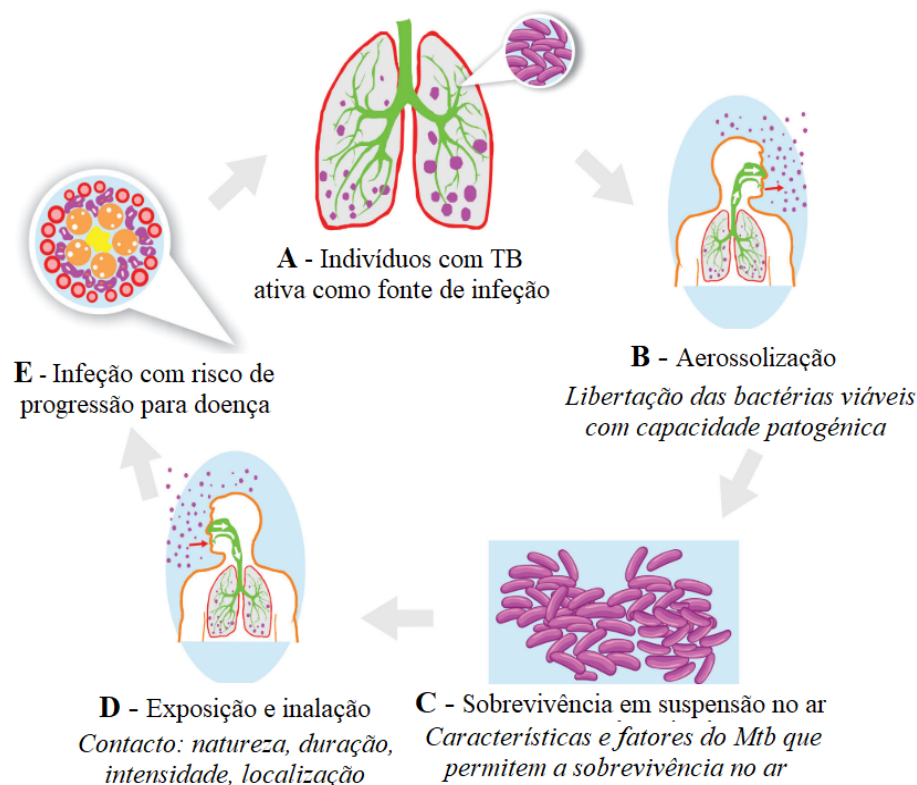


Figura 1.7 - Ciclo de transmissão de Mtb. Mtb = *Mycobacterium tuberculosis*, TB = Tuberculose (adaptado de (39))

1.6.2. Infeção primária

Na infeção primária, ou seja, no 1º contacto com o organismo hospedeiro, o Mtb fica localizado maioritariamente na região média dos pulmões. (40) Nessa altura a bactéria desperta a resposta imunitária, o que leva à formação de granulomas. O granuloma inflamatório com necrose caseosa numa infeção primária desenvolve-se em dois locais: na região pulmonar, onde ocorreu a 1ª infeção com o Mtb (foco pulmonar ou foco de Ghon) e nos gânglios linfáticos mediastinal e hilar do lado da zona afetada. Quando ambos os locais são afetados, a afeção designa-se complexo de Ghon ou complexo bipolar da TB. (40,41)

O Mtb, na sua parede celular, apresenta glicolípidos que interagem com os recetores de manose na superfície dos macrófagos, ou seja, o Mtb induz a sua própria endocitose. (35) Uma vez dentro do macrófago alveolar, poderão levar a uma das duas situações de infeção descritas a seguir, dependendo do nível de virulência do Mtb e da resposta imunitária do hospedeiro.

Se for o caso de infeção por uma estirpe menos virulenta, a bactéria induzirá a apoptose do macrófago, por formação de vesículas apoptóticas. No entanto, com uma resposta imunitária eficaz, essas vesículas serão de novo fagocitadas pelos macrófagos e serão expostas à sua superfície como um complexo de antígeno associado ao MHC tipo II. Esses macrófagos migram

até aos gânglios linfáticos onde residem as células T e células B e interagem com as mesmas através da interação entre o complexo “MHC-II + antígeno” com os recetores das células T e B. (27)

Existem estirpes mais virulentas, que conseguem escapar à resposta imunitária, inibindo as enzimas lisossomais, da fusão do lisossoma com fagossoma (formação de fagolisossomas), da produção de espécies reativas de oxigénio e azoto, conseguindo assim replicar-se dentro do citoplasma do macrófago e escapar ao sistema imunitário do hospedeiro. Uma replicação excessiva de Mtb leva à lise do macrófago libertando uma grande quantidade de agente patogénico no alvéolo. Não sendo eficazmente travado pelo sistema imunitário, o Mtb terá o potencial de evoluir de infeção à doença e até de TB pulmonar à TB extrapulmonar. (26)

1.6.2.1 Tuberculose ativa e latente

Uma infeção nem sempre origina um episódio de doença, ou seja, TB sintomática (estado ativo). Esse facto deve-se ao desenvolvimento da resposta imune adquirida ao longo do tempo, que passou após a infeção e que elimina a bactéria mais eficazmente do que a resposta imune inata. (7) O desenvolvimento de doença depende do estado das defesas imunológicas do hospedeiro: o Mtb pode entrar em estado de latência, ou seja, o hospedeiro é assintomático, ou o Mtb sai do espaço intracelular, infetando outros tecidos e desenvolvendo o estado ativo de TB que é sintomático e transmissível. (6,7)

Em 90 % dos casos de infeção, os granulomas formados sofrem fibrose e calcificação, ou seja, há formação de tecido fibrótico ao redor do granuloma, transformando o complexo de Ghon em complexo de Ranke. (37,42) Esse processo geralmente é suficiente para interromper o crescimento bacteriano antes do desenvolvimento da doença, ou seja, TB ativa, e nesses casos os indivíduos infetados não apresentarão sintomas de doença uma vez que o Mtb permanecerá em estado latente no interior dos granulomas, não contribuindo assim para a transmissão da doença (Figura 1.8 A). No entanto, em 10% dos casos o tecido fibrótico não é suficiente para conter a proliferação do Mtb, pelo que esses indivíduos apresentarão sintomas de doença, ou seja, o Mtb apresentar-se-á na sua forma ativa (Figura 1.8 B). Desta situação resulta a TB ativa, que surge devido à incapacidade do sistema imunitário para conter a 1ª infeção. Assim, a doença desenvolve-se maioritadamente em indivíduos com sistema imunitário imaturo ou deficiente, como é o caso das crianças, idosos e indivíduos imunossuprimidos. (37)

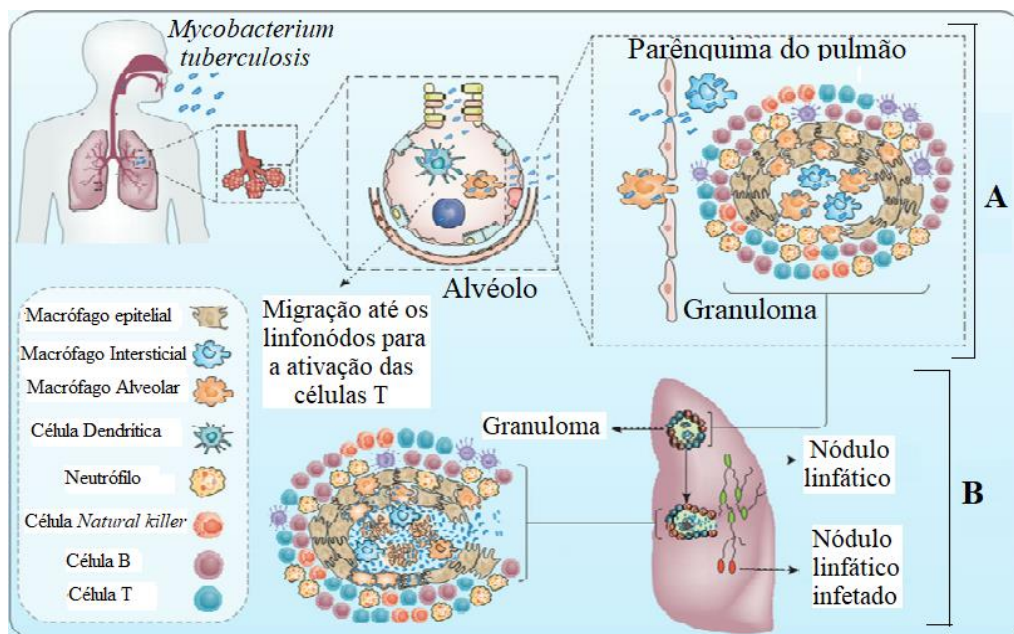


Figura 1.8 - Patogenicidade de TB (Adaptado de (43))

1.6.3. Infecção secundária

A TB secundária ou pós-primária é definida como uma forma de TB pulmonar num indivíduo previamente sensibilizado ao Mtb, ou seja, indivíduo com células de memória (células B). A TB secundária poderá acontecer por reinfeção exógena, ou seja, um novo contacto com Mtb através da inalação de partículas com a bactéria, ou por reativação endógena, ou seja, por imunossupressão do hospedeiro. (41,44)

No primeiro caso, reinfeção exógena, ao ter um segundo contacto com o agente patogénico a resposta de hipersensibilidade tipo IV será muito intensa e localizada, ocorrendo geralmente nos lóbulos superiores devido à maior concentração de oxigénio nesses locais que é um fator propício à replicação da bactéria. (26,44)

No segundo caso, reativação endógena, o Mtb reativa o seu metabolismo e começa a proliferar devido à incapacidade do sistema imunitário de conter a bactéria dentro do granuloma. (26)

A probabilidade da reativação e da reinfeção permanece incerta e afeta negativamente a saúde pública, uma vez que não há suporte bibliográfico para a correta implementação de intervenções para o controle de infeção. Os fatores de risco que diferenciam os dois tipos de infeção secundária são: a resistência aos medicamentos antituberculosos, as características clínicas dos doentes, os genótipos das estirpes e as coinfeções por VIH ou diabetes. (45)

1.6.4. Tuberculose disseminada

Na TB miliar, ou disseminada, o Mtb invade o sistema circulatório, pelo que os indivíduos afetados apresentam bacteriemia, e circula até atingir outros órgãos, como o sistema nervoso central (SNC) e o fígado, criando várias lesões microgranulomatosas nos mesmos. (41)

Quando atinge outros órgãos, a TB é definida como TB extrapulmonar e designa-se pelo nome da zona afetada, por exemplo, TB gastrointestinal, meningite por TB, TB do fígado, TB cardíaca, TB músculo-esquelética, etc. (46) A TB extrapulmonar representa cerca de 15 a 20% de todos os casos de TB em doentes imunocomprometidos, e mais de 50% dos casos em doentes VIH positivos. (6)

A invasão do sistema circulatório pelo Mtb pode acontecer durante a formação de um granuloma que lesionou um vaso capilar. (47) A TB disseminada pode acontecer quer na TB primária, quer na secundária, uma vez que em ambas as situações, os vasos capilares podem ser afetados pelo granuloma. (44)

Quando o granuloma afeta um vaso capilar poderá ocorrer uma disseminação hematogénica. Essa afeção tem então como o sintoma principal a tosse com sangue, devido ao lesionamento do vaso capilar localizado nas vias aéreas inferiores. (48) Já ao lesionar um brônquio, poderá ocorrer uma disseminação broncogénica, uma vez que o brônquio passa a drenar a necrose caseosa. Ao ser drenada, a necrose caseosa transformar-se-á numa lesão cavitária, onde a concentração de Mtb é extremamente elevada, pelo que a presença da lesão cavitária é um fator que aumenta a transmissibilidade do Mtb. (49)

1.7. Mecanismos de fuga ao sistema imunitário e fatores de virulência

Por fator de virulência entende-se qualquer fator ou molécula que o agente patogénico usa para causar uma doença, - neste caso o agente Mtb para causar TB -, ou seja, um fator que fornece ao agente patogénico capacidade de se replicar e causar danos ao organismo do hospedeiro, desviando-se das defesas do sistema imunitário deste. É crucial conhecer os fatores de virulência do agente patogénico que se pretende erradicar, de modo a identificar os “*drugable*” *virulence targets*, ou seja, os fatores alvo suscetíveis a fármacos que podem ser usados como alvos terapêuticos no desenvolvimento de novas substâncias ativas. (50)

O Mtb não possui fatores de virulência clássicos, como as toxinas, uma vez que adaptou os seus genomas para a sobrevivência dentro de células do hospedeiro. (51) Utiliza 3 estratégias principais para permitir sua sobrevivência e replicação, bem como para obter todos os nutrientes

necessários das células infectadas: modulação do sistema imunológico do hospedeiro, entrada no estado latente e ruptura fagossomal, sendo esta última necessária para a transição do estado latente para o estado ativo. Essas estratégias são mediadas através de fatores e proteínas, descritas adiante.

1.7.1. Sistema de secreção ESX-1

Um dos principais fatores de virulência responsáveis pelo crescimento da bactéria é o sistema de secreção de proteínas tipo 1 (ESX-1). O sistema ESX-1 é um sistema de aporte de substâncias muito importante para o Mtb que, sendo uma bactéria Gram positiva, apresenta uma parede celular muito espessa, pelo que necessita dum sistema eficiente que garante acesso a substâncias, nomeadamente a todos os nutrientes necessários. (52)

O sistema ESX-1 segrega a proteína de filtrado de cultura de 10kDa (CFP-10) e a proteína antígeno de secreção primária de 6kDa (ESAT-6), ambos antígenos das células T. O ESAT-6 desempenha um papel muito importante na ruptura fagossomica ao inserir-se na bicamada lipídica do fagolisossoma, formando poros ao ativar a via das caspases, garantindo a translocação do Mtb ao citosol e acesso a nutrientes, bem como a sua disseminação através da parede alveolar, provocando citólise das células epiteliais dos alvéolos.(22,26,53,54)

Adicionalmente, ambas as proteínas do sistema ESX-1 podem ficar inseridas nas paredes internas e externas das mitocôndrias, deixando livre no espaço intracelular o ADN mitocondrial, que será detetado por várias células do sistema imunológico. Assim, haverá uma ativação da resposta inflamatória com a produção de IFN do tipo 1 (como IFN- α), mediada por ADN mitocondrial. O objetivo desse mecanismo é atrair mais células imunitárias para o local de alojamento de Mtb, para que sejam infectadas pelo mesmo. (55) Para além disso, o sistema ESX-1 participa através de ESAT-6 na inibição de autofagossomos contendo a micobactéria no interior dos macrófagos. (54)

1.7.2. Fatores lipídicos da superfície celular

De entre os fatores lipídicos que se localizam na parede celular de Mtb encontram-se os ácidos micólicos, os sulfolípidos, o TDM, o PDIM, o LAM, o ManLAM, os PGLs e os PIMs.

1.7.2.1 Ácidos micólicos

Os ácidos micólicos são ácidos gordos que compõem a parede celular do Mtb, tornando-a bastante impermeável, o que faz a bactéria apresentar uma velocidade de crescimento lenta, devido à baixa taxa de absorção de nutrientes, derivada da impermeabilidade da parede celular.

(24) Uma vez que a taxa de crescimento da bactéria é lenta a eficácia dos fármacos antibacterianos é baixa, porque é durante a fase de crescimento rápido ou crescimento exponencial que as bactérias expõem os fatores vulneráveis a antibióticos. Para além disso, os fármacos, tal como os nutrientes, apresentam pouco poder de difusão para o interior da bactéria, devido à impermeabilidade da parede celular. (1)

Os ácidos micólicos também estão envolvidos na inibição da fagocitose e digestão do Mtb por células fagocitárias, agindo como uma cápsula. Adicionalmente, estão envolvidos no processo de formação do granuloma. (22)

1.7.2.2 Sulfolípidos

Os sulfolípidos são glicolípidos presentes à superfície da micobactéria que desempenham um papel importante na interrupção do processo normal de maturação do macrófago e na prevenção da fusão do fagossoma com o lisossoma, o que permite a sua sobrevivência no interior do macrófago. (22,23)

1.7.2.3 PDIM

O PDIM atua na lise celular, uma vez que é transferido da superfície do Mtb para a membrana do macrófago, na qual se intercala, libertando as micobactérias para o meio extracelular. Isso ocorre devido à sua capacidade para reduzir a elasticidade e a integridade das membranas e aumentar o efeito citolítico do sistema ESX-1. (55,56)

1.7.2.4 TDM

O TDM atua no processo de formação do granuloma, na ativação da libertação de citocinas quimioatratoras, na indução de apoptose e inibição da fusão de fagossoma com o lisossoma. (22)

1.7.2.5 LAM e ManLAM

O ManLAM interage com os recetores de manose no macrófago, inibe a fusão fagossoma-lisossoma e inibe o acúmulo de vacúolos autofágicos no macrófago. (22,26,54) Para além disso, ManLAM e LAM participam na modulação da produção de citocinas e da resposta imunitária adquirida, onde o LAM inibe a produção de IFN- γ por macrófagos e liga-se aos radicais livres de oxigênio impedindo uma maior destruição dos agentes patogénicos intracelulares, enquanto que o ManLAM inibe a resposta celular ao suprimir a expressão de MHC-II e IFN- γ , impedindo, respetivamente, a apresentação de antígenos por células

dendríticas (não havendo resposta imunitária adquirida eficaz) e a produção de MHC-I, MHC-II, radicais centrados em oxigênio e radicais centrados em azoto. (22,54)

1.7.2.6 PGLs

Os PGLs são lípidos de superfície relacionados com o PDIM. Induzem a produção da quimiocina CCL2 que, por sua vez, recruta monócitos que entram na constituição do futuro granuloma. Esses monócitos, tal como os macrófagos, servirão como hospedeiros para a replicação do Mtb. (57)

1.7.2.7 PIMs

Com base na literatura disponível, está comprovado que os PIMs apresentam capacidade de inibição dos macrófagos, principalmente por via de interação com TLR4, da expressão de radicais de oxigênio e da produção de citocinas como TNF- α , IL-12 e IL-1. Os PIMs também bloqueiam a interação entre os lipopolissacáridos da superfície da bactéria e os recetores CD14, inibindo assim a ativação da resposta imunitária. (58)

1.7.3. Proteínas de choque térmico

As proteínas de choque térmico (HSPs) são proteínas que atuam como *chaperons* moleculares, assistindo outras proteínas na obtenção de seu dobramento apropriado, mesmo em condições de stress. O Mtb apresenta três HSPs principais, a HSP70, a HSP65 e a HSP60, cuja transcrição é ativada sob condições de stress para induzir o estado de latência do Mtb, garantindo a sua sobrevivência. Adicionalmente, as 3 interagem com os recetores TLR (2 e/ou 4) dos macrófagos e células dendríticas, desencadeando uma resposta do sistema imunológico do hospedeiro. (59,60)

Além das 3 HSPs referidas, o Mtb apresenta duas pequenas proteínas de choque térmico (sHSPs), a sHSP16.3 e a Acr2, sendo que a sHSP16.3 também desempenha um papel importante na sobrevivência da micobactéria durante o estado de latência. (61,62)

Apesar de serem consideradas fatores de virulência, as HSPs podem ser benéficas ao hospedeiro por apresentarem características muito imunogênicas, servindo como bons candidatos para o desenvolvimento de novas vacinas, mais eficazes, e também de novas formas de diagnóstico de TB latente. (60,61)

1.7.4. Glicoproteína 19kDa

A glicoproteína 19kDa atua como agonista de recetores TLR2, à superfície dos macrófagos. Essa interação leva à ativação dos macrófagos e à secreção de citocinas pró-inflamatórias que participam na resposta imunitária contra Mtb. No entanto, o Mtb usa esse mecanismo a seu favor, uma vez que os estudos comprovaram que uma exposição prolongada à sinalização mediada por TLR conduz à inibição da expressão do MHC-II dos macrófagos. (26) Adicionalmente, através da via TLR2 dependente da caspase-8 ocorre a apoptose dos macrófagos, o que também favorece a contenção da infecção. (63)

1.7.5. Enzima KatG e enzima TpX

A enzima catalase peroxidase (KatG) confere ao Mtb resistência ao stress oxidativo das células do hospedeiro. A enzima, tiol peroxidase (TpX) catalisa a redução de hiperperóxidos e peroxinitritos no Mtb. (54)

1.7.6. SecA-2

Outro sistema envolvido nos mecanismos de fuga ao sistema imunitário é o SecA-2, um sistema de transporte associado à adenosinatrifosfatase cuja função é importar proteínas necessárias para o crescimento celular bacteriano dentro dos macrófagos contra o gradiente de concentração consumindo energia, nomeadamente ATP. O SecA-2 também inibe a maturação do fagolisossoma. (54,64)

1.7.7. Pili tipo IV e tipo curli

O Mtb apresenta dois tipos de pili: tipo curli e tipo IV. Os pili do tipo curli desempenham um papel importante na formação de biofilme, interagindo com outras micobactérias, bem como na adesão à camada epitelial das células e na adesão e invasão dos macrófagos. (65)

Os pili tipo IV existem em várias bactérias Gram positivas e Gram negativas, dando às bactérias capacidade de mobilidade, de adesão às células hospedeiras, de formação de biofilmes, de *uptake* de ADN e de secreção de proteínas. A sua função não é completamente conhecida, no entanto sabe-se que alguns genes associados aos pili do tipo IV eram previamente identificados como lectinas, ou seja, proteínas que interagem com hidratos de carbono das células. Estão envolvidas no processo de adesão às superfícies (formando biofilmes) e membranas (permitindo a invasão de células). (65)

1.8. Fatores de risco e importância da coinfeção Tuberculose/VIH

Inicialmente devemos considerar o risco de infecção que o indivíduo apresenta que, como já se verificou, é diferente do risco de desenvolvimento da doença. O risco de infecção depende de vários fatores, como a duração, a natureza e a intensidade da exposição, bem como o local de alojamento do Mtb. (39)

Dentro da população de risco de desenvolvimento de TB, após a infecção por Mtb, encontram-se as crianças com menos de 2 anos e os que apresentam contacto direto com familiares infetados pelo Mtb, bem como as pessoas mais idosas e doentes que recebem terapia com glucocorticoides, ou outra com propriedades imunossupressoras. (9) Em sentido mais lato, qualquer condição que suprima o sistema imunitário, como o envelhecimento, a malnutrição, diabetes mellitus descontrolada e falha renal pode ser considerada como um fator de risco. (26)

Na Índia, bem como em outros países mais pobres, o registo de uma maior incidência de casos de infecção por Mtb e das complicações que dela derivam devem-se a várias razões como, por exemplo, acesso dificultado aos cuidados de saúde, ausência de seguros de saúde, pobreza, medidas de controlo de infecção não adequadas, pouca higiene e acumulação de doentes na mesma instituição de saúde, com falta de ventilação adequada e falta de luz solar. (9) Estudos recentes revelaram que a deficiência de vitamina D, que advém da falta de exposição à luz solar, é frequentemente detetada em pacientes com TB ativa. Um facto interessante, pois não se observou benefício clínico advindo da suplementação com vitamina D, no entanto parece evidente que esta apresenta atividade imunomoduladora significativa. (15)

Na população em risco também se incluem os profissionais de saúde, devido ao contacto próximo com os doentes, por vezes sem equipamento de proteção individual, como máscaras e luvas. (9)

Outro fator de risco importante, e que justifica maior incidência da doença em países pobres, prende-se com uma deficiente educação para a saúde. Concretamente, a falta de informação da população sobre as vias de transmissão da bactéria, que leva à falta de higiene pessoal e comunitária, e também sobre a doença e sua terapêutica. Este último fator tem consequências devastadoras, uma vez que a falta de informação sobre a doença leva à má adesão à terapêutica, o que implica que o tratamento é começado, mas o curso de antibioterapia nunca chega a ser concluído na totalidade, promovendo o aumento de recidivas da doença e aumentando o número de casos de TB por estirpes de Mtb resistentes aos antibióticos, o que conduz a aumento significativo da sua transmissibilidade. (9)

Outro fator muito importante prende-se com a coinfeção por Mtb e VIH. A infeção por VIH afeta o mundo inteiro, contudo países mais pobres, principalmente os países africanos, são os que apresentam uma maior incidência de infeção por VIH. Os principais fatores de risco para a coinfeção por Mtb e VIH são falhas da terapêutica, falta de adesão à terapêutica e diagnóstico de infeção atrasado, situações que são bastante frequentes em zonas mais pobres. (66)

Sabe-se que o risco de desenvolver TB ativa em indivíduos infetados por VIH aumenta 20 vezes, comparativamente com os indivíduos não infetados por VIH, aumentando também o risco de morte. Isso deve-se essencialmente a 2 mecanismos: reativação da TB latente e aumento da suscetibilidade ao Mtb, já que ambos os agentes patogénicos aumentam o potencial infeccioso um do outro, acelerando a deterioração de funções imunológicas do hospedeiro. (67)

O VIH, diminuindo as defesas do hospedeiro e tornando o sistema imunitário mais fraco, cria um meio propício para o desenvolvimento da forma ativa de TB. (9,67) O VIH causa depleção das células T CD4⁺ e anormalidades funcionais das células T CD4⁺ e CD8⁺, que desempenham um papel importante na proteção contra a TB ativa. Por outro lado, a infeção por Mtb acelera a progressão da infeção assintomática por VIH para SIDA. (26)

É de notar que os indivíduos VIH positivos que recebem tratamentos antirretrovirais junto com os medicamentos contra o Mtb apresentam maior risco de desenvolvimento de complicações, como a síndrome inflamatória de reconstituição imunológica (caracterizada pelo aumento súbito de células CD4⁺ e consequente reação inflamatória). (14,26) Os derivados da rifamicina (como a rifampicina, rifabutina e rifapentina, usadas no tratamento da TB) induzem a transcrição de enzimas, como o citocromo (CYP) 3A que metabolizam os inibidores de proteases usados no tratamento e controlo de VIH, diminuindo as concentrações destes últimos e aumentando o risco de desenvolvimento de estirpes de Mtb resistentes aos fármacos disponíveis. (14)

1.9. Diagnóstico

Dado que na maioria dos indivíduos a infeção é assintomática (TB latente), o diagnóstico clínico da TB é difícil, no entanto existem 2 tipos de teste que permitem diagnosticar doentes com TB latente, bem como TB ativa: teste de sensibilidade à tuberculina (TST) ou teste Mantoux e o *Interferon Gamma Release Assay* (IGRA). (7)

Uma pessoa infetada pelo Mtb, mas assintomática, pode ser identificada 6 a 8 semanas após a exposição ao agente patogénico, caso desenvolva reação (após 48 a 72 horas no local de

injeção) ao derivado de proteína purificada, também designado por tuberculina, usado no teste TST. No entanto este teste é pouco preciso, não sendo possível identificar o tipo de micobactéria que infetou o organismo. (7,26)

O TST indica se o indivíduo teve algum contacto prévio com a bactéria, ou seja, se foi infetado, mas não faz o diagnóstico da doença. É muito comum em certos países a pessoa ter contacto com Mtb mas não desenvolver nenhuma doença relacionada com TB ativa. Para além disso, em doentes imunocomprometidos pode conduzir a falso-negativo, uma vez que ainda não desenvolveram uma resposta imunitária suficiente que possa ser detetada pelo teste. Já um falso-positivo poderá ocorrer em pessoas que receberam a vacina BCG. (7)

Para a deteção da TB latente, a *Food and Drug Administration* (FDA) autorizou a comercialização de dois testes IGRA: o QUANTIFERON®-TB Gold (Cellestis, Austrália) e o TB.Spot® (Oxford Immunotec, Grã-Bretanha). São testes mais precisos e específicos que o TST, que permitem avaliar a produção do IFN- γ por células Th1 em resposta a antigénios específicos do Mtb, nomeadamente ESAT-6 e CFP-10, ausentes em *M. bovis* BCG (genes eliminados na produção da vacina) e na maioria das micobactérias ambientais, eliminando as reações cruzadas com estas micobactérias. O teste IGRA não diferencia entre TB ativa e latente, mas poderá ser útil na identificação quer da TB latente em indivíduos assintomáticos, quer da TB ativa em doentes imunossuprimidos, como testes de diagnóstico adjuvantes. (7,26)

Existe um outro método de fácil realização, baixo custo e rápido que é a baciloscopia, que consiste na coloração das micobactérias com fucsina fenicada, com posterior descoloração por álcool ácido, onde só as micobactérias reterão o corante, dando origem a um resultado positivo à TB. No entanto, hoje em dia já é pouco usado porque a cultura do Mtb é um processo demorado, pois o bacilo tem um crescimento lento (15-20 h), e é um teste que apresenta pequena sensibilidade, apresentando resultado negativo em 30 a 50% dos casos de pessoas infetadas com Mtb. (35)

Hoje em dia também se recorre aos testes de amplificação de ácidos nucleicos, ou testes rápidos, de alta especificidade no diagnóstico, dos quais o mais vulgarmente usado é a reação em cadeia da polimerase. É um teste que proporciona a possibilidade de diagnóstico de TB pulmonar ou laríngea, bem como de TB em outros órgãos ou tecidos, ou seja, de TB extrapulmonar. (68)

Para o diagnóstico de TB extrapulmonar e para o auxílio de localização anatômica do Mtb são também utilizadas técnicas como tomografia computadorizada, laparoscopia e endoscopia por ressonância magnética. (6)

1.10. Prevenção

Um dos objetivos da OMS é erradicar a pandemia da TB até 2035, sendo uma das estratégias essenciais o desenvolvimento de vacinas efetivas que consigam bloquear o ciclo de transmissão do Mtb. (69)

Atualmente só é autorizada a comercialização duma vacina contra a TB, a BCG. Esta vacina foi administrada pela primeira vez em Paris em 1921 pelo Dr. Benjamin Weill-Halle, por via oral, a uma criança. Hoje em dia, a vacina BCG é administrada via parenteral às crianças e demonstra ser eficaz na prevenção de complicações derivadas duma infeção por Mtb, bem como na prevenção da evolução para a forma extrapulmonar da TB em crianças. (9,11,14) No entanto a BCG demonstra alguma variação na eficácia, ou seja, na prevenção da TB, não tendo demonstrado potencial no controlo da epidemia global nem na diminuição da transmissibilidade da doença. Assinala-se o decréscimo notado nos últimos anos na eficácia da indução da imunidade pelas vacinas, (14,69,70) sendo que após a administração da vacina, em crianças, o risco de apresentar infeção diminui somente 20% e o risco da infeção progredir para doença decresce 60%. (14) Estes dados revelam a necessidade de investir no desenvolvimento de novas vacinas. Sabe-se que os adolescentes e os adultos são os principais meios de transmissão da doença, uma vez que são os mais afetados pela doença. Assim, as novas vacinas deverão ter como população alvo as faixas etárias superiores, de modo a cobrir a maior parte da população e prevenir a transmissão do Mtb. (69–71)

Está a ser considerada a oportunidade de utilizar vacinas como coadjuvante no tratamento de TB devido à sua aptidão para prevenir recidiva ou reinfeção nos doentes por TB, mas enveredar por esta estratégia dependerá da capacidade de manutenção de uma resposta sustentável das células T contra as micobactérias. (69,71) Se este aspeto for alvo de estudo no desenvolvimento de novas vacinas, a sua incorporação na terapêutica poderá aumentar as taxas de cura, principalmente em doentes infetados com estirpes resistentes a fármacos contra o Mtb, bem como reduzir a duração do tratamento, que geralmente é de 6 meses, ou 2 anos em doentes infetados com estirpes resistentes. (69) No entanto, não é uma boa estratégia caso o objetivo final seja a erradicação total da doença, uma vez que, para atingir esse objetivo, é necessário prevenir a infeção, ou seja, o primeiro contacto com o Mtb. (71)

É estimado que quase 1/4 da população mundial possa estar infetada pelo Mtb, concluindo que existe um número muito elevado de possíveis casos de TB ativa, ou seja, elevado risco de transmissão do bacilo. Foi estudada e comprovada a efetividade na diminuição da mortalidade e morbidade da administração duma vacina pré-infeção, ou seja, antes de ocorrer o primeiro o contacto com o Mtb, e uma vacina pós-infeção, mas antes do desenvolvimento de TB ativa. O propósito da vacina pré-infeção baseia-se não tanto para prevenção da infeção mas para prevenção da doença, uma vez que este último ponto é o essencial para a diminuição das taxas de mortalidade e morbidade por TB. (69)

A prevenção de infeção ainda é uma meta inatingível no caso da TB, porque as células T, que são o alvo que deve ser estimulado e ativado pela administração da vacina, não podem impedir que os indivíduos se infetem com Mtb porque não interagem diretamente com os antígenos microbianos e detetam apenas as células já infetadas. (71)

Existem duas vacinas na fase IIb de ensaios clínicos que têm como propósito a prevenção da infeção (nomeadamente DAR-901 e a revacinação com BCG), no entanto as 3 vacinas (nomeadamente *M.vaccae*, VPM1002 e Immunovac/MIP) que já se encontram na fase III dos ensaios clínicos estão dedicadas à inibição da doença. (72)

Está a ser desenvolvida uma nova geração de vacinas que atingirão o local de entrada do Mtb, ou seja, os pulmões, que são desenhadas de modo a serem administradas por via intranasal. Essas vacinas têm como objetivo estimular as defesas das mucosas do hospedeiro, induzindo a produção local de imunoglobulina A que então teria como alvo o Mtb no espaço alveolar e não as células já infetadas. Assim, a nova geração de vacinas tem como propósito final a geração de anticorpos específicos que poderiam impedir que indivíduos se infetassem com Mtb e que, a nível global, teria enorme contribuição para a erradicação da TB. (71)

Capítulo II: Atual Quimioterapia e Resistências

2. Quimioterapia da TB

O objetivo principal do tratamento farmacológico da TB é a cura do doente e contenção da transmissão da doença. Durante o tratamento são utilizados fármacos que eliminam rapidamente a população bacteriana e impedem uma recidiva de TB ativa. (6)

A escolha dos medicamentos para o tratamento da TB depende do estado em que o Mtb se encontra (ativo ou latente) e do nível de resistência aos fármacos da estirpe infetante e define o regime terapêutico do doente, ou seja, a escolha dos fármacos antituberculosos deve ser individualizada. Para TB provocada por estirpes suscetíveis aos fármacos o regime de tratamento escolhido envolve medicamentos utilizados na quimioterapia de 1ª linha. Para casos em que a estirpe infetante apresenta resistência a um ou mais fármacos de 1ª linha recorre-se aos medicamentos utilizados na quimioterapia de 2ª linha. (73)

É de notar que o regime terapêutico para o tratamento da TB não envolve a prescrição de um único fármaco antituberculoso, assentando na associação de vários fármacos de modo a inibir o crescimento das micobactérias e também erradicá-las, evitando assim as mutações espontâneas no seu genoma, que se desenvolvem independentemente para cada fármaco e caracterizam as estirpes resistentes aos fármacos. O desenvolvimento de resistências é uma das maiores limitações ao controlo das TB, e principal preocupação da OMS. (14)

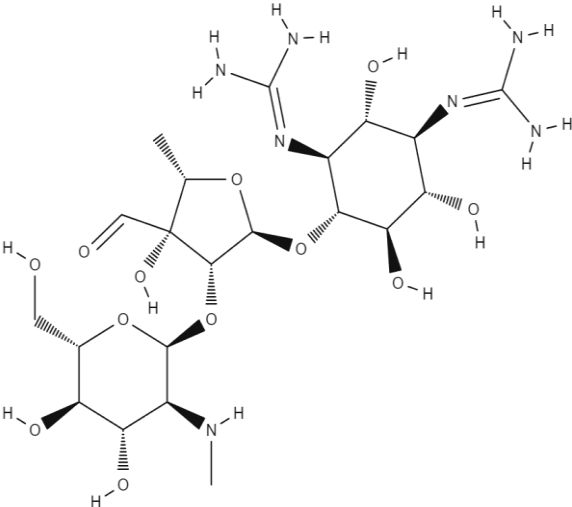
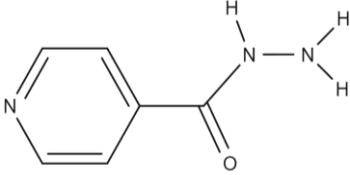
Sabe-se que as mutações espontâneas só ocorrem em bacilos na fase de replicação, ou seja, durante os processos necessários para a formação de novas cadeias de ADN, por exemplo através do mau emparelhamento das bases azotadas. Assim, para minimizar as resistências aos fármacos os tratamentos da TB apresentam uma duração longa, usando medicamentos que apresentam tempo de semivida elevado. (14)

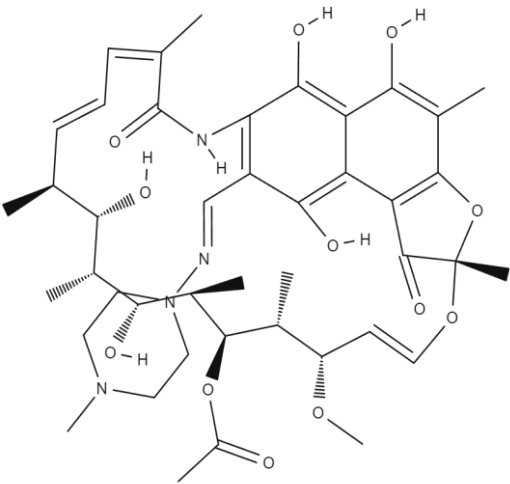
2.1. Quimioterapia de 1ª linha

A terapêutica de 1ª linha controla a TB ativa e a TB latente, mudando o esquema posológico dos mesmos fármacos para cada estado da micobactéria. A TB latente é geralmente tratada com um único antibiótico, de modo a prevenir a progressão da doença para a sua forma ativa e sintomática, enquanto a TB ativa é tratada usando associações de vários fármacos, de modo a prevenir ou retardar o desenvolvimento de resistências. (15)

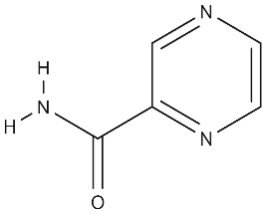
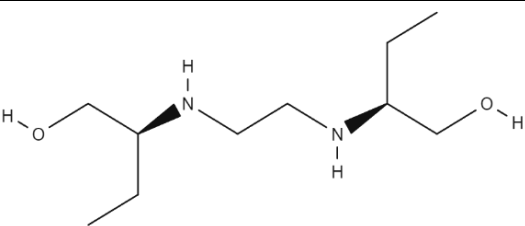
Atualmente, o regime terapêutico mais prescrito para TB ativa não complicada consiste no uso conjunto de 4 fármacos, todos de administração oral, rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, de toma diária durante 2 meses na fase intensiva, com posterior fase de continuação durante 4 meses, em que são administradas rifampicina e isoniazida, de toma diária ou três vezes por semana. (73–75) A estreptomicina já fez parte da 1ª linha de tratamento, no entanto foi suspensa devido à elevada taxa de resistências, sendo usada apenas como substituto da amicacina. (73,76) A estrutura, a classe química e o mecanismo de ação dos fármacos mencionados são explicitados no Quadro 2.1.

Quadro 2.1 - Fármacos usados na quimioterapêutica de 1ª linha para o tratamento da TB (73,77)

Fármaco	Classe Química	Estrutura	Mecanismo de ação
Estreptomicina*	Aminoglicosídeo		Interação com a subunidade ribossomal 30S, com subsequente inibição da síntese proteica (tradução).
Isoniazida	Ácido isonicotínico		Interação com enoil-ACP redutases, com subsequente inibição da síntese de ácido micólico.

Rifampicina	Rifamicina		<p>Inibição da ARN-polimerase ADN dependente, com subsequente supressão do início de formação da cadeia na síntese de ARN.</p>
-------------	------------	--	--

Continuação do Quadro 2.1

Pirazinamida	Pirazina		<p>Diminuição do pH; Modificação do potencial de membrana; Inibição da proteína ribossomal S1, com subsequente inibição da síntese proteica (tradução); Inibição da síntese da coenzima A</p>
Etambutol	Etilenodiamina		<p>Inibição das arabinosil-transferases, com subsequente inibição da síntese da parede celular, nomeadamente da síntese do arabinogalactano.</p>

*- atualmente administrada na terapêutica de 2ª linha; descrita no capítulo 2.2.2

Existem esquemas terapêuticos alternativos ao descrito acima (75):

- Administração conjunta de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol durante primeiras 2 semanas de toma diária, mudando o esquema posológico à toma dos fármacos duas vezes por semana durante mais 6 semanas (fase intensiva), seguindo a fase de continuação de toma de isoniazida e rifampicina duas vezes por semana durante 4 meses;
- Administração conjunta de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol três vezes por semana durante 2 meses (fase intensiva), com posterior toma de

rifampicina e isoniazida três vezes por semana durante 4 meses (fase de continuação).

Evidências recolhidas e publicada em 2017 na *systematic review* da OMS mostram que, comparando o esquema terapêutico que consiste em três tomas semanais com o de toma diária, os pacientes submetidos a 3 tomas semanais apresentam um risco maior de falha do tratamento, recidiva da doença e desenvolvimento de resistências aos medicamentos, quando a estirpe de Mtb era suscetível e quando a suscetibilidade da estirpe era desconhecida. Consequentemente, a posologia de três vezes por semana na fase intensiva nunca deve ser usado. (75)

Para além disso, a administração dos fármacos antituberculosos de 1ª linha duas vezes por semana na fase de continuação resultou em taxas mais altas de falha do tratamento, recidiva da doença e desenvolvimento de resistências do que a administração de três vezes por semana apenas na fase de continuação. Como resultado, o esquema terapêutico que consiste em duas tomas semanais nunca deve ser usado durante qualquer fase da terapia de TB. (75)

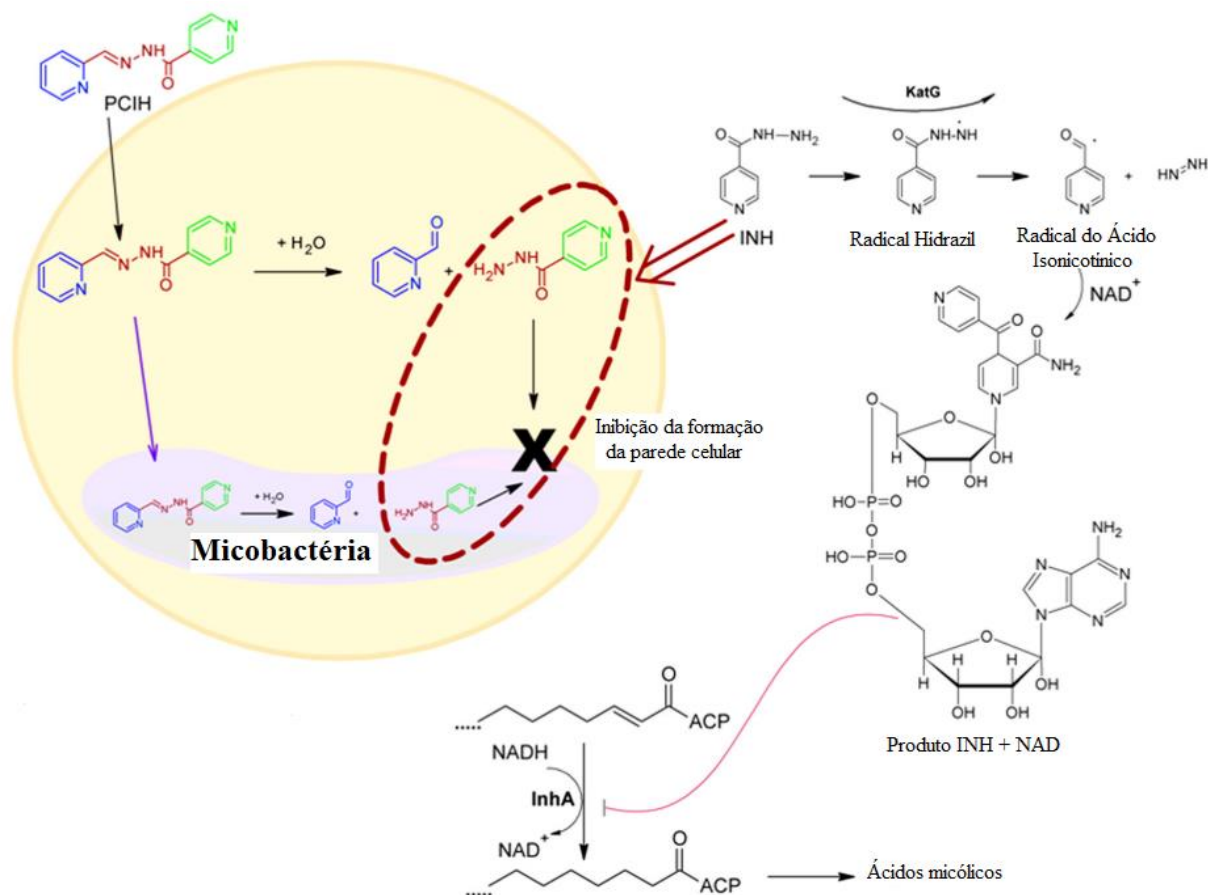
Sabe-se que nenhuma dose deve ser esquecida quando o esquema terapêutico se baseia em doses intermitentes durante a fase de continuação, pois o risco de obter resultados desfavoráveis aumenta. Assim, as populações mais vulneráveis correm o risco de esquecimento de toma das doses de medicamentos ou de deficiente absorção das mesmas, pelo que tomas intermitentes incrementam o risco de resultados finais desfavoráveis. (75)

2.1.1. Isoniazida

A isoniazida é um fármaco cujo efeito bactericida (capacidade de matar as bactérias) só opera sobre microrganismos em fase ativa de replicação, ou seja, na fase exponencial, não tendo eficácia sobre bactérias em fase estacionária ou em condições de anaeróbia. (74,78)

A isoniazida é um derivado da nicotinamida (tal como a pirazinamida) e comporta-se como um prófármaco, ou seja, é administrada na forma inativa, convertendo-se na forma ativa após biotransformação catalizada pela enzima KatG da micobactéria, uma enzima codificada pelo gene *katG*. A isoniazida entra na célula por difusão passiva, sofrendo a biotransformação no citoplasma. (74) É ativada pela KatG por peroxidação (oxidação), dando origem a radicais livres (centrados nos átomos de oxigénio, carbono ou azoto) que danificam vários componentes da bactéria, como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. (78,79) A oxidação pela KatG dá origem ao radical isonicotinoílo, que se liga covalentemente à molécula dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺) formando o metabolito ativo, (78) um potente inibidor das enoil-proteína de

transporte de acila (ACP) redutases, codificadas pelo gene *inhA*, enzimas que desempenham um papel fundamental na síntese de ácidos micólicos da micobactéria (Figura 2.1). A ausência destas enzimas, bem como a ausência dos ácidos micólicos, conduz a inibição da formação da parede celular do Mtb e resulta na morte da micobactéria. (79)



As resistências à isoniazida resultam essencialmente de mutação no gene *katG*, nomeadamente no codão 315 (mutação Serina315T, ou S315T), resultando na síntese duma enzima com pouca afinidade pela isoniazida, pelo que as concentrações do metabolito ativo são muito baixas. A mutação na região promotora (região 15) do gene *inhA*, também conhecida como mutação 15C→T da região reguladora *fabG1-inhA* ou *c(-15)t*, também desempenha um papel importante no desenvolvimento de resistência à isoniazida, visto que leva ao aumento da expressão da proteína InhA, como um modo de compensação. (80,81) Além disso, há relatos de mutações no sítio ativo *inhA*, que modificam a conformação do sítio ativo das enoil-ACP redutases e comprometem a capacidade de acoplamento da isoniazida ao sítio de ligação da enzima. (82,83) Um estudo realizado por Seifert M. *et al.* mostrou que cerca de 64% de estirpes resistentes à isoniazida apresentam a mutação S315T e 19% a mutação no gene *inhA*. (84)

Figura 2.1 - Mecanismo de ação da isoniazida. PCIH = Derivado de Hidrazona, INH = Isoniazida, KatG = Catalase Peroxidase, NAD^+ e $NADH$ = Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina, ACP = Proteína de Transporte de Acila, InhA = Enoil-ACP Redutases (adaptado de (85))

O desenvolvimento de um novo fármaco da família da isoniazida que seja eficaz contra estirpes resistentes, e mais seguro que a isoniazida, é uma área alvo importante a ser investigada para o tratamento de TB resistente. (86) Além disso, um fármaco que apresente maior atividade contra Mtb poderá apresentar potencial para diminuir a duração do tratamento para a TB, que é um dos fatores que limitam a adesão à terapêutica, pelo que o aumento de atividade de análogos da isoniazida também apresentará vantagem na redução da duração do tratamento. (87) O desenvolvimento racional destes análogos da isoniazida requer informação sobre relação estrutura-atividade (SAR) da molécula parente. A investigação realizada considerou duas vertentes para otimização dos fármacos da família da isoniazida: uma centrada na bioativação do profármaco e outra na interação da espécie ativa com InhA. A Figura 2.2 mostra que no processo de desenho da isoniazida foram consideradas ambos os aspetos. Para o esboço de outros possíveis fármacos é possível a troca do grupo amino pelo $N=CR_1R_2$ ou $NHC R_1R_2$, bem como a troca no grupo carbonilo do oxigénio pelo enxofre (tioacetona), com a troca do grupo amino pelo hidrogénio. Para além disso, é conhecido que o grupo isonicotinoilo tolera um substituinte de pequenas dimensões. Já a substituição do grupo isonicotinoilo por outros grupos arilo ou heteroarilo torna a molécula menos ativa. (86)

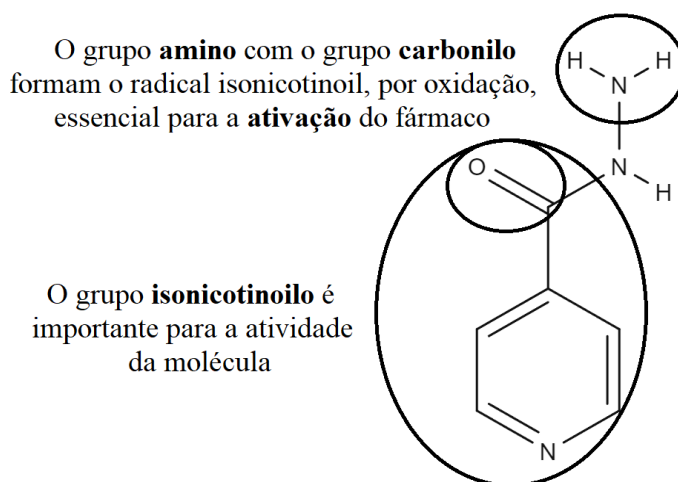


Figura 2.2 – Símula dos resultados dos estudos de relação estrutura-atividade (SAR) da isoniazida (adaptado de (86))

2.1.2. Rifampicina

A rifampicina é um derivado de rifamicina que apresenta efeito bactericida contra Mtb. (88,89) É um fármaco que atravessa a parede celular do Mtb por difusão passiva e, quando no interior da bactéria, inibe a transcrição de genes através do bloqueio da atividade do ácido ribonucleico (ARN) polimerase ADN dependente do Mtb, ligando-se à subunidade β do centro catalítico da mesma (Figura 2.3). (83,90)

É de notar que as ARN polimerases ADN dependentes só são suscetíveis aos fármacos derivados de rifamicina antes de começarem o processo de transcrição, dado que foi demonstrado que as rifamicinas bloqueiam a transcrição imediatamente após a formação da segunda ou terceira ligação fosfodiéster do novo transcrito, ou seja, quando atingem o tamanho de 2 a 3 nucleótidos. (89)

As resistências à rifampicina encontram-se associadas a mutações nas posições 531, 526 e 516 do gene *rpoB*, responsável pela codificação da subunidade β da ARN polimerase da micobactéria. (74) São mutações responsáveis pela alteração da conformação da subunidade β , levando à diminuição da afinidade da rifampicina ao sítio de ligação e assim comprometendo o poder inibitório da rifampicina da ARN polimerase ADN dependente do Mtb. (74,83)

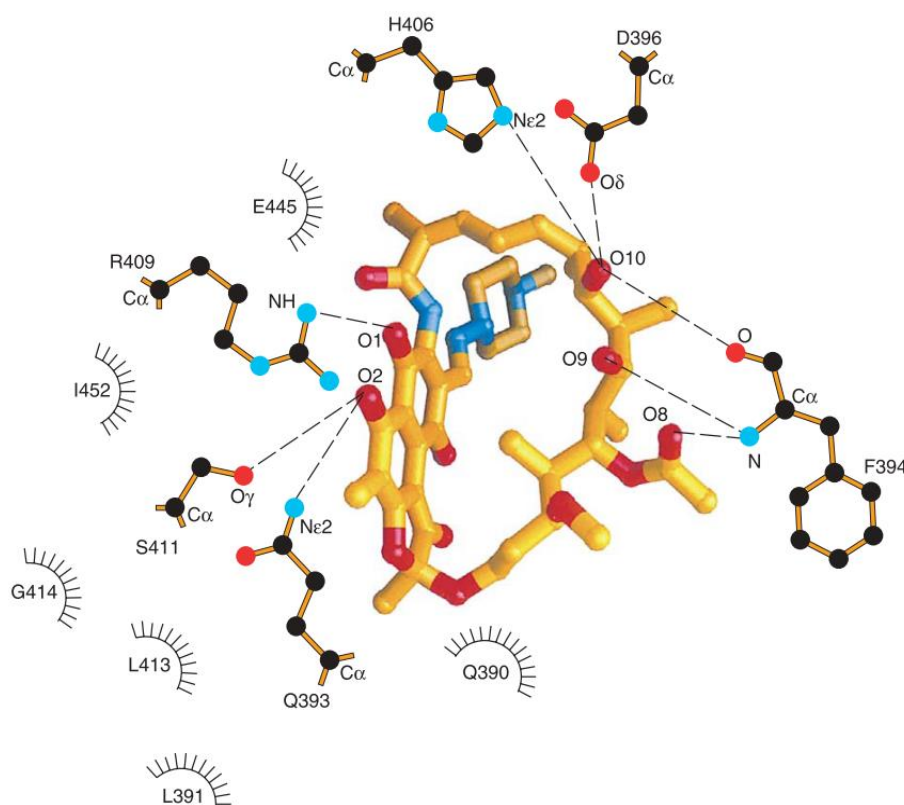


Figura 2.3 – Representação do mecanismo de interação da rifampicina com o sítio ativo da subunidade β da ARN polimerase (átomos de carbono – laranja, oxigênio – vermelho, azoto – azul) (adaptado de (86))

Do estudo SAR do composto que deu origem à rifampicina foi possível identificar posições que potencialmente poderão servir como alvo para modificações de modo a melhorar os aspetos farmacocinéticos (p.ex. absorção) e farmacodinâmicos (p.ex. potência e atividade) do fármaco. Certas modificações são possíveis uma vez que originam compostos de potência semelhante. Assim, novos derivados da rifampicina poderão apresentar modificações no grupo

acetilo, nas posições C-3 e C-4 (substituído com grupo pirazina e grupo hidroxilo, respectivamente, na estrutura da rifampicina) e no grupo carbonilo da posição C-11. Para além disso é possível a conversão dos alcenos nas posições C-16/C-17, C-18/C-19 e C-28/C-29. No entanto, os grupos hidroxilo nas posições C-1, C-8, C-21 e C-23 são essenciais para a atividade, não podendo ser alterados. (86)

Na Figura 2.4. é possível observar que o desenho da rifampicina obedece aos princípios base extraídos dos estudos SAR. (86)

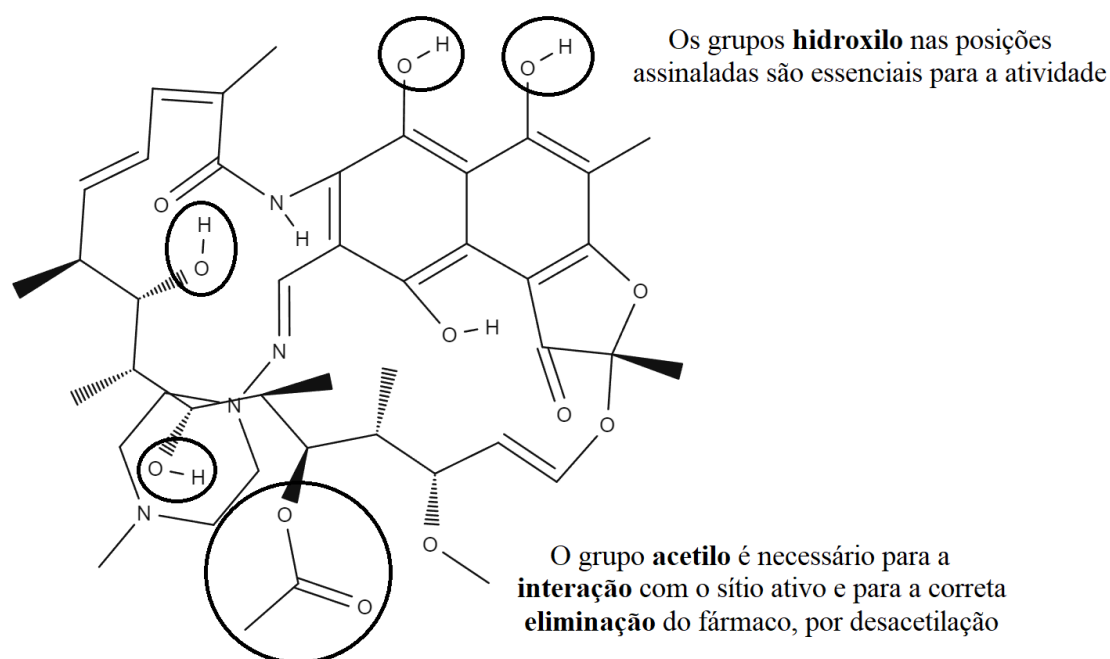


Figura 2.4 – Síntese dos resultados dos estudos de SAR da rifampicina (adaptado de (86))

2.1.3. Pirazinamida

A pirazinamida é um análogo da nicotinamida e precursor da niacina (ácido nicotínico e vitamina B3). (74) É o fármaco que apresenta melhor atividade contra bactérias com baixas taxas de crescimento, como no caso do Mtb, e a sua atividade única é descrita como esterilizante, apresentando a capacidade de inibir o Mtb em estado latente que persiste em meio ácido nos macrófagos. (91) É utilizada na quimioterapia de 1ª linha da TB. Diminui a taxa de recidiva e reduz a duração do curso de tratamento de 1 ano a 6 meses. (92)

A pirazinamida é um profármaco que atravessa a membrana do Mtb por difusão passiva. Uma vez no citoplasma sofre metabolização pela enzima micobacteriana pirazinamidase dependente de ferro, codificada pelo gene *pncA*, convertendo-se no metabolito ativo, o ácido pirazinóico. (83,93) O ácido pirazinóico é excretado pela bactéria e como o lisossoma apresenta

pH baixo, a molécula é convertida no seu ácido conjugado que retorna para o citoplasma do Mtb, promovendo a acidificação do meio, o aumento da permeabilidade da membrana, a alteração do potencial de membrana e do transporte de substâncias, provocando lesões celulares e posterior morte da micobactéria (Figura 2.5). (88,93) O ácido pirazinóico inibe a síntese da coenzima A da micobactéria através da ligação à enzima aspartato descarboxilase. (92,93)

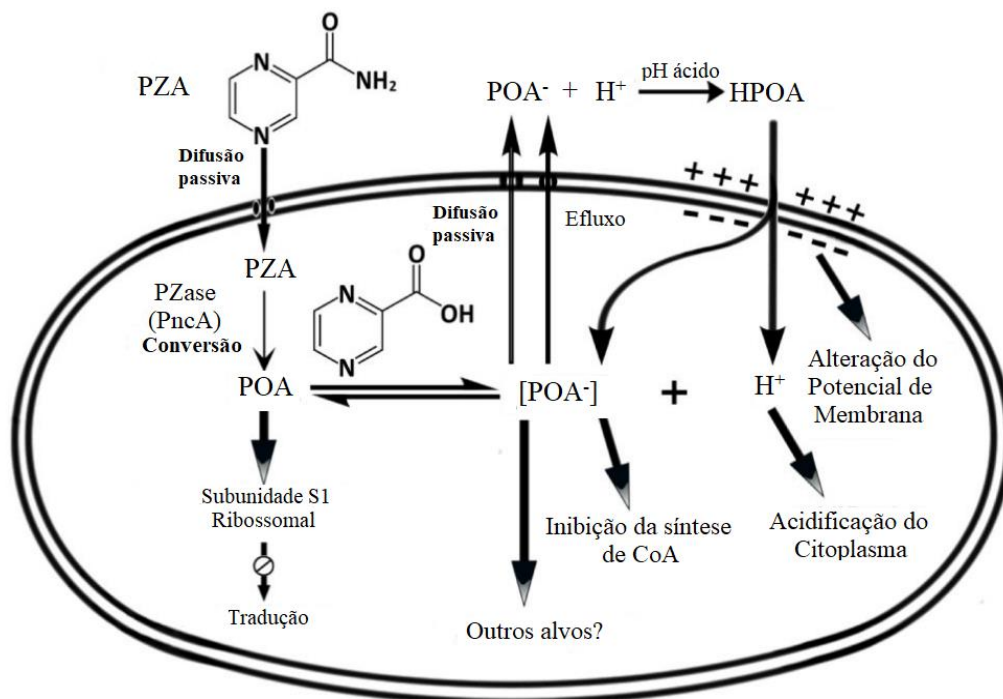


Figura 2.5 – Representação dos mecanismos de ação de pirazinamida. PZA = pirazinamida; PZase = pirazinamidase; POA^- = Ácido Pirazinóico; $HPOA$ = Ácido Conjugado do Ácido Pirazinóico; CoA = Coenzima A (adaptado de (93))

A pirazinamida é também associada a outros mecanismos de ação, pela sua capacidade de bloquear alguns fatores de virulência do Mtb ou pela sua ligação à subunidade S1 ribossomal, codificada pelo gene *rpsA*, inibindo assim a tradução de proteínas. (74)

As resistências à pirazinamida estão fortemente associadas a mutações que ocorrem no gene *pncA*, que codifica a pirazinamidase, presentes em 72 a 99% (ca. 85%) das estirpes resistentes à pirazinamida. (74,94,95) Verificou-se ainda que mutações no terminal C da subunidade S1 ribossomal (oriunda da mutação no gene *rpsA*) resultam na diminuição da afinidade do ácido pirazinóico pela subunidade, tornando o fármaco inativo. (83,95)

A otimização dos fármacos da família da pirazinamida foca-se em 2 vertentes, uma incidindo na ativação do profármaco pela pirazinamidase e outra na interação do ácido resultante (substância ativa) com o alvo. A pirazinamida (Figura 2.6) apresenta os aspetos

essenciais para satisfazer ambas as condições. Para o desenho de outros candidatos a fármaco da família das pirazinamidas é possível considerar a troca do grupo pirazinoilo pelo grupo nicotinoilo, onde ocorre a troca do azoto pelo carbono, apesar do grupo pirazinoilo potenciar mais a atividade da molécula. Para além disso, o grupo amida pode ser trocado pelo grupo éster, uma vez que também é alvo da esterase bacteriana. Nenhum outro grupo substituinte adicional, na estrutura cíclica, revelou propiciar o aumento da atividade. (86)

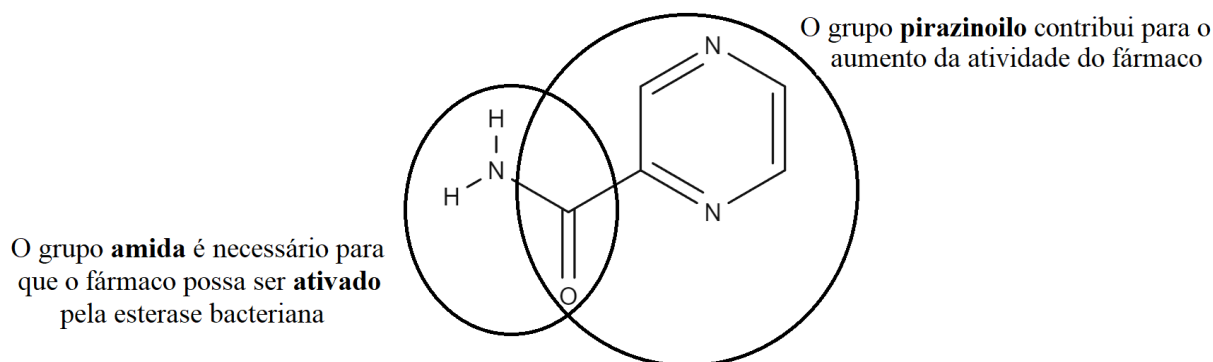


Figura 2.6 – Símula dos resultados dos estudos de SAR da pirazinamida (adaptado de (86))

2.1.4. Etambutol

O etambutol é prescrito no plano terapêutico da TB de 1ª linha com o principal objetivo de prevenir o desenvolvimento de resistências. (88) O mecanismo de ação do etambutol permanece sob investigação, todavia os dados existentes indicam que o fármaco atua como inibidor de arabinosil-transferases, enzimas de fase II codificadas pelo operão *embCAB* (*embC*, *embA* e *embB*) que desempenham um papel importante na síntese da parede celular do Mtb, nomeadamente na síntese do arabinogalactano. (96,97) O etambutol compete com o dissacárido D-arabinose (ou di-arabinose), substrato das subunidades EmbB e EmbC, comprometendo a capacidade do Mtb para construir a própria parede celular (Figura 2.7). (98)

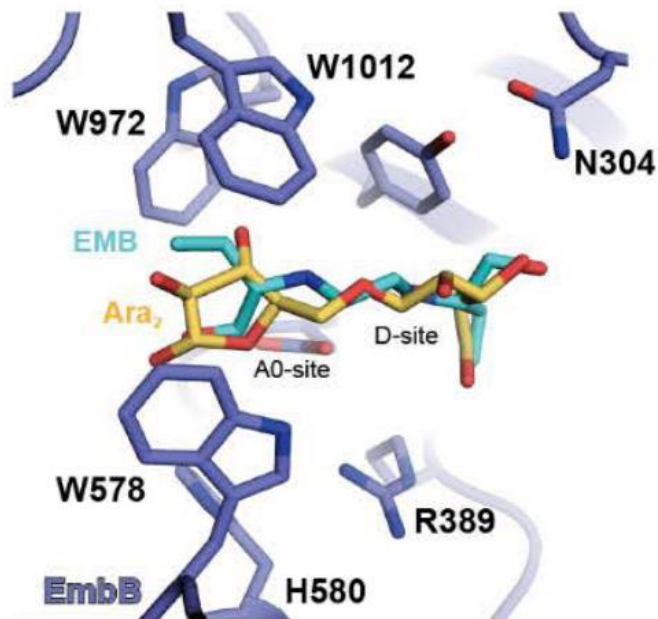


Figura 2.7 – Modelação da sobreposição do sítio ativo do etambutol (azul claro) com o dissacárido D-arabinose (amarelo), ambos ligados à subunidade EmbB. EMB = Etambutol, ARA2 = D-arabinose (adaptado de (98))

Ao contrário da isoniazida e da rifampicina, o etambutol exerce um efeito bacteriostático (capacidade de inibir ou interromper o crescimento bacteriano) sobre bactérias em fase estacionária, exercendo também um efeito bactericida sobre microrganismos em fase exponencial. (74)

O principal mecanismo de resistência ao etambutol envolve uma mutação no codão 306 do gene *embB*, detetado em cerca de 68% das estirpes resistentes ao etambutol. (96,97) Estudos recentes comprovam que certas estirpes resistentes ao etambutol apresentam mutações na região a montante do gene *embA*. (97) Foi também identificada uma mutação no gene *ubiA*, que sintetiza enzimas envolvidas na síntese da parede celular, que assume um papel importante na resistência ao etambutol quando associada com a mutação no gene *embB*. (74)

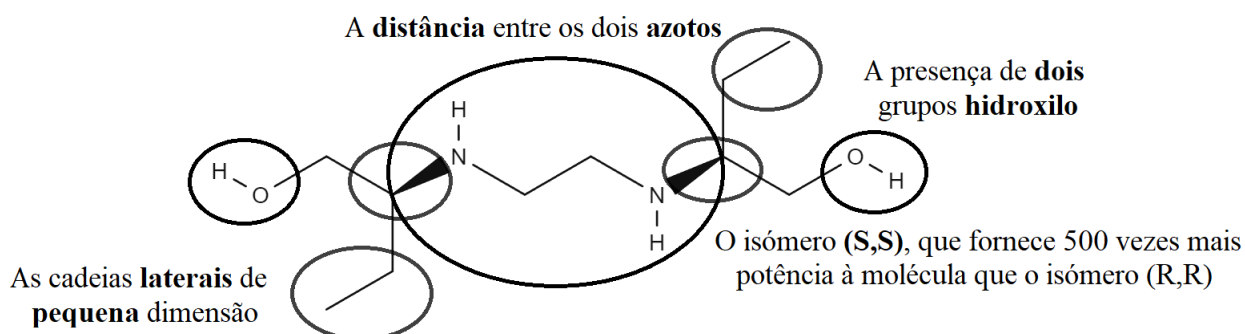
De modo a otimizar o fármaco, contribuindo para a redução da duração do tratamento da TB, vários análogos do etambutol foram desenhados com base no farmacóforo do mesmo. A Figura 2.8 apresenta uma representação da estrutura química do etambutol e os aspetos essenciais para a atividade farmacológica da molécula. (87)

Figura 2.8 – Símula dos resultados dos estudos de SAR do etambutol (adaptado de (87))

Dos compostos testados, o análogo mais promissor, SQ109, foi selecionado para desenvolvimento, encontrando-se nas fases II e III de ensaios clínicos. (87,99) A estrutura química de SQ109, bem como informação adicional sobre esta molécula, encontram-se disponíveis no capítulo 6.1 desta dissertação.

2.2. Quimioterapia de 2ª linha

Quando a estirpe de Mtb infetante demonstra resistência aos fármacos da terapêutica de 1ª linha recorre-se à quimioterapia de 2ª linha. (73) Esta é composta por vários outros fármacos, inexistentes no arsenal de 1ª linha, no entanto os fármacos de 1ª linha podem ser usados para o tratamento de TB resistente. (76)



Os fármacos de 2ª linha diferem dos da 1ª quanto à eficácia, segurança e disponibilidade. Podem apresentar menor eficácia (p.ex. o ácido para-aminosalicílico), maior taxa de incidência de efeitos adversos (p.ex. a cicloserina) e a sua comercialização está indisponível em vários países. (73)

As limitações ao uso de fármacos de 2ª linha que aparentam ser mais relevantes pelo impacto na diminuição da taxa de adesão são a manifestação de reações adversas graves e o desenvolvimento de resistências aos fármacos que eram inicialmente prescritos para ultrapassar dificuldades associadas a tratamento com fármacos de 1ª linha. Este aspeto acarreta efeitos negativos na saúde emocional e social, devido à doença prolongada, pobreza e isolamento social, o que pode conduzir a um estado depressivo, fragiliza a confiança nos profissionais de saúde e na política de saúde em geral e compromete a adesão à terapêutica, o que acaba por

propiciar a seleção para resistências, completando o círculo vicioso do desenvolvimento de resistências. (86,100)

O esquema terapêutico para TB resistente a fármacos, nomeadamente à rifampicina e à isoniazida, pode ser dividido em regime terapêutico de TB resistente curto ou prolongado. (101)

O regime de TB resistente curto consiste num curso de tratamento padronizado com duração de 9 a 12 meses (4 a 6 meses de fase intensiva e 5 meses de fase de continuação). Os primeiros 4 a 6 meses consistem na toma conjunta de canamicina, moxifloxacina, clofazimina, etionamida, pirazinamida, etambutol e isoniazida em doses elevadas, e nos 5 meses seguintes a terapêutica consiste na toma conjunta de moxifloxacina, clofazimina, pirazinamida, etambutol. (76,101)

Este regime é prescrito para pacientes que não foram tratados anteriormente por mais de 1 mês com medicamentos de 2ª linha usados no regime mais curto de TB resistente ou nos quais a resistência a fluoroquinolonas e fármacos injetáveis de 2ª linha foi excluída. (76)

A maior vantagem do regime curto consiste na menor duração do regime terapêutico e no custo reduzido do tratamento, que leva a maior adesão à terapêutica e a um retorno mais precoce do doente à vida social. Já a principal desvantagem do regime mais curto é a administração de um fármaco injetável, a canamicina, logo na 1ª abordagem. (76)

O regime terapêutico prolongado dura 18 meses ou mais e pode ser padronizado ou individualizado. Estes regimes são geralmente projetados para incluir um número mínimo de medicamentos de segunda linha para TB, considerados eficazes com base no histórico do paciente ou nos padrões de resistência aos medicamentos. Este regime é implementado quando foi revelada a falha/falta de resposta ao regime de terapêutica curto ou em caso de manifestação de intolerância a qualquer fármaco da 1ª linha de terapêutica. (76)

Em 2019, a OMS consolidou as orientações para o tratamento da TB resistente a fármacos. Assim, a segunda linha ficou subdividida em 3 grupos (76):

- **Grupo A:** fluoroquinolonas de administração oral (levofloxacina ou moxifloxacina), bedaquilina e linezolida; os três fármacos são considerados extremamente efetivos e a sua prescrição em conjunto é fortemente recomendada;
- **Grupo B:** clofazimina e cicloserina ou terizidona; a sua prescrição é recomendada como uma segunda opção, adicionando um ou ambos os fármacos ao plano terapêutico;

- **Grupo C:** etambutol, delamanida, pirazinamida, imipenem + cilastatina ou meropenem, ampicacina ou estreptomicina, etionamida ou protionamida e ácido para-aminosalicílico; para a prescrição de qualquer um dos fármacos deste grupo deve ser avaliado o benefício-risco em caso da impossibilidade de administração dos fármacos do grupo A e B.

A Quadro 2.2 apresenta as diferenças entre os grupos de fármacos para o tratamento prolongado de TB resistente definidos pela OMS em 2016 e os definidos em 2019.

Quadro 2.2 – Comparação entre a divisão dos fármacos utilizados para o tratamento prolongado da TB resistente, proposta pela OMS em 2016 e em 2019 (76,102)

2016		2019	
Grupo A Fluoroquinolonas		Levofloxacina	Grupo A Incluir os 3 fármacos
		Moxifloxacina	
		Gatifloxacina	
Grupo B Agentes injetáveis de 2ª linha		Amicacina	
		Capreomicina	
		Canamicina	
		(Estreptomicina)	
Grupo C Outros agentes nucleares de segunda linha		Etionamida/ Protionamida	Grupo C Adicionar para completar o regime terapêutico quando não há possibilidade de
		Cicloserina/ Terizidona	
		Linezolida	
		Clofazimina	
	D1		
		Etambutol	
		Isoniazida em altas doses	
		Etambutol	
		Delamanida	
		Pirazinamida	
		Imipenem + Cilastatina ou Meropenem	
		Amicacina (ou Estreptomicina)	

Grupo D Agentes adicionais	D2	Bedaquilina	uso dos fármacos do grupo A e B	Etionamida ou Protionamida
		Delamanida		Ácido para-aminosalicílico
	D3	Ácido para-aminosalicílico		[diagonal]
		Imipenem + cilastatina		
		Meropenem		
		Amoxicilina + Clavulanato		
		(Tioacetazona)		

Continuação do Quadro 2.2

Da análise da tabela conclui-se que nas orientações propostas pela OMS em 2019 não figuram nos grupos A, B e C alguns fármacos que haviam sido incluídos nas de 2016 (76), nomeadamente:

- Capreomicina e canamicina, dado que a sua efetividade não foi comprovada, pelo que a sua utilização no tratamento da TB resistente em regimes prolongados deixou de ser recomendada;
- Gatifloxacina, visto que foi revogada do mercado devido ao elevado risco de desenvolvimento de disglucémia;
- Tioacetazona, cuja formulação farmacêutica ainda não está desenvolvida para garantir a qualidade máxima e porque as últimas evidências não sustentaram a importância de o fármaco ser prescrito em regimes terapêuticos para o tratamento prolongado de TB resistente;
- Isoniazida em doses elevadas pode ser uma opção, em alguns indivíduos onde a suscetibilidade à isoniazida foi confirmada;
- Ácido clavulânico só deve ser prescrito como coadjuvante às carbapenemas (imipenem + cilastatina e meropenem).

Algumas recomendações devem ser tidas em conta na escolha dos fármacos para o tratamento prolongado (76):

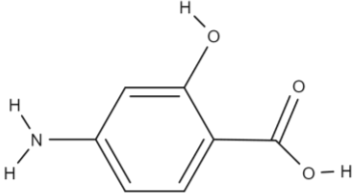
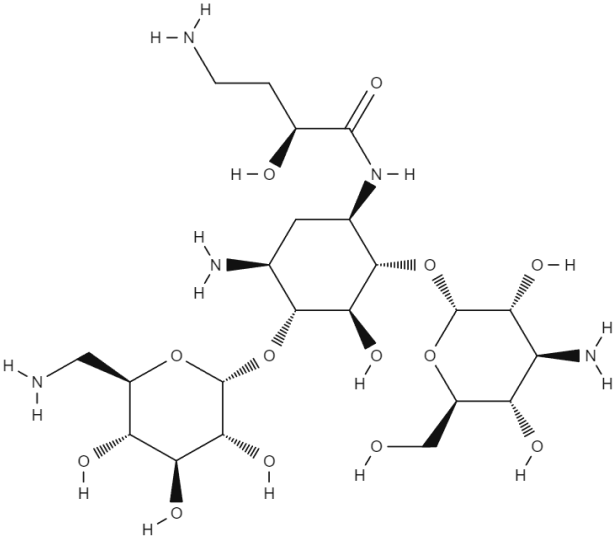
- Em pacientes com TB resistente à rifampicina e isoniazida, em regimes prolongados, os três fármacos do grupo A e pelo menos um fármaco do grupo B devem ser incluídos,

garantindo que o tratamento se inicia com pelo menos quatro fármacos antituberculosos com probabilidade de serem eficazes e que pelo menos três fármacos sejam incluídos para o tratamento restante, após a suspensão da bedaquilina;

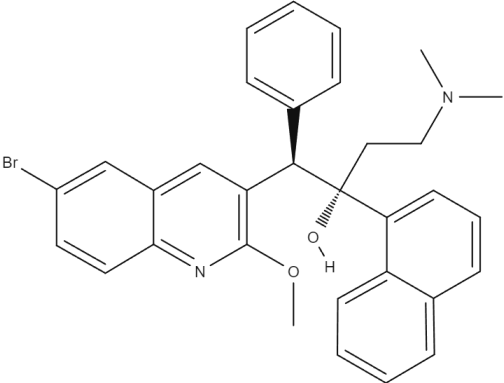
- Se apenas um ou dois fármacos do grupo A forem usados, ambos os agentes do grupo B devem ser incluídos;
- Se o esquema não puder ser composto apenas com fármacos dos grupos A e B, adicionam-se fármacos do grupo C para completá-lo;
- A canamicina, a capreomicina e o ácido clavulânico não devem ser incluídas no tratamento de pacientes com TB resistente em regimes prolongados;
- A levofloxacina ou a moxifloxacina e a linezolida devem ser incluídas no tratamento de pacientes com TB resistente em regimes prolongados;
- A bedaquilina deve ser incluída em regimes de TB resistente prolongados para pacientes de idade igual ou superior a 18 anos. Também pode ser incluída em regimes de TB resistente prolongados para pacientes de 6 a 17 anos.
- A clofazimina, a cicloserina ou terizidona, o etambutol, a pirazinamida e o imipenem + cilastatina ou o meropenem podem ser incluídos no tratamento de pacientes com TB resistente em regimes prolongados;
- A delamanida pode ser incluída no tratamento de pacientes com TB resistente, com 3 anos ou mais, em regimes prolongados;
- A amicacina pode ser incluída no tratamento de pacientes com TB resistente com idade igual ou superior a 18 anos em regimes prolongados quando a suscetibilidade for demonstrada e medidas adequadas para monitorizar o aparecimento de reações adversas puderem ser asseguradas. Se a amicacina não estiver disponível, a estreptomicina pode substituir a amicacina nas mesmas condições.
- A etionamida ou a protionamida e o ácido para-aminosalicílico podem ser incluídas no tratamento de pacientes com TB resistente em regimes prolongados somente se bedaquilina, linezolida, clofazimina ou delamanida não forem usados ou se não forem possíveis melhores opções para compor um regime.

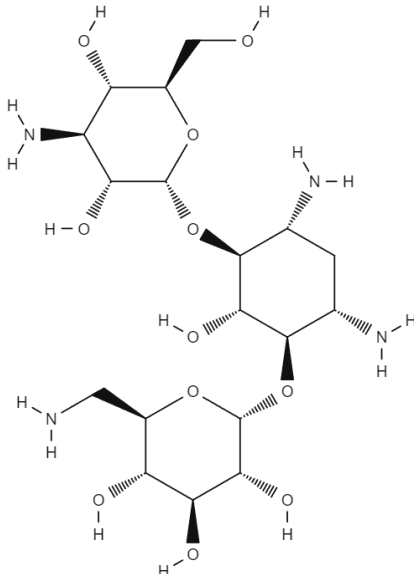
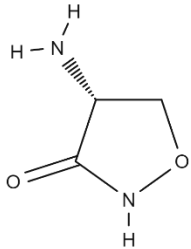
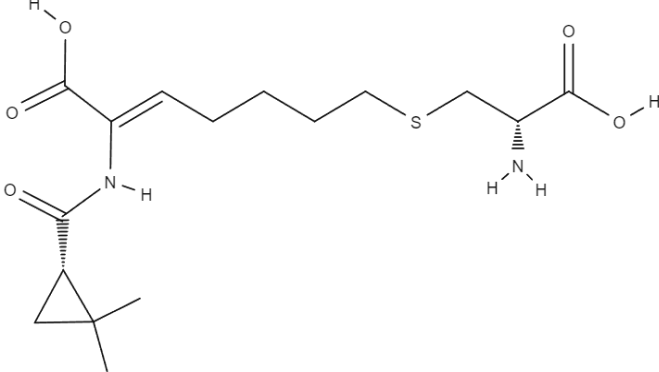
No Quadro 2.3 é apresentado um resumo sobre os fármacos da 2ª linha de terapêutica com indicação da classe química, da estrutura e do mecanismo de ação, organizados por ordem alfabética.

Quadro 2.3 - Fármacos usados na quimioterapia de 2ª linha para o tratamento da TB (73,76,77,103)

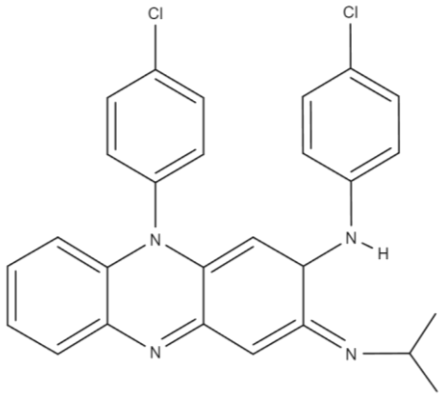
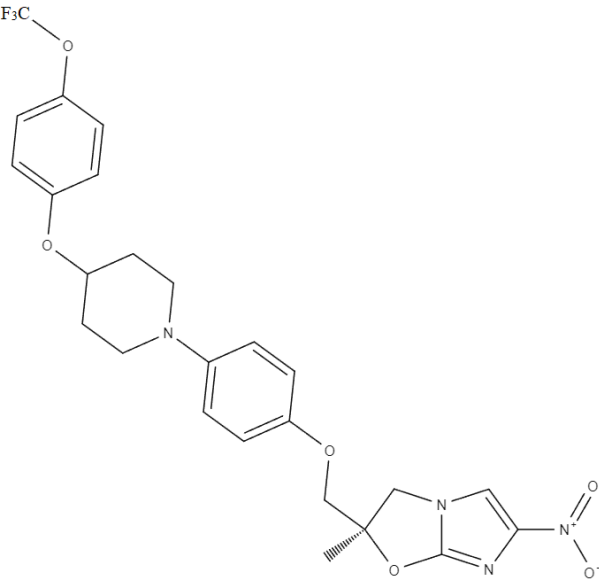
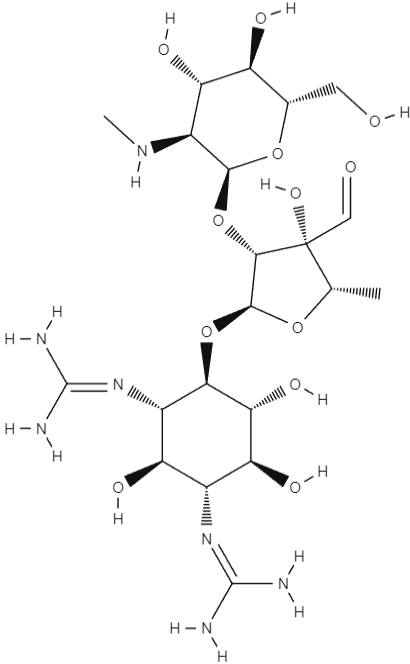
Fármaco	Classe Química	Estrutura	Mecanismo de ação
Ácido para-aminosalicílico	Aminofenol		Competição com ácido para-aminobenzóico pela dihidropteroato sintetase/inibição da síntese do ácido fólico
Amicacina	Aminoglicosídeo		Interação com a subunidade 16S ribossomal (da subunidade 30S), com subsequente inibição da síntese proteica (tradução)

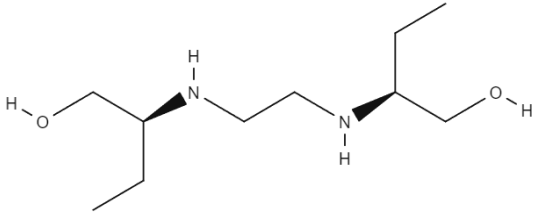
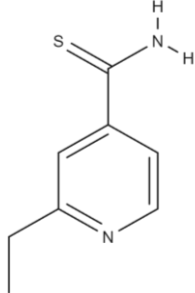
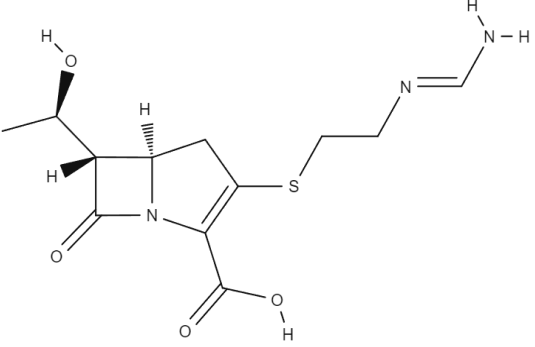
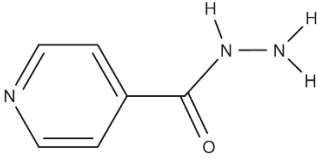
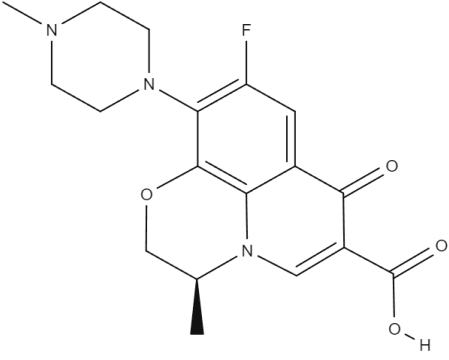
Continuação do Quadro 2.3

Bedaquilina	Diarilquinolina		Inibição específica da ATP sintetase micobacteriana
-------------	-----------------	--	---

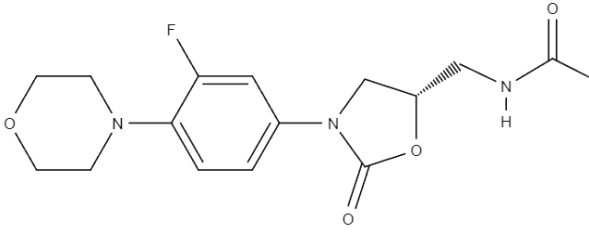
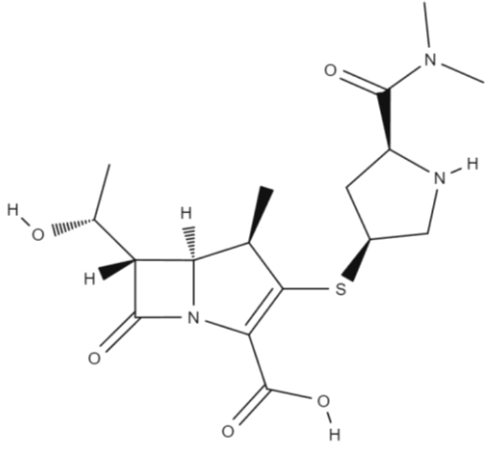
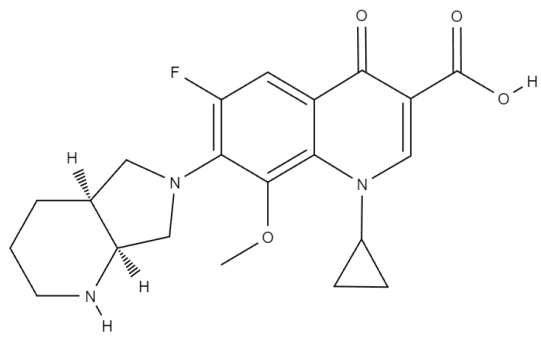
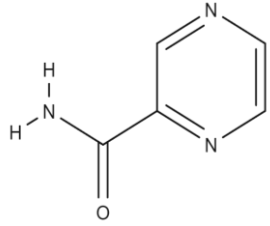
<p>Canamicina</p>	<p>Aminoglicosídeo</p>		<p>Interação com a subunidade 16S ribossomal (da subunidade 30S), com subsequente inibição da síntese proteica (tradução)</p>
<p>Cicloserina (Terizidona)</p>	<p>Análogo de D-Alanina</p>		<p>Inibição da síntese da parede celular, nomeadamente do peptidoglicano</p>
<p>Cilastatina</p>	<p>Inibidor da dehidropeptidase I</p>		<p>Inibição competitiva da dehidropeptidase I (enzima metabolizadora do imipenem)</p>

Continuação do Quadro 2.3

<p>Clofazimina</p>	<p>Rimifenzazina</p>		<p>Interação com o ADN da micobactéria, com subsequente interrupção do ciclo celular</p>
<p>Delamanida</p>	<p>Nitroimidazol</p>		<p>Inibição da síntese do ácido micólico</p>
<p>Estreptomicina</p>	<p>Aminoglicosídeo</p>		<p>Interação com a subunidade 16S ribossomal (da subunidade 30S), com subsequente inibição da síntese proteica (tradução)</p>

Etambutol*	Etilenodiamina		Inibição das arabinosil-transferases, com subsequente inibição da síntese da parede celular, nomeadamente da síntese do arabinogalactano.
Etionamida (Protionamida)	Tioamida		Ligação à enoil-ACP redutase, com subsequente inibição da síntese de ácido micólico
Imipenem	Carbapenem		Ligação às proteínas de ligação à penicilina, com posterior inibição da síntese da parede celular
Isoniazida* (em altas doses)	Ácido isonicotínico		Interação com enoil-ACP redutases, com subsequente inibição da síntese de ácido micólico
Levofloxacina	Fluoroquinolona		Interação com ADN girase (topoisomerase II), com subsequente inibição da replicação e transcrição de ADN

Continuação do Quadro 2.3

<p>Linezolid</p>	<p>Oxazolidinona</p>		<p>Interação com o local 23S da subunidade ribossomal 50S, com subsequente inibição da formação de um complexo de iniciação funcional 70S e inibição da síntese proteica (tradução)</p>
<p>Meropenem</p>	<p>Carbapenem</p>		<p>Ligação às proteínas de ligação à penicilina, com posterior inibição da síntese da parede celular</p>
<p>Moxifloxacina</p>	<p>Fluoroquinolona</p>		<p>Interação com ADN girase (topoisomerase II), com subsequente inibição da replicação e transcrição de ADN</p>
<p>Pirazinamida*</p>	<p>Pirazina</p>		<p>Diminuição do pH; Modificação do potencial de membrana; Inibição da proteína ribossomal S1, com subsequente inibição da síntese proteica (tradução); Inibição da síntese da coenzima A</p>

*- fármacos geralmente prescritos na quimioterapia de 1ª linha, no entanto, podem ser prescritos no regime terapêutico para TB resistente (2ª linha) caso a estirpe seja suscetível aos fármacos selecionados

Cada um dos fármacos da 2ª linha de terapêutica abordados é incluído no regime curto e/ou prolongado (76):

- Regime curto: Canamicina, Isoniazida,
- Regime curto e prolongado: Clofazimina, Etambutol, Etionamida (Protionamida), Moxifloxacina, Pirazinamida
- Regime prolongado: Ácido para-aminosalicílico, Amicacina, Bedaquilina, Cicloserina (Terizidona), Cilastatina, Delamanida, Estreptomicina, Imipenem, Levofloxacina, Linezolida, Meropenem,

2.2.1. Ácido para-aminosalicílico

O incremento da taxa de desenvolvimento de resistências aos fármacos de 1ª linha serviu de estímulo para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos - processo que atualmente apresenta progressos notáveis. Contudo, o desenvolvimento de novos fármacos é um processo caro e longo, pelo que o interesse em “reutilizar” ou “redirecionar” substâncias ativas mais antiga mas já licenciadas para o tratamento de patologias humanas é crescente, sendo o ácido para-aminosalicílico um exemplo. (104)

O ácido para-aminosalicílico é um fármaco antituberculoso cuja eficácia no tratamento da TB foi descoberta em 1944. (14) Atua como bacteriostático, uma vez que é um análogo estrutural do ácido para-aminobenzóico e interrompe o metabolismo do ácido fólico bacteriano através da ligação competitiva com a dihidrofolato redutase, inibindo assim o crescimento do bacilo da TB (Figura 2.9). (105)

Apesar de apresentar elevada eficácia contra Mtb nos ensaios clínicos, o ácido para-aminosalicílico foi substituído pelo etambutol (fármaco de 1ª linha) devido aos distúrbios gastrointestinais associados à sua toma, pelo que se encontra atualmente na lista dos fármacos antituberculosos de 2ª linha. (104,106)

Para além das reações adversas, o surgimento de estirpes resistentes ao ácido para-aminosalicílico é mais uma ameaça para um tratamento eficaz da TB resistente aos fármacos de 2ª linha. Foram identificadas estirpes com mutações no gene *thyA*, que codifica a timidilato sintetase, resistentes ao ácido para-aminosalicílico. (105,106)

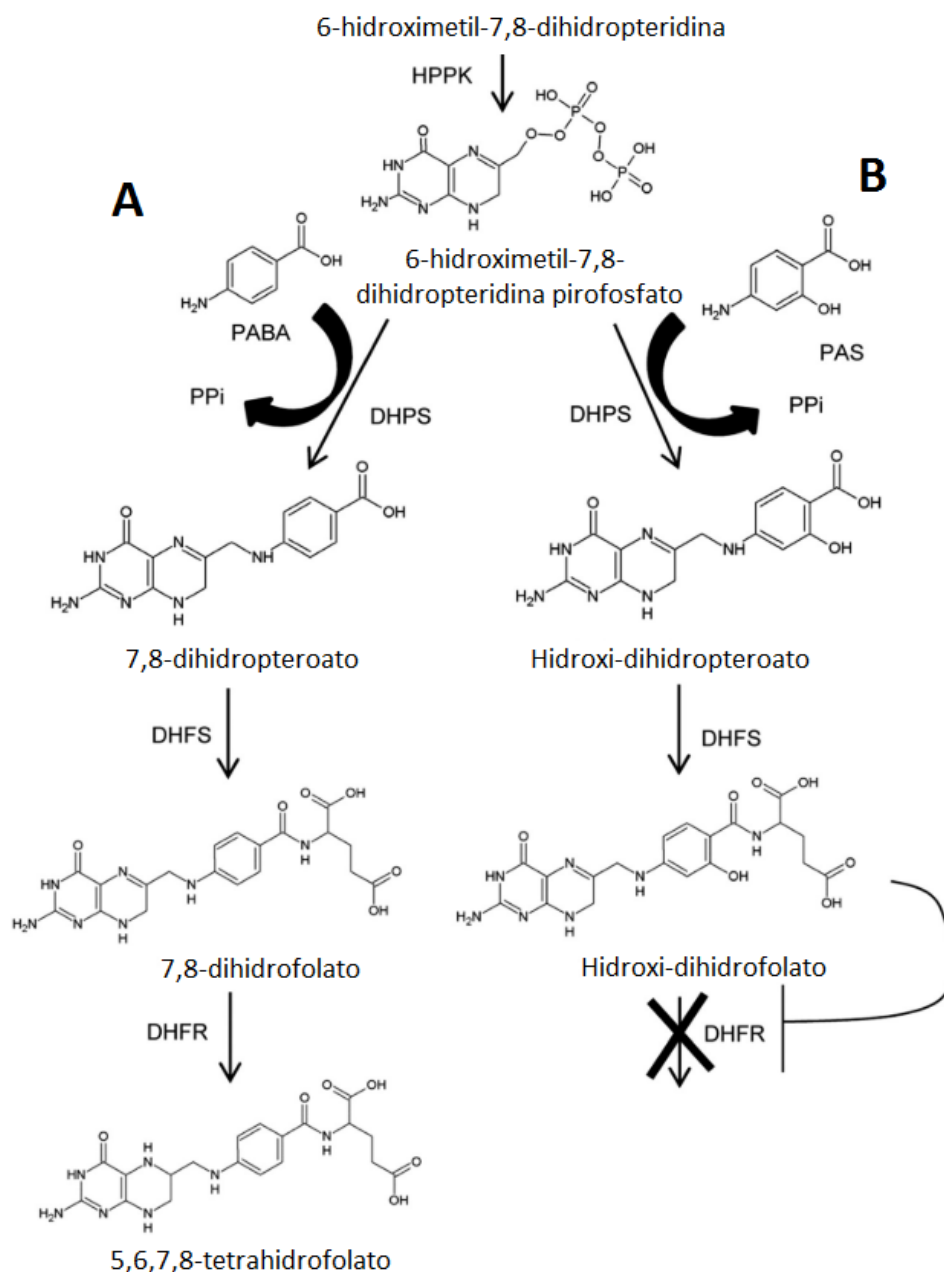


Figura 2.9 - Representação esquemática de: (A) Metabolismo do ácido fólico pela Mtb; (B) Inibição do metabolismo do ácido fólico pela administração de ácido para-aminosalicílico. HPPK = 6-hidroximetil-7,8-Dihidropteridina Pirofosfoquinase, PABA = Ácido Para-Aminobezóico, PAS = Ácido Para-Aminosalicílico, PPi = Pirofosfato, DHPS = Dihidropteroato Sintetase, DHFS = Dihidrofolato Sintetase, DHFR = Dihidrofolato Redutase (adaptado de (105))

O ácido para-aminosalicílico inibe a dihidrofolato redutase, resultando na redução da produção de tetrahidrofolato. Como a timidilato sintetase é um metabolizador de folatos reduzidos, é provável que mutações em *thyA* causem uma diminuição da taxa de metabolização dos derivados de tetrahidrofolato. Assim, mais folatos reduzidos ficam disponíveis para outras reações essenciais de adição de um carbono, levando ao aumento da sobrevivência bacteriana. Além disso, também foram identificadas estirpes com mutações no gene *ribD*, que codifica a proteína necessária para o metabolismo da riboflavina (vitamina B2) RibD que atua como

análogo da dihidrofolato redutase. É uma mutação que corresponde ao aumento de expressão da proteína RibD, como compensação da inibição da dihidrofolato redutase pelo ácido para-aminosalicílico. (105,106)

De modo a aumentar a eficácia e a segurança da terapêutica contra o Mtb, foram desenhados novos derivados do ácido para-aminosalicílico, inspirados no farmacóforo que constitui a base para a atividade da molécula. Na Figura 2.10 são destacadas as características do ácido para-aminosalicílico tidas como importantes para a atividade farmacológica.

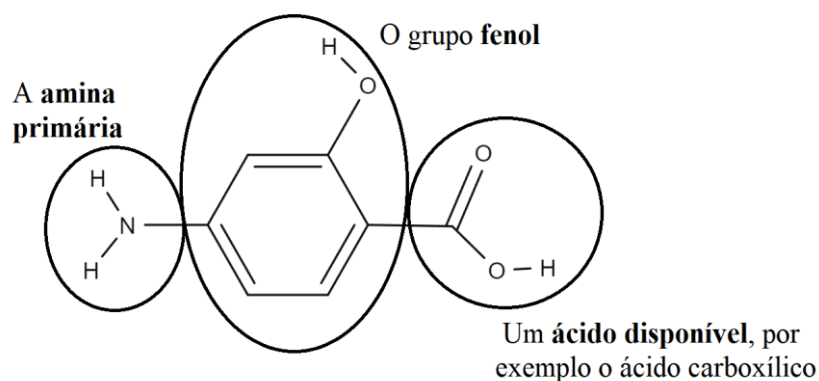


Figura 2.10 – Símula dos resultados dos estudos de SAR do ácido para-aminosalicílico (adaptado de (107))

2.2.2. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos, como a amicacina, a estreptomicina e a canamicina, são transportados para o interior da célula contra o gradiente de concentração, onde desempenham a sua função bactericida pela alteração da configuração da subunidade 16S ribossomal (da subunidade 30S), bloqueando assim a produção de proteínas bacterianas, ou seja, o processo de tradução. (83,86)

Os aminoglicosídeos não são oralmente biodisponíveis e apresentam atividade intracelular limitada. Além disso, o seu uso é limitado no tratamento da TB também devido às reações adversas que apresentam, como nefrotoxicidade (degradação da função renal) e ototoxicidade (perda da função auditiva) que prejudicam a adesão à terapêutica bem como o bem-estar físico e psicológico dos doentes. (86,108) A estreptomicina é o aminoglicosídeo menos nefrotóxico, porém apresenta elevada ototoxicidade. (86) Caso estas sequelas se manifestem no doente será necessário substituir estes fármacos injetáveis do grupo C por outro. (77)

O desenvolvimento de resistências às fluoroquinolonas parece estar associado a mutações do gene *eis*, codificador da enzima Eis que é a acetiltransferase, uma proteína

intracelular relacionada à sobrevivência (do inglês, *enhanced intracellular survival*). São conhecidas mutações na região promotora do gene e na região 5'UTR do gene *whiB7* (mutação Rv3197A), que codifica o ativador transcricional da enzima Eis, responsáveis pela sobreexpressão da enzima que promove a acetilação e inativação dos aminoglicosídeos, diminuindo a concentração plasmática do fármaco e comprometendo a sua eficácia, bem como aumentando a taxa de desenvolvimento de resistências. (109–111) Também existem evidências de que mutações no gene *rrs*, codificador da subunidade 16S ribossomal, como as mutações A1401G, C1409A, G1484T e G1491U, poderão estar associadas ao desenvolvimento de resistências aos aminoglicosídeos. (111,112)

Cada aminoglicosídeo parece ter um sítio de ligação e um mecanismo de ação específico, pelo que ainda não foi possível desenvolver um estudo SAR generalizado. Sabe-se que, de entre os aminoglicosídeos, a amicacina é ligeiramente mais potente contra Mtb do que a estreptomicina e a canamicina. (86) O farmacóforo dos aminoglicosídeos é o 1,3-diaminoinositol, destacado na Figura 2.11. que se liga a outros açúcares através de ligações glicosídicas. (113)

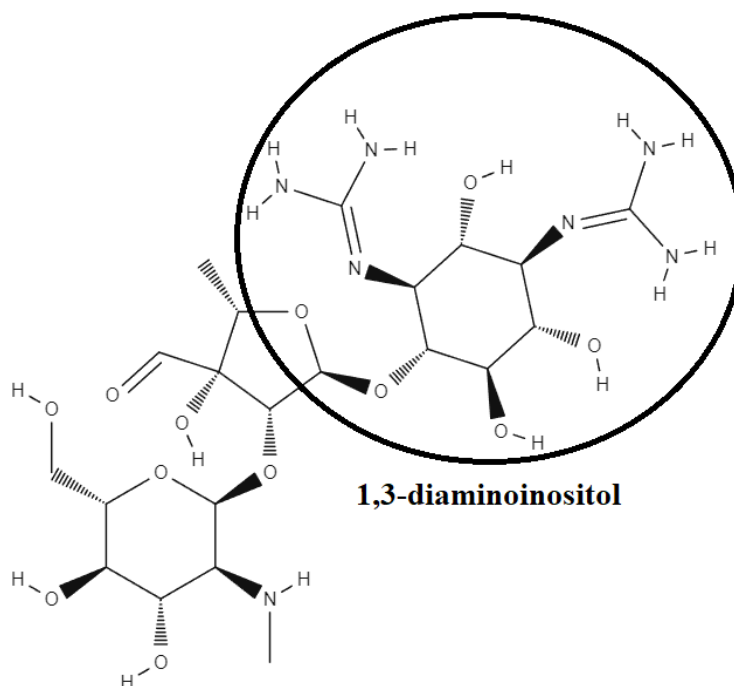


Figura 2.11 - Localização do 1,3-diaminoinositol na molécula de estreptomicina

2.2.3. Bedaquilina

A bedaquilina, ou TMC207, exibe atividade bactericida, atuando contra Mtb em estado ativo e em estado latente. (77,103) É um fármaco que promove a inibição da produção de

trifosfato de adenosina (ATP) ao interferir com a atividade da enzima F-ATP sintetase, ou ATP sintetase mitocondrial. (114)

Durante a síntese de ATP, a força motriz dos prótons impulsiona a rotação do anel c (c_9) através do fluxo de prótons, devido ao gradiente de pH transmembranar entre a subunidade α e o anel c. O sinal da rotação é transmitido pelas subunidades γ e ϵ para a componente $\alpha_3\beta_3$, onde há produção de ATP. A bedaquilina atua, de forma indireta, como antitransportador H^+/K^+ , bloqueando o transporte de elétrons visto que o gradiente de pH transmembranar é bloqueado (Figura 2.12 A). Também atua de forma direta ao ligar-se ao anel c e inibindo a sua rotação (Figura 2.12 B), bem como por ligação à subunidade ϵ , bloqueando a interação entre as subunidades da F-ATP sintetase (Figura 2.12 C). (114)

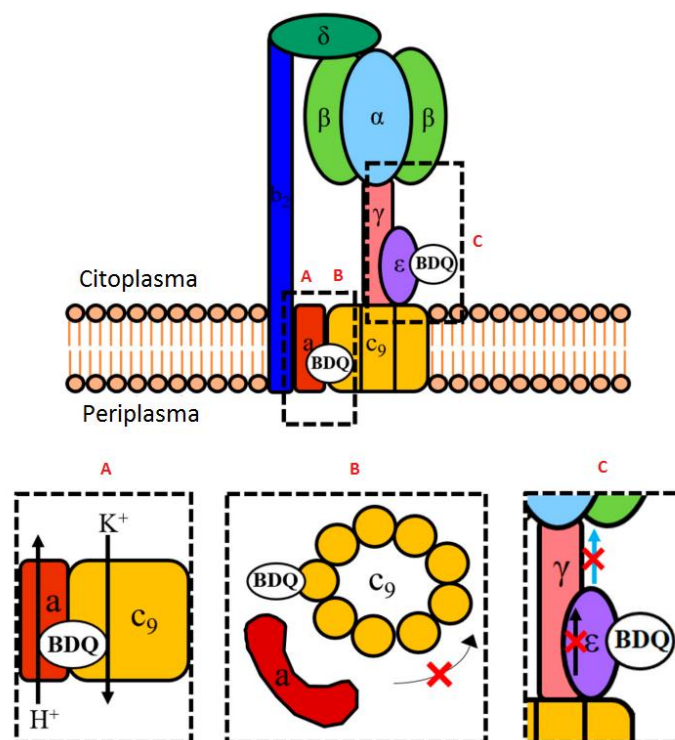


Figura 2.12 - Mecanismo de ação da bedaquilina por ação indireta: (A) inibição do transporte de elétrons; e por ação direta: (B) inibição da rotação do anel (c_9) e (C) ligação à subunidade ϵ com subsequente inibição da transmissão do sinal. BDQ = Bedaquilina (adaptado de (114))

A principal limitação da bedaquilina no tratamento de doentes com TB é a manifestação de efeitos adversos, como náuseas e hepatite, no entanto a principal preocupação é a cardiotoxicidade do fármaco. A bedaquilina demonstrou prolongar o intervalo QT, e a associação com outros fármacos (como clofazimina ou moxifloxacina) pode aumentar esse efeito, provocando eventos cardíacos graves ou arritmias. Este efeito advém principalmente do

facto de a bedaquilina apresentar um longo tempo de semivida, contribuindo para a acumulação do fármaco no organismo e subsequente cardiotoxicidade. (101,115)

Algumas estirpes resistentes à clofazimina com resistência cruzada à bedaquilina demonstraram mutações no regulador transcripcional Rv0678, cuja função principal é controlar a expressão dos genes *mmpS5* e *mmpL5*, que codificam bombas de efluxo MmpS5 e MmpL5, respetivamente. Essas mutações conduzem à sobreexpressão da bomba de efluxo MmpS5 e MmpL5, o que causa a diminuição da concentração citoplasmática do fármaco e o aumento da taxa de falha de terapêutica e de desenvolvimento de resistências. (116–118) Foram estudadas outras mutações que podem contribuir para o desenvolvimento de resistências à bedaquilina, como as mutações no gene *pepQ* (Rv2535), que permanecem em estudo, e as mutações A63P e I66M no gene *atpE*, que codifica a proteína transmembranar da F-ATP sintase (alvo terapêutico da bedaquilina). Estas últimas aparentam estar envolvidas na prevenção da ligação da bedaquilina à subunidade c, conservando a transferência de prótons e a produção de ATP. (119)

Na Figura 2.13 encontra-se representado o resumo dos estudos de SAR da bedaquilina, realçando os aspetos importantes para a atividade, nomeadamente farmacocinética e farmacodinâmica, considerados durante o seu desenvolvimento, e que também devem ser tidas em conta no desenho de outras candidatas a fármacos, derivadas da bedaquilina. (120)

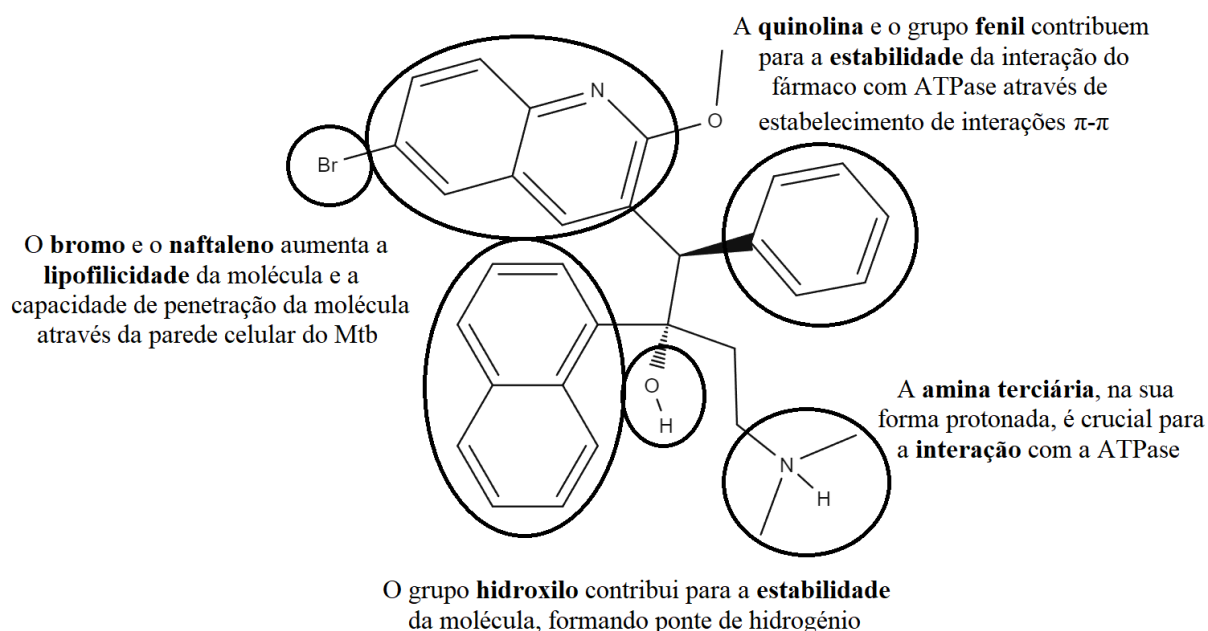


Figura 2.13 – Súmula dos resultados dos estudos de SAR da bedaquilina. Mtb = *Mycobacterium tuberculosis*, ATPase = Adenosinatrifosfatase (adaptado (120))

2.2.4. Carbapenemas

As carbapenemas são membros potentes da família dos antibióticos β -lactâmicos, pelo que o anel β -lactâmico é o constituinte principal do farmacóforo da molécula (Figura 2.14). O mecanismo de ação requer a penetração na parede celular bacteriana e subsequente ligação a enzimas conhecidas como proteínas de ligação à penicilina, da classe de transpeptidases, prevenindo assim a transpeptidação, um processo importante que garante a integridade da parede celular bacteriana. A inibição da biosíntese do peptidoglicano resulta em lise celular e morte celular, pelo que as carbapenemas são classificadas como bactericidas. (121,122)

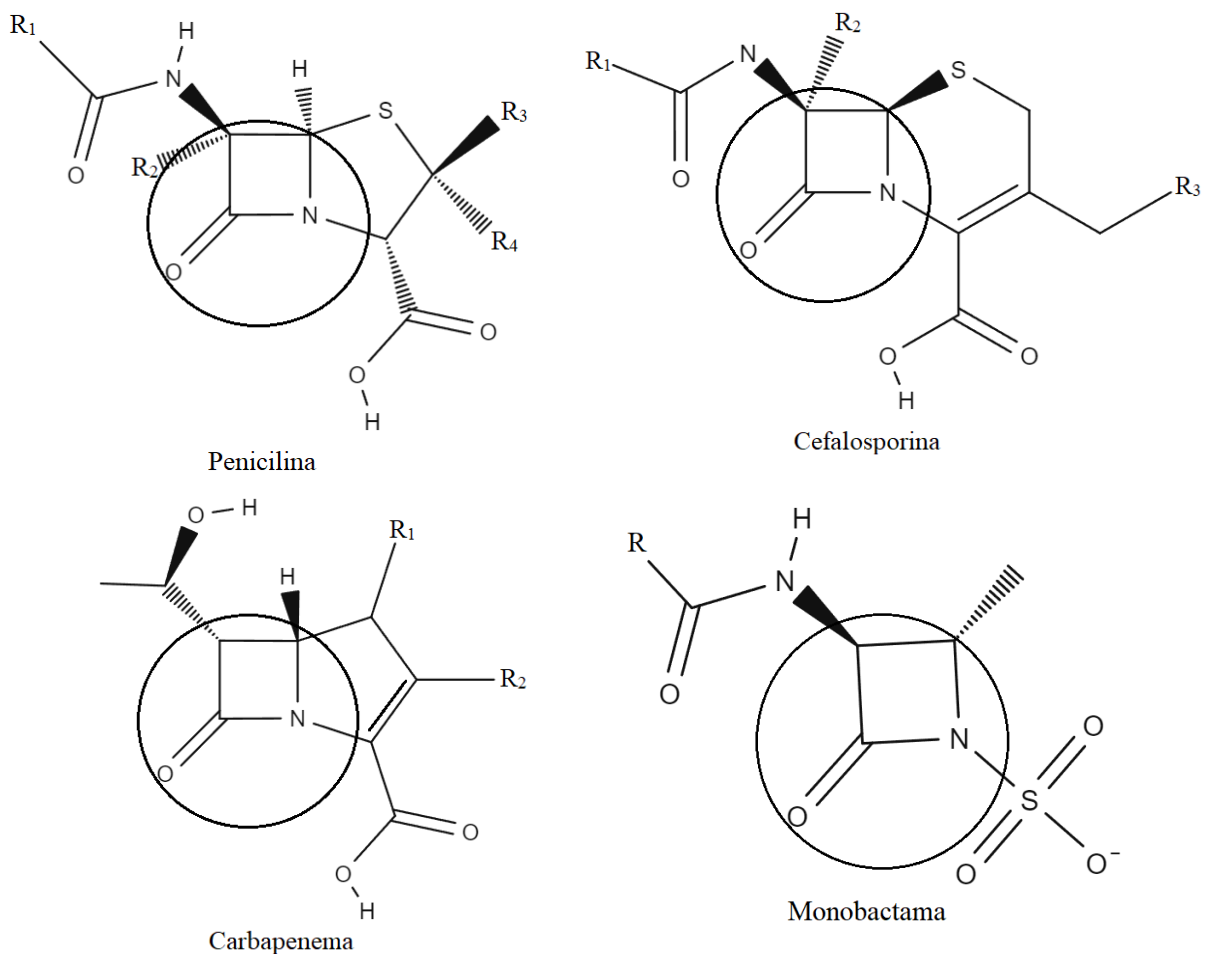


Figura 2.14 - Esquema de identificação dos anéis β -lactâmicos, assinalados pelos círculos na representação da estrutura geral das várias classes dos antibióticos β -lactâmicos (adaptado de (123))

A membrana externa das bactérias Gram-negativas apresenta uma permeabilidade limitada a carbapenemas. Por esta razão, a internalização de fármacos desta classe depende da presença de porinas da proteína de membrana externa, como o canal OprD, para facilitar a sua entrada para o interior das bactérias. (121)

Quanto aos efeitos indesejados derivados da administração de carbapenemas, os mais comuns são dor abdominal, náusea e vômito. O imipenem apresenta o maior risco de convulsões e sua nefrotoxicidade está associada à sua administração sem cilastatina, devido ao metabolismo renal do composto. (121)

As carbapenemas são administradas em concomitância com inibidores das enzimas que os metabolizam e degradam, de modo a prevenir a inibição/destruição da substância ativa e atingir maiores taxas de sucesso terapêutico. Assim sendo, o imipenem é administrado em concomitância com a cilastatina que atua por inibição competitiva da dehidropeptidase I. A administração concomitante de meropenem ou de imipenem/cilastatina com ácido clavulânico (inibidor de beta-lactamases) também aumenta as taxas de sucesso terapêutico. (77,124)

Um dos mecanismos de resistência às carbapenemas desenvolvido por estirpes de *Mtb* envolve um aumento da produção de plasmídeo AmpCs e outras β -lactamases de amplo espectro, tornando as bactérias Gram-negativas insuscetíveis aos agentes carbapenêmicos. A perda de porina OprD foi descrita como outro mecanismo de resistência comum às carbapenemas, impedindo a entrada dos fármacos. (122)

Importa realçar que o tratamento com carbapenem é evitado em pacientes que já demonstraram reações alérgicas a antibióticos β -lactâmicos. (121)

2.2.5. Cicloserina/Terizidona

A cicloserina, bem como o seu análogo estrutural, a terizidona, que é posteriormente hidrolisada em duas moléculas de cicloserina, são análogos do aminoácido D-alanina (Figura 2.15). (125,126) A cicloserina atua como bacteriostático, por inibição competitiva de duas enzimas da biossíntese de peptidoglicano da parede celular do *Mtb*: alanina racemase (codificada pelo gene *alr*), que forma a D-alanina a partir de L-alanina, e D-alanina-D-alanina ligase (codificada pelo gene *ddlA*) que incorpora a D-alanina no pentapeptídeo necessário para a formação de peptidoglicano e a síntese da parede celular bacteriana. (127)

A cicloserina e a terizidona são fármacos que apresentam uma boa capacidade de penetração através da barreira hematoencefálica (BHE) no líquido cefalorraquidiano e SNC, pelo que geralmente são prescritas no tratamento de meningite tuberculosa. A utilização deste fármaco é rigorosamente avaliada, uma vez que, ao penetrar facilmente através da BHE, apresenta toxicidade neuropsiquiátrica, podendo conduzir a psicose, convulsões, dores de

cabeça, depressão e distúrbios mentais, o que compromete a adesão ao tratamento e a prevenção da resistência aos medicamentos. (125,128)

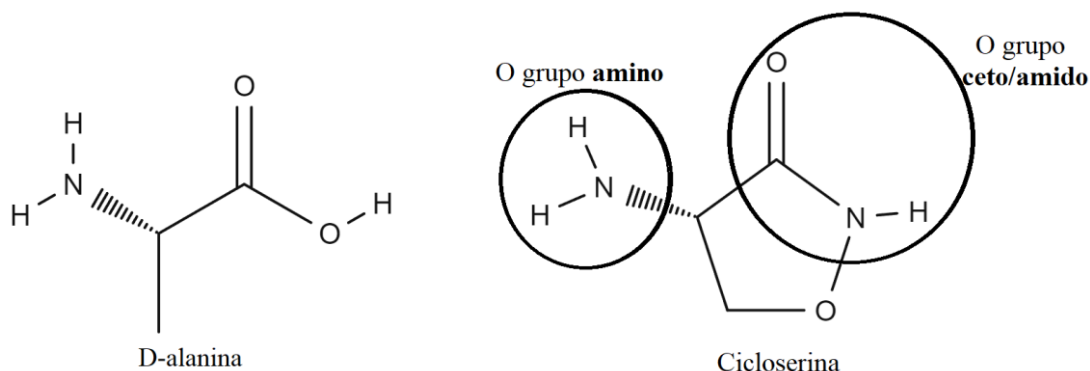


Figura 2.15 – Representação das estruturas da D-alanina e cicloserina, com os elementos estruturais essenciais para a atividade da molécula assinalados pelos círculos (adaptado de (86,129)

Foi comprovado não haver diferença entre o nível de neurotoxicidade resultante da administração de cicloserina ou da terizidona. (126) Estes efeitos adversos afetam entre 10% e 50% dos pacientes, sendo necessários estudos para estabelecer a dose correta para o tratamento de meningite tuberculosa, de modo que a dose do fármaco permita atingir concentrações plasmáticas entre a concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração tóxica mínima. (125,126) A neurotoxicidade destes fármacos é explicada pelo antagonismo de piridoxina (vitamina B6) pela cicloserina e pelo aumento da eliminação renal de piridoxina. (126) De modo a compensar a falta de piridoxina e minimizar a toxicidade do fármaco, geralmente prescreve-se a suplementação com 50 mg de vitamina B6 por cada 250 mg de cicloserina, devido às suas propriedades neuroprotetoras. (125,126)

Por outro lado, o uso de cicloserina no tratamento de TB pulmonar é limitado devido à baixa capacidade de penetração nos tubérculos e à baixa capacidade de eliminação do Mtb intracelular, que constitui cerca de 20% de todas as micobactérias nos tubérculos. (125)

A maior limitação do uso da cicloserina no tratamento da TB é de facto a elevada taxa de manifestação de eventos adversos a nível do SNC, porque ao inibir dois alvos essenciais para a biossíntese da parede celular, a taxa de desenvolvimento de estirpes resistentes à cicloserina é baixa. No entanto, foram identificadas estirpes que apresentavam sobreexpressão de alanina racemase e D-alanina-D-alanina ligase como mecanismo de compensação. Outras estirpes identificadas apresentam mutação pontual no gene *cycA*, que codifica o transportador da cicloserina, comprometendo a sua entrada na micobactéria enquanto outras estirpes apresentaram mutações no gene *alr* (p.ex. a mutação D322'N) que reduz a afinidade de alanina racemase por cicloserina em mais de 240 vezes. (127)

2.2.6. Clofazimina

A clofazimina é um derivado de rimifenazina com propriedades bactericidas, atuando na membrana externa da micobactéria. Foi descrita pela primeira vez em 1957 e declarada como fármaco ineficaz no tratamento da TB em 1981. Todavia, no mesmo ano a OMS classificou a clofazimina como fármaco recomendado para o tratamento de doentes com lepra, em combinação com rifampicina e dapsona (ou diaminodifenil sulfona). O interesse pelas suas propriedades antibacterianas foi ignorado devido ao insucesso terapêutico observado quando administrada em monoterapia, no entanto esse interesse voltou quando foi demonstrado o seu potencial na redução da duração do tratamento, quando em co-administração com outros fármacos em dosagens elevadas, como as fluoroquinolonas. (130,131)

As rimifenazinas são compostos auto-oxidáveis, atuando como aceitadores de eletrões. A clofazimina apresenta elevada lipofilicidade, o que permite a acumulação da molécula nos macrófagos, e elevado potencial redox, características que justificam o mecanismo de ação sugerido para a molécula. (130,131)

O mecanismo de ação da clofazimina contra a micobactéria parece envolver a ligação do fármaco ao ADN micobacteriano, principalmente às sequências contendo guanina, o que conduz a uma ligação preferencial ao ADN de micobactérias, por este conter uma proporção relativamente maior de guanina e citosina, quando comparada ao ADN humano. (132)

O efeito bactericida da clofazimina também pode resultar da oxidação espontânea, não enzimática, da forma reduzida da clofazimina, o que leva à formação de radicais de oxigénio. A forma reduzida da clofazimina é produzida pela NADH desidrogenase do tipo II, a partir da clofazimina na forma oxidada. Assim, o sistema respiratório oxida a clofazimina em vez de NADH, diminuindo a concentração do oxigénio disponível para o Mtb. (130) O mecanismo de ação do fármaco encontra-se representado na Figura 2.16

A clofazimina também aumenta o efeito da fosfolipase A2 bacteriana, produzindo lisofosfolípidos como produtos da hidrólise enzimática que são tóxicos para o Mtb. (130)

À semelhança da bedaquilina, os mecanismos de resistência à clofazimina são devidos principalmente a mutações no regulador transcripcional Rv0678, com regulação positiva concomitante da bomba de efluxo, MmpL5, e ocasionalmente no gene *pepQ* (RV2535). (118)

A maior limitação do uso da clofazimina no tratamento de TB resistente é o facto de se tratar de um fármaco que atualizou a lista dos medicamentos de 2ª linha há relativamente pouco

tempo, pelo que as informações quanto à sua eficácia, tolerabilidade e segurança são escassas. Contudo, estudos comprovaram que se trata de um fármaco eficaz no tratamento de TB resistente, bem tolerado e a maioria das reações adversas, como prolongamento do intervalo QT, arritmias, descoloração epitelial e enterocolite por *Clostridium difficile*, são devidas à toma concomitante de outros fármacos antituberculosos. (118,133)

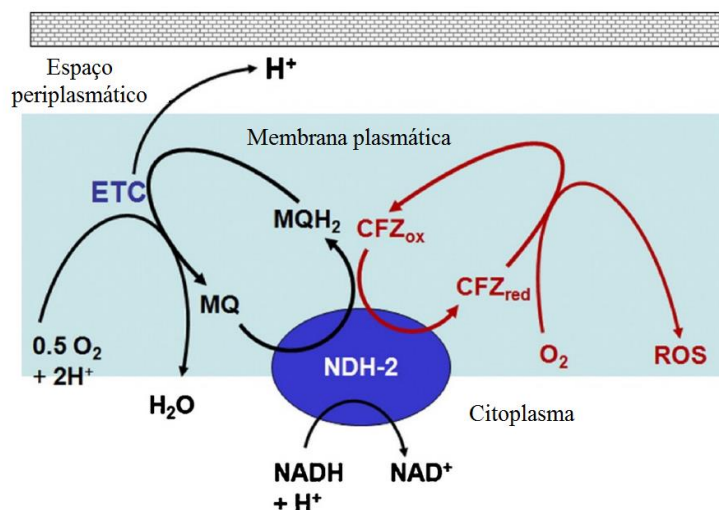


Figura 2.16 – Representação do mecanismo de ação da clofazimina. ETC = Cadeia Transportadora de Elétrões, MQ = Menaquinona, CFZ = Clofazimina, ROS = Espécies Reativas de Oxigênio, NAD⁺ e NADH = Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (adaptado de (130))

De modo a ultrapassar algumas das limitações da clofazimina, como o seu acúmulo nos tecidos adiposos, tempo de semi-vida longo e descoloração da pele atribuída à alta lipofilicidade da molécula (logP = 5,39), várias moléculas são atualmente desenhadas com base no SAR da clofazimina (Figura 2.17). (134)

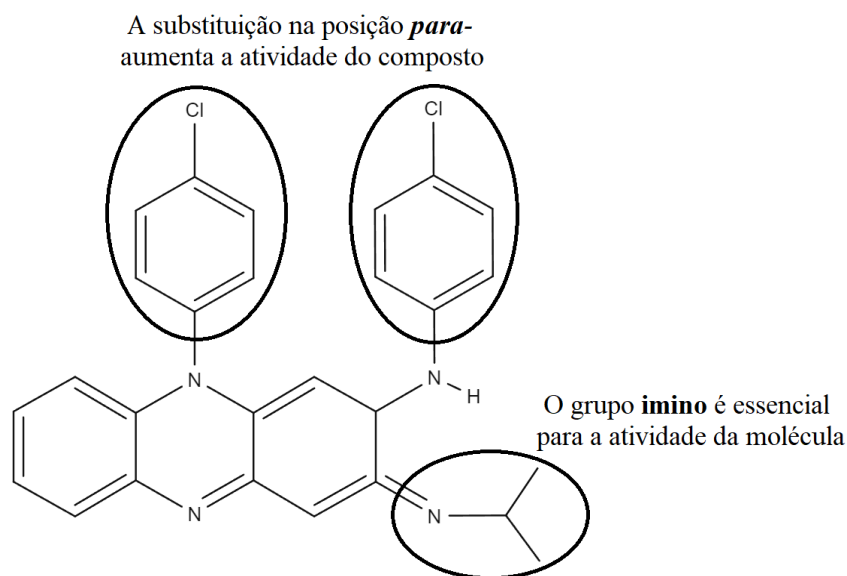


Figura 2.17 – Súmula dos resultados dos estudos de SAR da clofazimina (adaptado de (134))

2.2.7. Delamanida

A delamanida é um profármaco que é ativado através do sistema F420 da micobactéria. Este sistema é composto por duas enzimas, a nitroreductase dependente de deazaflavina e a glicose-6 fosfato desidrogenase dependente de F420, além de mais quatro coenzimas (FbiA, FbiB, FbiC e Rv0132c), que estão envolvidos na síntese e reciclagem do cofator F-420. (135) A enzima nitroreductase dependente de deazaflavina é a responsável pela conversão da delamanida num fármaco intermediário ativo que consiste na forma reduzida da delamanida, nomeadamente com anião no átomo de azoto. Esse processo é desencadeado pela oxidação da cauda da nitroreductase dependente de deazaflavina, composta por vários ácidos glutâmicos. (136)

Este composto apresenta propriedades bactericidas e esterilizantes contra o Mtb. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese de duas classes de ácidos micólicos: metoximicolatos e metoxi ceto-micolatos, e na formação de óxido nítrico, também conhecido como protóxido de azoto. Posteriormente, o fármaco intermediário ativo é convertido na forma inativa, ou seja, na forma desnitrosada, pela mesma enzima nitroreductase dependente de deazaflavina. Todo o mecanismo de ação se encontra esquematizado na Figura 2.18. (135,137)

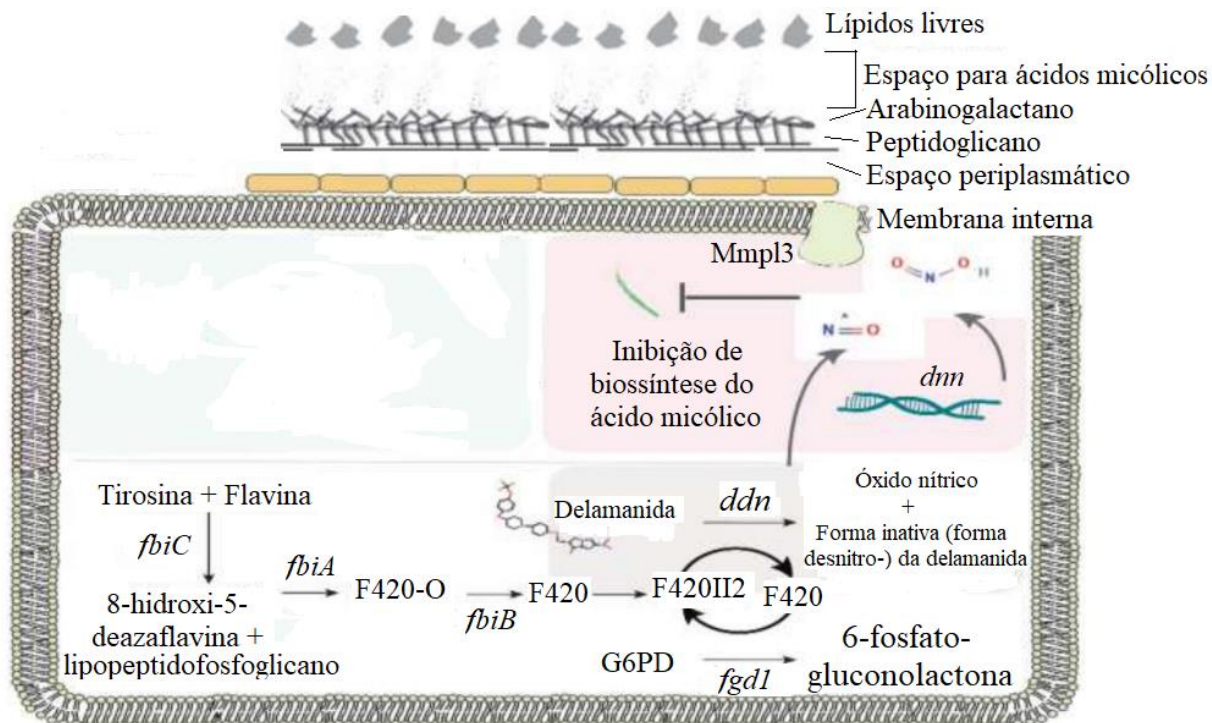


Figura 2.18 – Representação do mecanismo de ação da delamanida; G6PD = Glicose-6 Fosfato Desidrogenase (adaptado de (135))

A prevalência de efeitos adversos que advêm da toma de delamanida é significativa, sendo os mais frequentes distúrbios gastrointestinais (vômitos, diminuição do apetite, gastrite e náusea), tremor, astenia e hipocaliemia, bem como distúrbios hematológicos (anemia, hemoptise), elevação dos níveis de enzimas hepáticas e prolongamento do intervalo QT. (101,135) Devido a este último efeito colateral, quando não for possível evitar a prescrição é necessário realizar uma monitorização cuidadosa quando a delamanida se encontra prescrita em concomitância com outros fármacos que apresentam risco de prolongamento do intervalo QT, tais como fluoroquinolonas, clofazimina e bedaquilina, de modo a evitar consequências mais graves, como o surgimento de arritmias. (135,137)

Estudos em animais revelaram que a delamanida apresenta propriedades mutagênicas e teratogênicas, sendo também excretada através do leite materno. Face a esta informação, na Europa não é recomendada a administração de delamanida a grávidas e a mulheres que estejam a amamentar. (137)

Existem relatos de 12 mutações nos genes *fbiA*, *fbiC*, *ddn* e *fgdI* (este último codifica a enzima glicose-6 fosfato desidrogenase dependente de F420) que contribuem para o desenvolvimento de resistência à delamanida, sendo a mais frequente a mutação W88 no gene *ddn*, que aumenta a MIC 200 vezes. Assim, pelo número de genes que pode estar afetado e pelo impacto que advêm da presença dos mesmos, é recomendada a realização de testes de suscetibilidade a fármacos de forma sistemática e consistente, de modo a reconhecer o surgimento primário de resistências. (135)

A delamanida suscitou recentemente interesse pela empresa farmacêutica japonesa Otsuka, por demonstrar ação sinérgica com rifampicina e pirazinamida. Estudos de SAR conduziram a informação sobre os blocos essenciais em que se baseou o desenho da molécula, representados na Figura 2.19. (134)

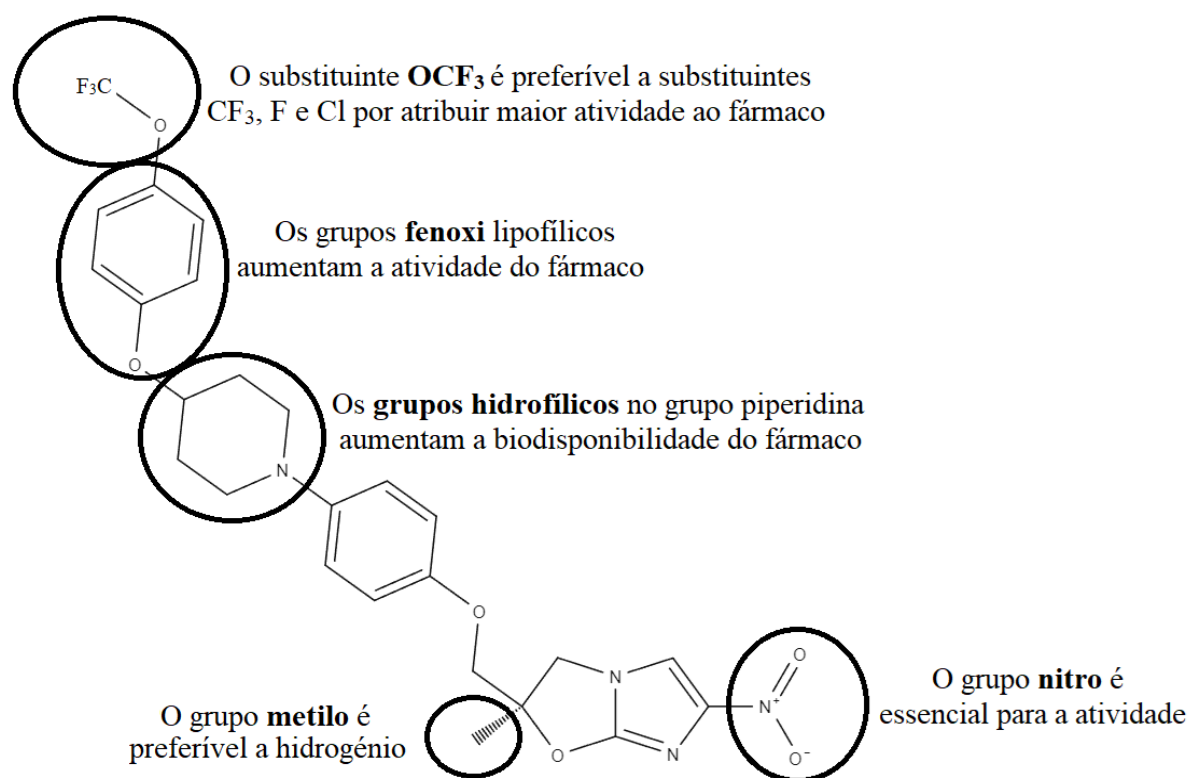


Figura 2.19 – Síntese dos resultados dos estudos de SAR da delamanida (adaptado de (134))

2.2.8. Etionamida/Protionamida

A etionamida é um fármaco que foi sintetizado pela primeira vez em 1952, e em 1956 foi sintetizado o seu análogo estrutural, a protionamida, que apresentou uma eficácia ligeiramente inferior mas melhor tolerabilidade. (81,101) As reações adversas, que se manifestam principalmente após a administração da etionamida por longos períodos, são distúrbios gastrointestinais, ginecomastia, neurotoxicidade, hepatotoxicidade (rara) e hipotireoidismo, reversível após a interrupção do medicamento. (101)

A etionamida, tal como a isoniazida, é um profármaco que é administrado na sua forma inativa, necessitando de metabolização para ser transformado em metabolito ativo. A ativação necessita de metabolização pela enzima monooxigenase EthA, codificada pelo gene *ethA*. (83,101) Tal como a isoniazida, a etionamida é um derivado de nicotinamida, pelo que os estudos de relação estrutura-atividade revelaram dependência dos mesmos substituintes que a isoniazida. (86)

O mecanismo de ação da etionamida resulta na inibição da síntese do ácido micólico, atuando o fármaco como bactericida (Figura 2.20). A enzima EthA é responsável pela conversão de etionamida em radicais ativos, centrados em carbono eletrofílico, que posteriormente são convertidos em aduto tóxico com NADH. O aduto tóxico (Figura 2.21)

resultante inibe a enoil-ACP redutase *InhA*, enzima essencial no ciclo de síntese do ácido micólico da parede celular. (81)



Figura 2.20 – Representação do mecanismo de ação da etionamida. NAD^+ e NADH = Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina, *Ndh* = NADH Desidrogenase, ETH = Etionamida, *Rv0077c* e *Rv0565c* = Monooxigenases, *MymA* = Oxidoreductase, *MshA*, *MshB* e *MshC* = Genes Codificadores de Micotiol, FAS-II = Sistema Multienzimático de Síntese de Ácidos Gordos Tipo II (adaptado de (81))

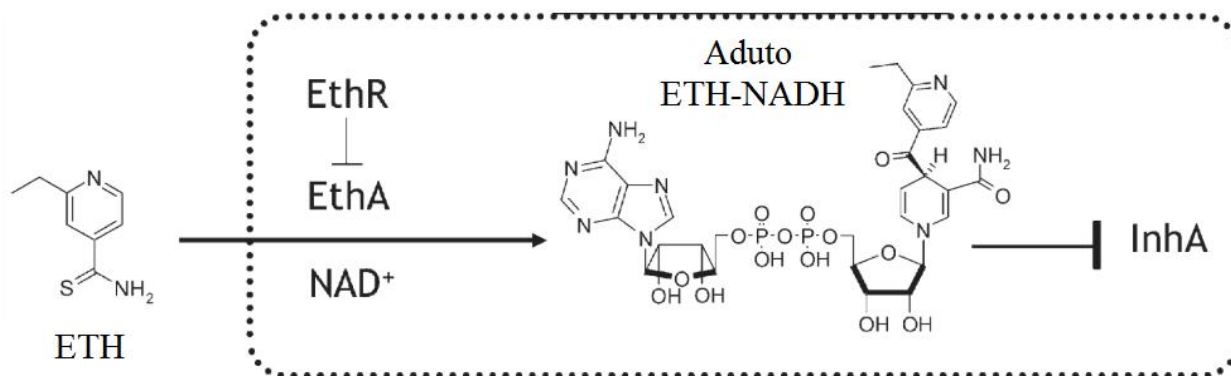


Figura 2.21 – Representação esquemática da síntese do aduto ETH-NADH. ETH = Etionamida, NAD^+ e NADH = Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (adaptado (138))

Os mecanismos de resistência à etionamida permanecem em estudo, no entanto existe evidência de mutação do gene *orf1* do locus *inhA*, responsável pelas modificações conformacionais que prejudicam o mecanismo de ação do fármaco, tendo a referida mutação sido identificada em várias estirpes resistentes à etionamida. (83) A mutação c(-15)t, também conhecida como 15C→T, no promotor P_{fabG1} (do locus que codifica a 3-cetoacil-ACP redutase) a montante do *InhA*, que aparenta ser uma das mutações mais comuns, afeta a taxa de transcrição de *InhA*, aumentando-a, tal como acontece nas estirpes resistentes à isoniazida, e

parece desempenhar também um papel importante no desenvolvimento de resistências à etionamida. Estudos apontam para o envolvimento de outras mutações, como as que ocorrem nos genes *ethA* e *ethR* (gene repressor). (80,81)

2.2.9. Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas, de que são exemplo a moxifloxacina e a levofloxacina, atuam como bactericidas por inibição competitiva da ADN girase, também conhecida por topoisomerase II, e da topoisomerase IV. O ADN bacteriano encaixa-se na célula através de um processo de torção numa espiral compacta. Esse processo é possibilitado pela enzima ADN girase da micobactéria que catalisa o processo de compressão da molécula de ADN, tornando-a biologicamente ativa. As quinolonas ligam-se à topoisomerase II e à fita de ADN, interferindo nesse processo. As interações mais relevantes para a ação das fluoroquinolonas encontram-se representadas na Figura 2.22. (139–141)

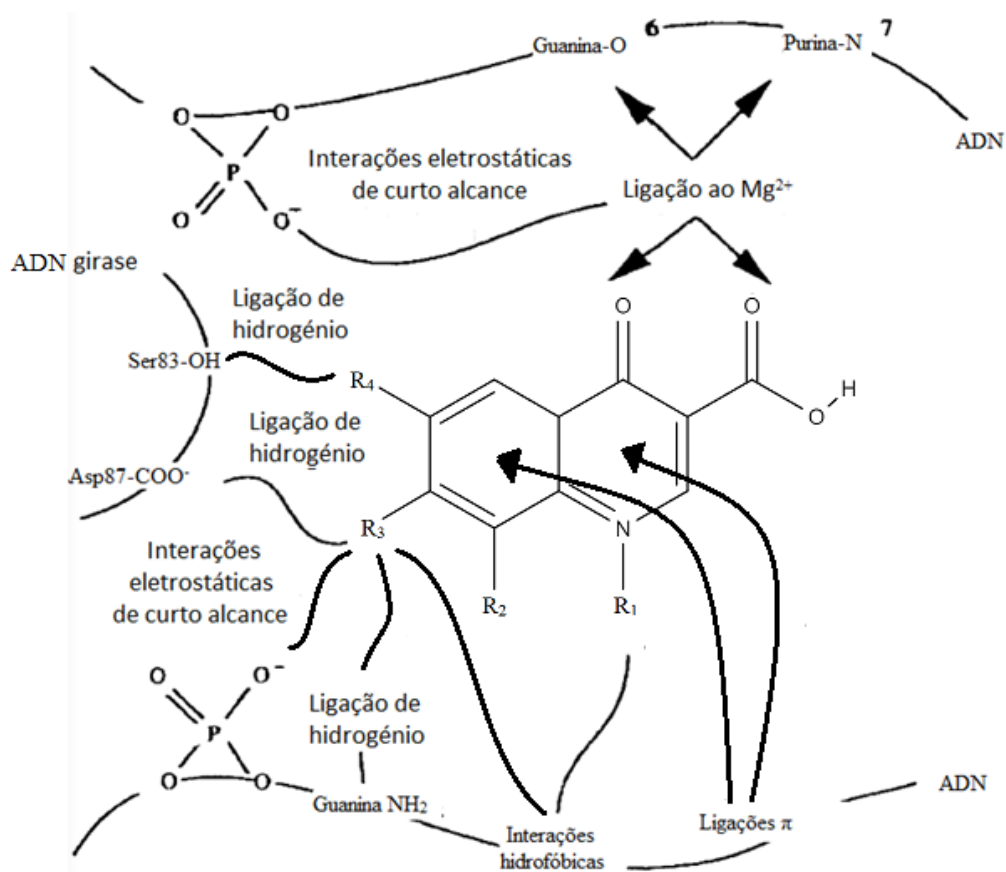


Figura 2.22 – Síntese das interações relevantes para a ação das fluoroquinolonas. ADN = Ácido Desoxirribonucleico (adaptado de (141))

As reações adversas mais comuns às fluoroquinolonas são prolongamento do intervalo QT, toxicidade ao nível do SNC (causando p.ex. dor de cabeça, tonturas, confusão, convulsões), distúrbios gastrointestinais (causando p.ex. náusea, vômito, diarreia) e reações dermatológicas

(causando p.ex. erupção cutânea, fotossensibilidade). Também houve relatos de tendinite, ruptura do ligamento de Aquiles e diarreia induzida por *Clostridium difficile*, associados à toma de fluoroquinolonas, e risco de desenvolvimento de disglucemia, este mais associado à toma de levofloxacina do que de moxifloxacina. (139)

O desenvolvimento de resistências a fluoroquinolonas deriva de mutações nos genes *gyrA* e *gyrB*, que codificam, respectivamente, as duas subunidades A e duas subunidades B, que compõem a ADN girase. A topoisomerase IV é também um tetrâmero composto por duas subunidades C e duas subunidades E, codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respectivamente, que podem ser alvo de alterações genéticas, levando à diminuição da suscetibilidade da micobactéria às fluoroquinolonas. Todas as mutações anteriormente referidas envolvem substituições de aminoácidos, alterando a estrutura da proteína alvo e, posteriormente, a afinidade de ligação da enzima à fluoroquinolona, reduzindo a suscetibilidade de Mtb ao fármaco. (140,142)

Mutações nos genes que codificam as bombas de efluxo, que removem o fármaco do interior da micobactéria, e a proteína MfpA (inibidor da ADN girase) também parecem estar envolvidas no desenvolvimento de resistências. (100,142) Outros estudos revelaram a associação entre o desenvolvimento de resistências e a transmissão de certos genes “móveis” através de plasmídeos, que podem ser transmitidos a outras bactérias: o gene *qnr*, que codifica a proteína Qnr, que se liga à topoisomerase, o que impede fisicamente a intercalação do antibiótico com a enzima alvo; o gene *aac(60)-lb-cr*, que codifica a aminoglicosídeo acetil transferase, que diminui a suscetibilidade às fluoroquinolonas, como ciprofloxacina e norfloxacina, pela acetilação do azoto livre do substituinte piperazinilo, ligado ao carbono 7 do núcleo quinolínico; e os genes *oqxAB* e *qepA*, que codificam transportadores de efluxo, responsáveis pela exportação de moléculas de fluoroquinolonas para o exterior da bactéria, diminuindo a concentração plasmática dos fármacos no interior da micobactéria. (140,142)

A investigação nesta área tem conduzido ao desenvolvimento de novos derivados das fluoroquinolonas, mais seguros e mais eficazes, com base nos resultados obtidos em estudos de relação estrutura-atividade na família das fluoroquinolonas. Na Figura 2.23 está representada a estrutura da levofloxacina, enfatizando os aspetos relevantes para a atividade da molécula e que devem ser considerados no desenho e otimização dos derivados de fluoroquinolonas.

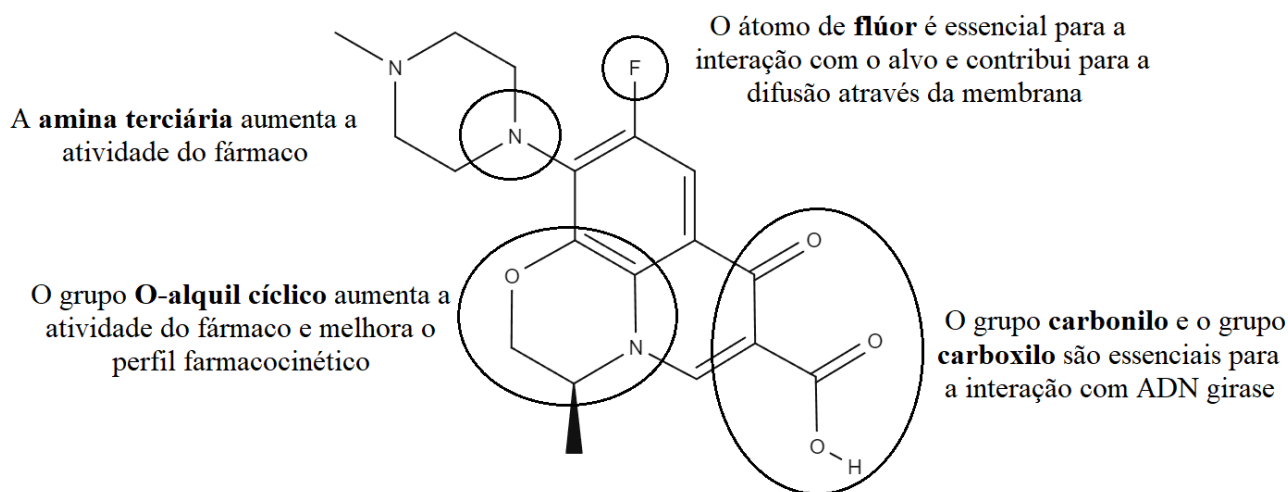


Figura 2.23 – Súmula dos resultados dos estudos de SAR da levofloxacin. ADN = Ácido Desoxirribonucleico (adaptado de (134))

2.2.10. Linezolida

A linezolida é um fármaco com propriedades bactericidas contra Mtb, administrado por via oral, cuja eficácia e tolerabilidade durante o tratamento da TB tem sido consolidada por novas evidências. Acresce que o preço do genérico apresenta tendência a diminuir. (77,103,143) Atualmente, a linezolida é recomendada para o tratamento de TB provocada por estirpes de Mtb resistentes aos fármacos de 1^a e de 2^a linha, geralmente em combinação com uma das fluoroquinolonas de última geração, bedaquilina e outro antituberculoso de 2^a linha. (144)

A linezolida, o primeiro fármaco descoberto do grupo das oxazolidinonas, previne a síntese de proteína bacteriana através da ligação às subunidades 30S e 50S do ARN ribossomal. A molécula encaixa numa “bolsa” da subunidade ribossômica 50S do ARN ribossomal, rodeada por nucleotídeos da sua subunidade 23S. Assim, o fármaco inibe a formação do complexo de iniciação, reduzindo o comprimento das cadeias peptídicas sintetizadas, que depois são degradadas (Figura 2.24). (145,146)

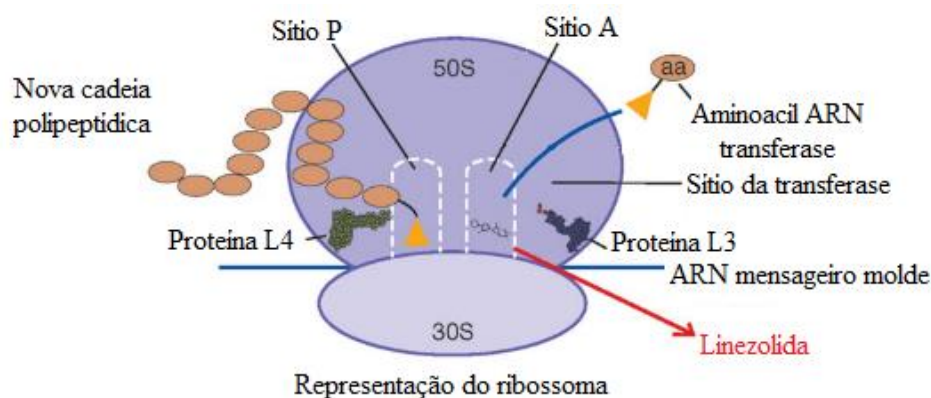


Figura 2.24 – Esquema representativo do mecanismo de ação da linezolida (adaptado de (146))

A linezolida é muitas vezes usada no tratamento de infecções do SNC causadas por micobactérias, devido à boa penetração no líquido cefalorraquidiano. (145) Apesar de atravessar a BHE, as reações adversas que limitam o seu uso prolongado não são as neurológicas mas sim as hematológicas. O uso prolongado de linezolida pode conduzir a manifestação de neuropatia periférica e ocular, anemia, decorrente do efeito direto da linezolida na população de eritrócitos da medula óssea, macrocitose, mielossupressão, trombocitopenia, reticulocitopenia, acidose láctica e hepatotoxicidade, para além de outros efeitos adversos como diarreia, náuseas e cefaleias. (143–145,147) Quando as reações hematológicas adversas se manifestam, os doentes requerem a diminuição ou individualização da dosagem de linezolida (inferior à dosagem padrão de 600 mg), transfusão de sangue ou descontinuação do tratamento com este fármaco, dificultando a erradicação da TB. (144,147)

Foram reportadas evidências de estirpes resistentes à linezolida, o que dificulta mais a eliminação da TB, principalmente em doentes infetados por estirpes resistentes aos fármacos de 2ª linha. Estudos demonstraram que a mutação do gene codificador da subunidade 23S do ARN ribossomal constitui um dos mecanismos de resistência à linezolida. Verificou-se também que mutações em regiões específicas das proteínas ribossomais uL3 e uL4, apesar dessas proteínas se localizarem longe do sítio de ligação do fármaco, estão implicadas na diminuição de suscetibilidade à linezolida. (145) Assim, a maior limitação do uso da linezolida é a probabilidade de aparecimento de reações adversas graves durante o tratamento, pelo que estão em estudo novos derivados da oxazolidinona com base na relação estrutura-atividade do farmacóforo. Na Figura 2.25 está representada a estrutura da linezolida, destacando os aspetos mais relevantes para a atividade do fármaco, assinalados pelos círculos. É de notar que o grupo acilamino-metilo pode ser substituído por outros grupos, havendo todavia diminuição da atividade. (134)

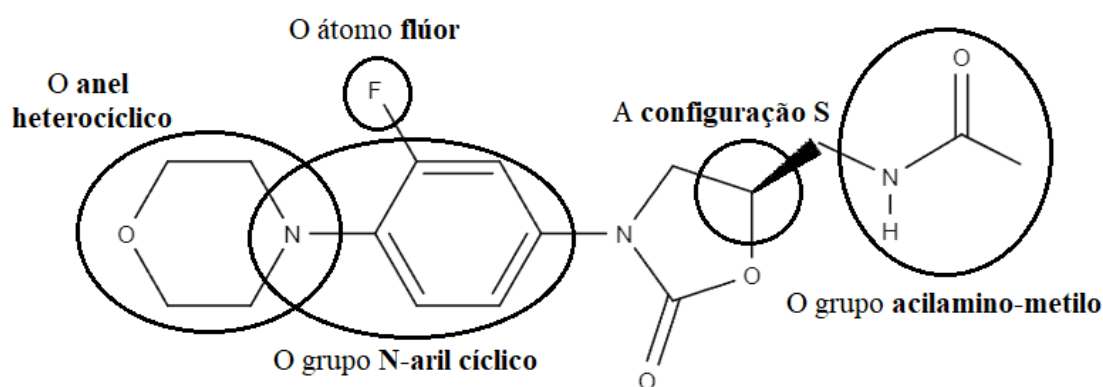


Figura 2.25 – Súmula dos resultados dos estudos de SAR da linezolida (adaptado de (134))

2.3. Quimioterapia na TB latente/ prevenção da reativação

A TB latente é definida como um estado de resposta imunitária do hospedeiro contínua que surge devido à estimulação por antígenos do Mtb, mas sem evidências de TB ativa, ou seja, os doentes persistem na forma assintomática. (148,149) Apesar do tratamento da TB ativa continuar a ser uma prioridade, esta abordagem por si só não será suficiente para alcançar as metas da *End TB Strategy* até 2050, isto é, para atingir uma taxa de incidência da doença inferior a um caso por milhões de habitantes. (149,150) Deste modo, o tratamento de TB latente é fulcral para prevenir a progressão da doença para o seu estado ativo, isso é, para o estado sintomático e transmissível. O tratamento de TB latente só se considera eficaz caso não haja evolução da TB do estado latente para o estado ativo. (148)

O benefício potencial do tratamento deve, no entanto, ser cuidadosamente avaliado em relação ao risco de efeitos adversos relacionados com os medicamentos, isso é, o benefício-risco de cada situação deve ser avaliado individualmente, principalmente em indivíduos pertencentes aos grupos de risco. Assim, a gestão da TB latente requer que várias intervenções sejam realizadas: identificar e testar os indivíduos que devem ser testados, fornecer tratamento eficaz e seguro, de tal forma que a maioria dos que iniciam um regime de tratamento o completem com risco mínimo ou nulo de eventos adversos, monitorizar e avaliar continuamente o processo terapêutico e os parâmetros clínicos dos doentes. (149)

Com base nas orientações estabelecidas para o tratamento de TB latente, objetivando a prevenção da ativação da TB latente, a monoterapia, com isoniazida, durante 6 meses, é o regime terapêutico recomendado, de baixo custo, elevada disponibilidade e eficácia comprovada para crianças e adultos, em países com baixa ou alta taxa de incidência da doença. (149–151) Evidências indicam que a isoniazida só é ativa contra bactérias em divisão, no entanto foram estudadas e comprovadas as suas capacidades para reter a bactéria no estado de latência no estômago, o que acaba por levar à eliminação da infeção latente. (26) No entanto, outros regimes terapêuticos podem ser prescritos como alternativa à toma de isoniazida durante 6 meses, baseando-se no espectro de suscetibilidade e nas características individuais do doente. Para países que apresentam taxas de incidência altas, as alternativas podem ser (149):

- Toma diária de rifampicina e isoniazida durante 3 meses, que deve ser prescrita como tratamento preventivo para crianças e adolescentes de idade inferior a 15 anos; ou

- Toma semanal de rifapentina e isoniazida durante 3 meses, que pode ser prescrita como tratamento preventivo para adultos e crianças;

Para países que apresentam taxa de incidência de doença baixa, as alternativas para o regime de monoterapia com isoniazida de 6 meses são (149–151):

- Monoterapia com isoniazida de toma única diária durante 9 meses; ou
- Toma semanal de rifapentina e isoniazida durante 3 meses; ou
- Toma única diária de isoniazida e rifampicina durante 3 a 4 meses; ou
- Monoterapia com rifampicina de toma única diária durante 3 a 4 meses.

Além disso, os adultos e os adolescentes VIH positivos que se encontram em ambientes com alta taxa de incidência e alto nível de transmissão de TB e os que apresentaram o teste TST positivo (ou de resultado desconhecido), mas que não apresentam sintomas de TB ativa, devem receber pelo menos 36 meses de tratamento preventivo com isoniazida de toma única diária, independentemente de estarem a receber tratamento antirretroviral ou não. A isoniazida também deve ser administrada independentemente do grau de imunossupressão, de história de tratamento prévio contra TB e de gravidez. (149,151)

As principais barreiras para a aceitação do tratamento de TB latente incluem a oposição dos médicos em prescrever o tratamento para TB latente (por exemplo, por receio de facilitar o desenvolvimento de resistência a medicamentos com monoterapia, ou por falta de certezas acerca dos benefícios do tratamento para TB latente e que estes superem os riscos (como o desenvolvimento de efeitos adversos), a resistência dos doentes diagnosticados com TB latente em se submeter a um curso prolongado de tratamento para uma condição assintomática que pode nunca progredir para TB ativa, e falta de disponibilidade de medicamentos únicos em países onde a terapia combinada, ou seja, uma associação de medicamentos em dosagens fixas, se encontra disponível apenas para o tratamento da TB ativa. (150)

Para superar os desafios impostos pela baixa adesão ao tratamento e baixas taxas de conclusão das terapias atuais para TB latente, o estudo WHIP3TB (NCT02980016) pretende demonstrar os benefícios que países com elevadas taxas de incidência e prevalência de TB podem colher com a administração em ciclos anuais, por 2 anos consecutivos, do regime de 3 meses de isoniazida e rifapentina, em comparação com um único ciclo terapêutico de rifapentina e isoniazida durante 3 meses ou 6 meses ou de isoniazida durante 6 meses. (151)

Uma das medidas que deve ser implementada para aumentar o impacto positivo da terapêutica preventiva é incentivar os médicos a seguir as orientações quanto à avaliação do risco individualizado antes da prescrição da terapêutica, ou seja, espera-se que os médicos equilibrem os riscos e benefícios individuais dos seus pacientes antes de qualquer recomendação. (150) Além disso, é expectável que os médicos monitorizem com alguma frequência a adesão e a tolerabilidade dos seus pacientes aos medicamentos prescritos. (151) Nesse aspeto, são desenvolvidas terapias promissoras, com objetivo de serem implementadas no plano terapêutico como estratégias adjuvantes e/ou primárias de prevenção da TB, direcionadas ao hospedeiro, que consigam melhorar a resposta imune ao Mtb. (151)

No entanto, é necessário reconhecer o risco de ativação da doença depois da cessação da terapêutica, caso o indivíduo diagnosticado se encontre numa população de risco, como é o caso de profissionais de saúde, mineiros, sem-abrigo e prisioneiros, adotando uma abordagem geral da terapêutica orientada para benefícios individuais e também para a saúde pública. (150)

Considera-se de extrema importância a aposta no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos que melhorem a capacidade dos médicos de prever quais indivíduos de alto risco progredirão para a forma ativa da doença, e no desenvolvimento de novos regimes de tratamento que apresentem menor toxicidade, maior eficácia e que evitem a resistência adquirida aos medicamentos em indivíduos com doença precoce não detetada. (150)

2.4. Quimioterapia em condições especiais

O tratamento da TB em condições especiais necessita de uma monitorização mais apertada, realizada sob supervisão dos profissionais de saúde. Nas condições especiais são integradas a gravidez, a amamentação, as crianças e os indivíduos VIH positivos.

2.4.1. Gravidez

Antes de iniciar o tratamento de qualquer condição em mulheres grávidas deve avaliar-se o risco que a doença traz para a mãe e para o feto, mas também o dano que a medicação poderá trazer ao feto. No caso da TB, o risco de doença não tratada é muito maior do que o risco proveniente da medicação. (152,153) A TB congénita pode ser transmitida da mãe com TB ativa para o feto, por via transplacentária, através da corrente sanguínea ou linfática, mas também é possível o bebé ser infetado por Mtb aspirado ou ingerido através do líquido amniótico, durante o parto. (153)

O tratamento é iniciado logo após a confirmação do diagnóstico, consiste na prescrição da associação entre isoniazida, rifampicina e etambutol e dura no mínimo 9 meses, caso a pirazinamida não esteja incluída no tratamento. (152,153) Geralmente, a pirazinamida só é administrada a grávidas diagnosticadas com TB ativa extrapulmonar grave ou se apresentam coinfeção com VIH. (153) Os 4 fármacos são classificados pela FDA como fármacos de categoria C (estudos em animais demonstram risco, sem estudos em humanos), conseguem atravessar a placenta, no entanto não apresentam efeitos teratogénicos. (154)

Se a mulher grávida apresentar TB resistente a fármacos deverá dirigir-se ao especialista, visto que a maioria dos fármacos de 2ª linha apresentam propriedades teratogénicas. Por exemplo, os aminoglicosídeos (como canamicina, amicacina e estreptomina) devem ser evitados, especialmente nas primeiras 20 semanas de gravidez, devido ao risco de ototoxicidade e malformações fetais ou teratogenicidade. É também de evitar a toma de etionamida e de protionamida durante a gravidez, pois podem aumentar o risco de náuseas e vômitos. As fluoroquinolonas também são contraindicadas na gravidez. Os restantes medicamentos de 2ª linha são considerados, com base na classificação do FDA, da categoria B (estudos em animais não demonstram risco, sem estudos em humanos) ou C, pelo que podem ser utilizadas em grávidas quando necessário. (152,155)

Quando TB latente é diagnosticada na mulher grávida, é geralmente prescrito o regime posológico com a isoniazida de toma diária ou duas vezes por semana ou com a rifampicina como alternativa, adicionando ao esquema terapêutico a suplementação de piridoxina, de modo a evitar a sua deficiência e consequente neuropatia. Ambos os fármacos são classificados como fármacos de categoria C durante a gravidez. (151,153) O tratamento com isoniazida em grávidas deve ser sempre avaliado, ponderando o benefício que advém do tratamento e o risco de desenvolvimento de hepatotoxicidade. (153)

2.4.2. Amamentação

A amamentação não deve ser descontinuada durante o tratamento da TB, dado que a quantidade dos fármacos de 1ª linha que passa para o leite materno é insuficiente para causar efeitos tóxicos no recém-nascido. (153,156) Pelo facto de os fármacos passarem em pequena quantidade para o leite materno não deve ser considerado como uma terapia eficaz o consumo de leite num lactente inficionado por Mtb. (153)

No entanto, a TB ativa é uma contraindicação para a amamentação, pelo que a mulher deve tomar a medicação pelo menos 2 semanas antes de começar a amamentar. (153,157)

No caso dos fármacos de 2ª linha, ainda há dados insuficientes quanto à sua farmacocinética no período pré- e pós-parto, bem como à sua distribuição até ao leite materno e às consequências nas crianças após a sua exposição a essas concentrações, pelo que não há recomendações quanto à sua prescrição em mulheres que se apresentem a amamentar. (157)

É estipulada a recomendação de suplementação com piridoxina em mulheres que tomam isoniazida e que se encontram a amamentar e, além disso, as crianças devem ser supervisionadas para que as medidas necessárias sejam imediatamente tomadas caso desenvolvam icterícia derivada da hepatotoxicidade do fármaco. Outra recomendação às mulheres que amamentam e se encontram sob terapêutica medicamentosa com isoniazida é tomar a medicação logo após amamentar, ou num longo período de sono da criança, de modo a minimizar as doses de fármaco que passem para o leite. (153)

2.4.3. Crianças

O regime terapêutico para o tratamento de TB em crianças é geralmente igual ao prescrito em adultos. Para o tratamento de TB suscetível a medicamentos de 1ª linha o regime terapêutico mais prescrito é a associação de isoniazida, rifampicina e pirazinamida (e etambutol, se necessário) durante 2 meses, seguida de toma de isoniazida e rifampicina durante mais 4 meses. Apesar do etambutol ser fármaco de 1ª linha, para o tratamento da TB em crianças geralmente só é prescrito em casos de diagnóstico de TB resistente a fármacos, nomeadamente à isoniazida e à rifampicina. (158,159)

Para o tratamento de TB resistente a fármacos, existem dados suficientes quanto à eficácia e segurança do uso de fluoroquinolonas em crianças com TB. (158) A OMS também autorizou o uso de bedaquilina e delamanida em crianças, retirando a necessidade de uso de fármacos cuja administração só é possível por via intravenosa. (159,160) Quanto à restante medicação de 2ª linha, não existe informação suficiente que justifique o seu uso em crianças. (158)

Uma das grandes limitações no que se refere à terapêutica em pediatria é a adesão à terapêutica, dado que é frequente surgirem dificuldades na deglutição de comprimidos. Este facto complica-se pelo facto de não haver informação suficiente sobre a possibilidade de triturar ou dissolver os comprimidos e como isso afeta a farmacocinética e a farmacodinâmica dos fármacos. (158,159) A firma *Alliance* desenvolveu recentemente comprimidos orodispersíveis com uma combinação fixa de fármacos de 1ª linha, que podem ser encomendados apenas

através da plataforma *Global Drug Facility* que colabora com *Stop TB*, exatamente para ultrapassar essa dificuldade, no entanto esta área carece de maior investimento. (159)

2.4.4. Indivíduos VIH positivos

O aspeto mais importante que se deve considerar quando um indivíduo é infetado com VIH é prevenir a coinfeção com *Mtb* através da vacinação, aspeto que ainda necessita de maior investigação e melhoramento, e/ou através da terapêutica preventiva com isoniazida. (67) O tratamento preventivo para indivíduos VIH positivos deve ser iniciado com 5mg/kg (máximo 300mg) de isoniazida de toma única diária, durante 6 meses. (161,162)

Em casos de diagnóstico de TB latente, também é prescrita monoterapia com isoniazida de toma única diária, durante 9 meses. Foi comprovado que a toma de isoniazida reduz em 64% a taxa de incidência de TB ativa, em indivíduos com o teste TST positivo. (151)

Logo que o indivíduo VIH positivo seja diagnosticado com TB ativa, o tratamento com fármacos antituberculosos deve ser iniciado. A fase inicial, de 2 meses, compreende isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, seguindo-se a fase de continuação, durante 4 meses, com isoniazida e rifampicina. Caso um indivíduo VIH positivo seja previamente sujeito ao tratamento para TB, a fase intensiva pode incluir também o tratamento com estreptomicina e a fase de continuação deverá ainda incluir o tratamento com etambutol, durante 5 meses. (161)

Não é recomendável que o tratamento para a TB seja iniciado enquanto decorre o tratamento com antirretrovirais. O tratamento para a TB é prioritário em relação ao tratamento para o VIH, para diminuir a transmissão, principalmente durante a fase ativa da doença. (162) A decisão de iniciar o tratamento com antirretrovirais deve ter em consideração a quantidade de células CD4⁺ (para determinar a progressão da doença), a tolerância ao tratamento com fármacos para a TB e a monitorização de manifestação de sinais de imunodeficiência. É uma estratégia necessária para garantir a adesão à terapêutica, simplificar o regime terapêutico, diminuir o risco de síndrome inflamatória de reconstituição imune e prevenir o aparecimento de interações entre os fármacos antirretrovirais e os antituberculosos. (161)

A questão das interações farmacológicas entre os fármacos para a TB e para o VIH é um aspeto de extrema importância e que deve ser constantemente monitorizado, dado que pode ser a causa da diminuição da concentração do fármaco ativo em circulação e consequente desenvolvimento de resistências aos fármacos. A rifampicina aumenta a atividade de enzimas da família do CYP450, nomeadamente CYP2B6 e CYP3A4, responsáveis pela metabolização

dos inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (efavirenz, nevirapina, tenofovir e abacavir) e dos inibidores da protease viral (lopinavir e ritonavir), que são fármacos usados para o tratamento e controlo do VIH, diminuindo até 75% a concentração sérica dos mesmos. Por outro lado, os inibidores da transcriptase reversa e os inibidores das proteases inibem enzimas da família do citocromo P450, nomeadamente CYP2A6, alterando os níveis séricos da rifampicina. (67)

Apesar do risco de manifestação de reações adversas resultantes das interações descritas acima, a rifampicina continua a ser o fármaco antituberculoso preferido no tratamento de TB em indivíduos VIH positivos, pelo facto de nos indivíduos VIH positivos tratados por 6 ou mais meses com regimes contendo rifampicina a taxa de recaída da doença ser tão baixa quanto nos indivíduos VIH negativos. A rifabutina pode ser uma alternativa à rifampicina, no entanto é um fármaco mais caro e é necessário ajuste de dosagem dos inibidores de proteases, caso sejam prescritos no regime terapêutico do doente. (161)

O risco de morte aumenta conforme a progressão da TB, mas muitos casos de morte estão relacionados com a progressão de outras infeções oportunistas, e.g. pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* ou encefalite por *Toxoplasma gondii*. (161) Para prevenção de infeções oportunistas a OMS recomenda iniciar a profilaxia com cotrimoxazol (associação de sulfametoxazol e trimetoprim) em casos que apresentem coinfeção por Mtb e VIH. (161,162)

3. MDR-TB e XDR-TB e dados epidemiológicos

A OMS classifica a TB, quanto às resistências aos fármacos, em TB resistente à isoniazida, TB resistente à rifampicina, TB Multirresistente (MDR-TB), pré-XDR-TB e TB Extensamente Resistente (XDR-TB). (16)

A detecção de estirpes de TB resistentes requer testagem por testes de suscetibilidade fenotípicos (crescimento em cultura) e genotípicos (sequenciação do genoma), de modo a prever o melhor esquema terapêutico necessário ao doente. (16,163)

A MDR-TB caracteriza-se pelo desenvolvimento de resistências aos dois fármacos mais eficazes no combate contra Mtb: rifampicina e isoniazida. A incidência da estirpe MDR-TB aumenta gradualmente e o seu aparecimento e transmissão deve-se essencialmente ao incorreto uso dos antimicrobianos e ao uso de formulações inadequadas (só com uma substância ativa, má qualidade dos fármacos utilizados ou mau armazenamento da formulação final). (9,14)

Em alguns casos pode haver desenvolvimento de resistências a outros fármacos adicionais, dando origem à pré-XDR-TB e XDR-TB. (9,16) A pré-XDR-TB caracteriza-se pela resistência à rifampicina e às fluoroquinolonas. Para além de rifampicina e isoniazida, a XDR-TB também é resistente às fluoroquinolonas e a pelo menos um dos 2 antituberculosos de 2ª linha: bedaquilina e linezolina. (3,11,16)

Também existem relatos do aumento da incidência da Tuberculose Totalmente Resistente (TDR-TB) sendo uma estirpe resistente a todos os antibióticos principais usados no tratamento de casos de TB. A TDR-TB foi pela primeira vez reportada em Itália no ano 2003 e também foram reportados casos no Irão e na Índia. (9,14)

Globalmente, em 2020, 2,1/3,0 milhões (71%) das pessoas diagnosticadas com TB foram testadas para resistência à rifampicina, sendo estes valores superiores aos obtidos em 2019, 2,2/3,6 milhões (61%), e 2018, 1,7/3,4 milhões (50%). Estes dados mostram que, felizmente, o número de casos diagnosticados de TB tende a diminuir ao longo dos 3 anos em análise. Em 2020, entre os 71% dos casos, foram detetados 132,222 novos casos de TB resistente à rifampicina ou MDR-TB e 25,681 novos casos de pré-XDR-TB ou XDR-TB, do que se conclui que houve uma diminuição da incidência de desenvolvimento de resistências em comparação com os dados de 2019, onde o número de casos MDR-TB atingiu os 201,997 casos. (16)

Apesar dos avanços positivos, em 2020, em todo o mundo, 150,359 pessoas com TB resistente à rifampicina ou com MDR-TB foram inscritas para o tratamento necessário,

indicando uma queda de 15% em relação ao total de 177,100 de indivíduos inscritos em 2019. Esse nível de inscrição foi equivalente a cerca de 1/3 das pessoas que desenvolvem TB resistente à rifampicina ou MDR-TB a cada ano. Tais dados indicam haver uma progressão no sentido retrógrado ao estabelecido nos objetivos da Organização das Nações Unidas, visto que o número total cumulativo de indivíduos com TB resistente à rifampicina ou com MDR-TB relatadas como inscritas para o tratamento entre 2018 e 2020 foi de 482,683 indivíduos, o que constitui apenas 32% da meta de 5 anos (2018-2022) de 1,5 milhão. (16)

Em Portugal, é notável a redução progressiva do número de casos de MDR-TB. Em 2012 foram notificados 22 casos de MDR-TB e em 2018 só foram notificados 7 casos. Este avanço pode ser explicado pela adoção de estratégias de concentração dos doentes nos Centros de Referência de MDR-TB, que funcionam nas Administrações Regionais de Saúde, com consequente aplicação de protocolos uniformizados. (164)

Segundo a OMS, a incidência dos casos de TB resistente a fármacos concentra-se sobretudo na Índia, na República Democrática do Congo e na China, países com maior densidade populacional e, conseqüentemente, com maior probabilidade de contacto com indivíduos que apresentam a doença no estado ativo. (11,14,16)

As estirpes resistentes, MDR-TB e XDR-TB não respondem ao tratamento antituberculoso padrão, de 6 meses, por isso requerem um tratamento usando medicamentos que são menos potentes, mais tóxicos e muito mais caros, durante dois ou mais anos, o que representa um obstáculo significativo para países em vias de desenvolvimento que não possuem recursos para garantir um controlo e tratamento efetivo dos infetados com estirpes resistentes. (11)

Reconhecendo as dificuldades dos países mais pobres, a OMS e outros parceiros criaram a comissão para a iniciativa Luz Verde (ou *Green Light Committee initiative*), que visa instalar projetos pilotos para o tratamento de MDR-TB onde se implementaram práticas clínicas e medicamentosas de qualidade acessível. Outra estratégia, denominada “*Stop TB*”, foi implementada em 2006 e reforçada em 2009, visando garantir o acesso universal ao tratamento da MDR-TB. Graças a estas iniciativas, em 2011, 56 mil doentes com MDR-TB envolvidos (aumento de 80% dos casos em relação a 2009) foram diagnosticados e começaram o tratamento com medicamentos de segunda linha, devido ao crescente acesso a diagnósticos rápidos e credíveis. O sucesso de tratamento de casos de MDR-TB continua baixo a nível mundial, no entanto em alguns países subiu cerca de 75%, graças à implementação deste projeto. (11) A evolução da taxa de sucesso terapêutico de casos de TB resistente a fármacos progride no

sentido positivo nos últimos anos, tal como demonstrado na Figura 3.1. É de notar que os resultados para estudos de coorte sobre indivíduos tratados para TB resistente à rifampicina ou MDR-TB são relatados um ano mais tarde do que outros estudos de coorte sobre TB, dado que o curso terapêutico é mais demorado que noutras formas suscetíveis da doença. (16)

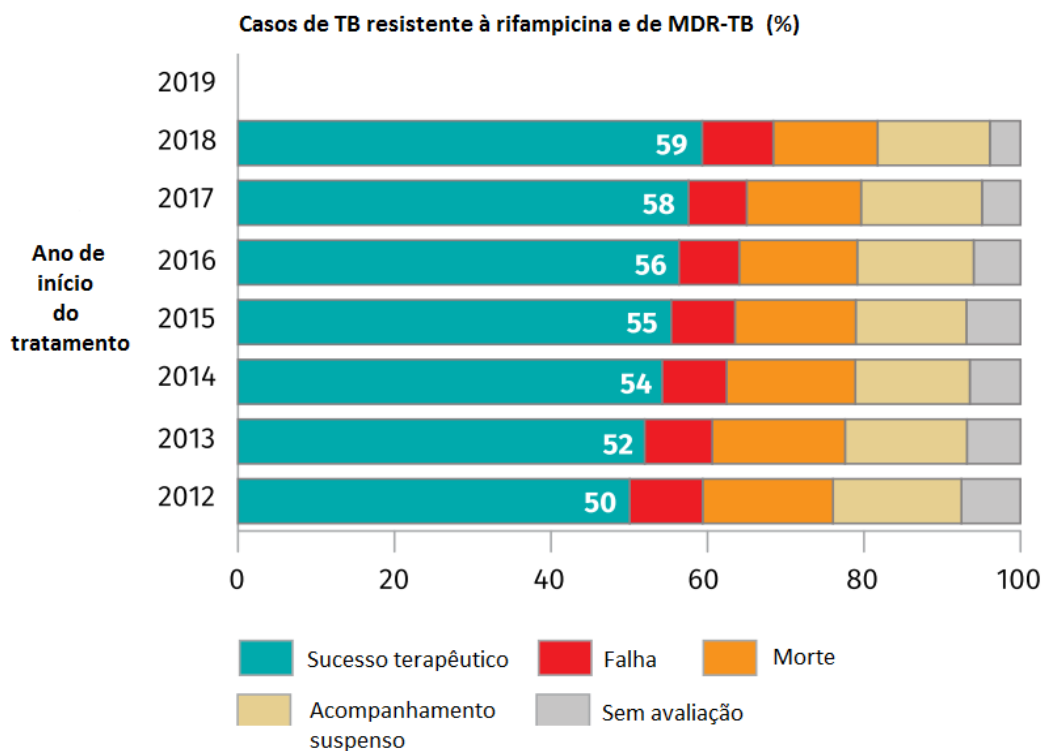


Figura 3.1 - Relação entre o ano de início do tratamento e as taxas de incidência, em percentagem, para vários desfechos derivados do tratamento para TB resistente à rifampicina e MDR-TB (adaptado de (16))

De modo a diminuir o número de casos de falha terapêutica e evitar o desenvolvimento de resistências, é necessário seguir algumas regras básicas, tais como proceder ao tratamento logo na primeira deteção de Mtb, garantir o acesso a um correto diagnóstico e aos fármacos necessários, manter um controlo adequado da infeção nas instalações de tratamento, garantir o adequado uso de medicamentos de segunda linha na terapêutica para TB, bem como evitar a acumulação dos doentes numa só instalação de tratamento. (9)

Conclui-se que todos os fatores descritos no capítulo 1.8 desta dissertação propiciam o insucesso da atual quimioterapia para combate da TB, no entanto, o desenvolvimento de resistências apresenta-se como o fator que mais contribui para este insucesso terapêutico.

4. Desafios Atuais e o Papel do Farmacêutico na sua Resolução

De modo geral, para que a TB seja extinta é necessário o máximo controlo sobre a redução da incidência e da prevalência da TB latente e sobre a minimização do risco de transição da infeção latente para infeção ativa por Mtb. (165) Assim, uma das principais estratégias para eliminar a TB é a identificação de indivíduos infetados em risco de progressão para o estado ativo e transmissível (sintomático) da doença e tratar a infeção subclínica através de um regime terapêutico apropriado para a TB latente, que, infelizmente, não é tão valorizada como o tratamento do estado ativo da doença. Assim, os profissionais de saúde, incluindo os farmacêuticos, devem participar na deteção de indivíduos com fatores de risco, como os indivíduos VIH positivos, e na promoção de adesão à terapêutica, quer nos casos de TB latente, uma vez que o regime mais comum da terapêutica preventiva é de longa duração (9 meses de isoniazida), quer nos casos de TB ativa, de modo a atingir o sucesso terapêutico e diminuir a transmissibilidade da doença. (166)

São vários os desafios que devem ser ultrapassados de modo a resolver a elevada taxa de insucesso terapêutico (65% globalmente) no tratamento para a TB que atualmente se verifica. (167) Ainda são notáveis algumas dificuldades nas áreas como a deteção e diagnóstico precoce dos casos de doença e tratamento eficaz de TB suscetível e resistente a medicamentos, a prevenção da TB resistente a medicamentos, o controlo e gestão de fatores de risco, como a coinfeção pelo VIH, diabetes e tabagismo (reduzindo o risco de progressão de infeção latente para o estado ativo), o controlo de infeção para prevenir a transmissão da TB, a quimioterapia preventiva e o desenvolvimento de vacinas mais eficazes. (165,166)

Apesar de todos os avanços nestas áreas, a implementação desses componentes técnicos é a etapa crucial para deter a doença. A implementação desses avanços requer um forte compromisso político e uma gestão programática sólida, mas não será eficaz se não houver um investimento maior nos determinantes socioeconómicos dos países que mais necessitam, já que a TB está intimamente relacionada com a pobreza. O fortalecimento do sistema de saúde é indispensável para o sucesso dos programas desenvolvidos no combate à TB, devendo todos os profissionais de saúde estar envolvidos. (165)

Os desafios no tratamento da TB suscetível e resistente aos medicamentos estão intimamente ligados ao facto de a duração do tratamento ser longa, resultando em baixa adesão ao tratamento e perda de monitorização e registo de dados. Além disso, o tratamento da TB é muito suscetível a erros humanos na prescrição de esquemas inadequados, dosagem

inconsistente, falta de monitorização da quimioterapia e seus resultados (positivos e/ou negativos), resultando no desenvolvimento de resistências aos medicamentos e falha terapêutica. (165,168)

O surgimento da necessidade de tratamento de TB resistente a fármacos por si só é um fator preocupante. Deve haver maior preocupação na prevenção de surgimento de estirpes de Mtb resistentes aos medicamentos, por exemplo, abandonando a prescrição de medicamentos em monoterapia, ou seja, sem a adição de número suficiente de outros fármacos. (165,167) É aqui que o farmacêutico deve atuar de forma mais ativa, ou seja, no acompanhamento ao doente, na promoção do uso racional do medicamento, na adesão à terapêutica, na advertência e monitorização de interações medicamentosas significativas (principalmente as que se manifestam), na correta transmissão de toda a informação necessária ao doente, por exemplo, quanto aos efeitos adversos possíveis e advertência sobre as resistências no caso de não serem seguidas as recomendações, e futuras complicações que daí podem advir para o doente. (169)

Os doentes infetados com estirpes resistentes geralmente necessitam de administração diária de fármacos injetáveis (de 2ª linha), pelo que é importante que haja acompanhamento e dispensa do medicamento com toda a informação necessária, bem como no auxílio e explicação do modo correto da administração desta categoria de fármacos. A administração contínua de fármacos injetáveis, a longa duração do tratamento e o custo elevado advindo da polimedicação podem levar a estados depressivos resultantes da discriminação e da sensação de vergonha e de culpa, pelo que o farmacêutico deve atuar como o profissional de saúde mais próximo da população, acompanhando o estado moral do doente e realçar a importância do cuidado que o doente deve ter sobre o seu bem-estar físico e psicológico. (167)

Caso sejam detetadas mutações espontâneas no genoma do Mtb, na estirpe que infetou o doente, é necessário um esquema terapêutico mais personalizado, dependendo das resistências desenvolvidas. Assim, é importante desenvolver novos esquemas terapêuticos e novos medicamentos. (163) Durante as últimas duas décadas têm surgido novos candidatos a fármacos contra a TB (Figura 4.1) que já encontram nas fases mais avançadas dos ensaios clínicos, com a finalidade de melhorar a eficácia e a segurança do esquema terapêutico para os doentes com TB, bem como diminuir a duração do tratamento e atuar sobre os bacilos que se encontrem em estado latente. (170,171) Contudo, os custos e a duração dos ensaios clínicos atrasam os avanços na área farmacêutica e a restrição de estudo de vários grupos de indivíduos quanto à

eficácia e segurança dos medicamentos limitam o acesso a novas informações para o desenvolvimento de orientações mais completas. (172)

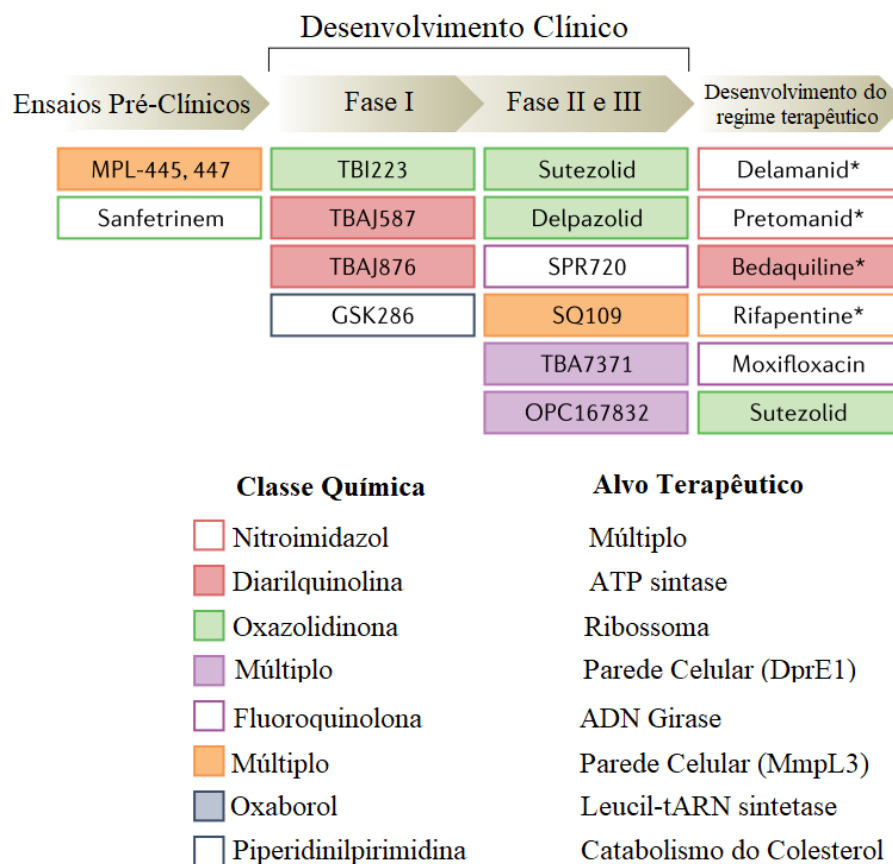


Figura 4.1 - Candidatos a fármacos antituberculosos atualmente desenvolvidos nos ensaios clínicos e respetiva classe química e alvo terapêutico. Os fármacos aprovados estão assinalados com asterisco. ADN = Ácido Desoxirribonucleico, ATP = Trifosfato de Adenosina, tRNA = Ácido Ribonucleico Transportador, DprE1 = Decaprenilfosforil-β-D-ribose 2'-epimerase, MmpL3 = Proteína de Membrana de Micobactéria 3 (Adaptado de (99))

O acesso aos medicamentos para a TB é outro aspeto que deve ser melhorado, dado que, para além dos medicamentos que apresentem maior eficácia e segurança, como a clofazimina, bedaquilina e delamanida, serem de difícil acesso devido ao seu elevado custo, muitos países recorrem à possibilidade de abastecimento bianual de medicamentos de 2ª linha, por vezes não totalmente testados, por meio de fornecedores locais, levando a excesso de *stock* num sítio e provocando rutura de *stock* noutra. (167) Apesar do *Global Drug Facility* ter lançado o programa de doação de bedaquilina, que passou por uma avaliação rigorosa para garantir que atende aos padrões mínimos, para 30000 cursos de quimioterapia em 100 países, em 4 anos, tal não é suficiente, tendo em conta que a OMS estima que há 480000 novos casos de MDR-TB todos os anos e 10% desses casos são XDR-TB. (166,167)

Capítulo III: Estratégias no combate às resistências

5. Estratégias para o desenho de compostos contra Mtb

De acordo com a OMS, desde 2000 foram curados 66 milhões de casos de TB com a quimioterapia convencional para TB suscetível, no entanto o tratamento dos doentes diagnosticados com MDR-TB e XDR-TB é muito difícil e a quimioterapia convencional pode não ter efeito significativo sobre o Mtb persistente, uma vez que precisam ser tratados com medicamentos de 2ª linha, mais tóxicos e mais caros, por mais tempo, com duração do tratamento até dois anos, e geralmente com taxa de sucesso baixa. (171)

Assim, é imperioso e urgente investir no desenvolvimento de novos fármacos com capacidade para curar TB, diminuir o tempo de tratamento e/ou promover o controlo da progressão da doença. O último sucesso verificado nesta área foi a introdução da bedaquilina e da delamanida no regime terapêutico contra TB, dois fármacos que demonstraram eficácia no tratamento da MDR-TB e na eliminação do Mtb no estado persistente e não-replicante. (170)

Investigação realizada nas últimas décadas produziu várias moléculas com potencial, das quais algumas se encontram já em fases avançadas de ensaios clínicos, cujos alvos terapêuticos são diferentes dos alvos identificados para fármacos já existentes, de modo a evitar resistências cruzadas e diminuir a mortalidade total por TB. (171)

Acredita-se que a evolução do regime terapêutico passa pela introdução de novas classes de compostos. Os compostos líder de cada classe (“*lead*”, do Inglês), escolhidos a partir dos compostos “*hit*” (selecionados em testes pré-clínicos) são estudados e otimizados seguindo uma determinada estratégia, durante um determinado período. (170) Três abordagens diferentes fazem parte do esforço contínuo na evolução na área de criação de novos medicamentos: *screening* baseado na estrutura, *screening* baseado no alvo e *screening* fenotípico.

Geralmente, o desenvolvimento do candidato num medicamento comercializável decorre num período de 12 a 15 anos e requer um investimento entre US\$ 500 e US\$ 800 milhões. Estima-se que a probabilidade de sucesso é de <100:1, mas, se bem-sucedido, o fármaco gera lucros anuais na ordem de US\$ 1 a 5 biliões até 10 anos. Apesar de haver pessoas que consideram pouco ético gerar lucro com medicamentos, trata-se de um aspeto essencial para que governos e indústrias invistam mais na área de desenho e desenvolvimento de novos fármacos. (173) Assim, é essencial que este processo seja conduzido de forma rigorosa, de

modo a garantir menos gastos financeiros nas fases de ensaios clínicos e maior probabilidade de desenvolver o fármaco promissor que apresente as propriedades farmacológicas pretendidas.

5.1. *Screening* baseado em estrutura

Uma abordagem central de triagem (“*screening*”) baseada na estrutura (*structure-based screening*) é o encaixe (“*docking*”) molecular, metodologia que se baseia no encaixe de pequenas moléculas em sítios de ligação de proteínas-alvo, tornado possível graças ao desenvolvimento tecnológico e computacional. As técnicas de *docking* foram desenvolvidas para prever a melhor orientação e conformação de uma molécula ligante no seu sítio de ligação, e a ideia geral do processo é obter um conjunto de conformações do complexo ligando-recetor e classificá-las em ordem de prioridade com base em suas estabilidades energéticas. Esta estratégia é importante não só para a descoberta de novas estruturas *hit* mas para o aperfeiçoamento de compostos líder descobertos pela aplicação de outras estratégias. (174)

5.2. *Screening* baseado no alvo

Para a descoberta de novos fármacos pode ser utilizada a estratégia de triagem baseada no alvo (“*target-based screening*”), quando o alvo terapêutico é conhecido. Nesta estratégia são utilizados conhecimentos sobre tecnologia recombinante e genética. A genética e a biologia molecular identificam genes envolvidos na doença e a tecnologia recombinante permite sua expressão e testes com amplas bibliotecas de compostos por triagem de alto rendimento (HTS). O processo de HTS é automatizado, testando milhares de compostos para avaliar a sua interação com biomoléculas alvo. (175)

Esta estratégia fornece informação sobre as características do alvo, as características do inibidor preferencial, a vulnerabilidade do alvo, o tipo de inibição e também sobre alvos promíscuos (recetores que interagem com mais de uma molécula) e alvos estabelecidos (alvos que já demonstraram vulnerabilidade a fármacos antituberculosos). (170)

Alguns exemplos de possíveis alvos vulneráveis em *Mtb* são: acetolactato sintase, chiquimato quinase, proteína quinase B, pantotenato quinase, timidilato quinase e NADH tipo II. (170)

5.3. *Screening* fenotípico

Quando o alvo terapêutico é desconhecido, ou quando se pretende encontrar um novo alvo terapêutico, recorre-se ao *screening* fenotípico. Esta estratégia baseia-se em sistemas biológicos vivos (culturas de células *in vitro* ou modelos animais) para descobrir novos

candidatos a fármacos e, principalmente, novos alvos terapêuticos, como por exemplo pequenas moléculas e péptidos que alteram o fenótipo de uma célula ou organismo, de uma maneira desejada. Nesta abordagem, bibliotecas de compostos são rastreadas quanto à atividade antibacteriana contra células micobacterianas em cultura, e os compostos *hit* progridem com base na potência, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ou seja, os candidatos a fármacos progridem para fases posteriores com base nos estudos de SAR resultantes da avaliação direta em células inteiras (“*whole cell evaluation*”), mesmo sem qualquer conhecimento do seu alvo. (176)

O *design* de novos fármacos segue geralmente a estratégia de *screening* fenotípico como ponto de partida, uma vez que várias empresas saíram prejudicadas ao iniciar o desenho de compostos com base em estudos da sua atividade inibitória de enzimas específicas, com posterior estudo do seu potencial antibacteriano, que pode não ser o desejado. Por outro lado, as moléculas desenvolvidas através desta estratégia requererão extensa investigação antes da identificação da sua atividade enzimática ideal, ou seja, antes de conhecer o alvo específico onde o composto atua. (177)

Alguns exemplos de fármacos e candidatos a fármacos desenvolvidos a partir de *screening* fenotípico são: bedaquilina, benzotiazinona, macozinona, azaindóis, telacebec (Q203) e OPC-167832. (170)

5.4. Outras estratégias

Um dos pontos de partida para o desenvolvimento de novos fármacos pode ser o aperfeiçoamento de compostos conhecidos por evidenciarem atividade contra células de *Mtb in vitro* mas que não possuem propriedades farmacêuticas que os assemelhem a um fármaco. Os esforços para resolver estas limitações são principalmente focados na análise dos dados de SAR, potência e toxicidade. Exemplos resultantes da aplicação desta estratégia são os nitroimidazóis (p.ex. delamanida e pretomanida) e análogos mais recentes de rifampicinas (p.ex. rifabutina), de isoniazida (p.ex. sudoterb ou LL 3858) e do etambutol (p.ex. SQ109). (170)

Outra estratégia contorna o desenho de novos fármacos através da reutilização de fármacos existentes. Esta estratégia é concretizada, para o tratamento de MDR-TB, através da utilização de fármacos de amplo espectro. Várias classes de fármacos antibacterianos que demonstraram atividade contra *Mtb in vitro* foram investigadas em ensaios clínicos, sendo que algumas foram já adicionadas ao regime terapêutico para a TB, estando outras nas fases de desenvolvimento. São exemplos alguns inibidores de síntese de proteínas (p.ex. estreptomicina,

oxazolidinonas como linezolida, posizolida, sutezolida, delpazolida e contezolida), β -lactâmicos (p.ex. carbapenemas, GSK070 e SPR20) e inibidores de ADN girase (p.ex. moxifloxacina, levofloxacina, ofloxacina, gatifloxacina, derivados de pirrolamida, tiazolopiridinas, aminopirazinamidas, aminopiperidina e benzimidazóis). (170)

6. Descoberta de novos alvos terapêuticos para TB

A diversidade de candidatos a novos fármacos para o combate à TB aumentou na última década. É possível acompanhar virtualmente, no local (“*site*”) do programa *Working Group on New TB Drugs*, as atualizações mais recentes do fluxo (“*pipeline*”) de novos candidatos a fármacos antituberculosos. (178,179)

O estudo de pequenas moléculas com atividade antituberculosa, baseado no *screening* fenotípico de toda a célula, era a estratégia mais eficaz para a descoberta de candidatos para a fase I dos ensaios clínicos, a partir de estruturas *hit*. (178) Esta estratégia apresenta como maior vantagem a possibilidade de encontrar novos alvos terapêuticos, ao contrário do HTS, onde as pequenas moléculas são avaliadas tendo em conta a sua afinidade por uma biomolécula alvo específica. Para tal, não é necessário o conhecimento do mecanismo de ação, mas, como foi referido anteriormente, serão necessários estudos aprofundados de modo a obter informação sobre a molécula alvo e o sítio de ligação. Acresce que muitas das moléculas encontradas através do *screening* fenotípico apresentam a desejada atividade antibacteriana, no entanto verifica-se que são moléculas que já foram identificadas e a sua ação antituberculótica foi validada, atuando sobre os mesmos alvos terapêuticos que muitos dos fármacos descritos nas orientações, o que incrementa o risco de resistência cruzada. Em contrapartida o HTS garante maior especificidade contra a molécula alvo em estudo, mas não é possível garantir que a molécula é relevante para a patogenicidade do agente infeccioso, neste caso do Mtb, pelo que esse aspeto deverá ser analisado com maior pormenor em ensaios separados do HTS. (180)

Ultimamente observou-se maior interesse na procura de novos alvos específicos no contexto de patogénese humana e sobre os estudos da sua vulnerabilidade, de modo a descobrir fármacos com maior precisão para o novo alvo. (181) Geralmente, quando se verifica que o alvo é suscetível, procede-se ao HTS, ou seja, estudo de várias pequenas moléculas, cuja relação com o alvo já foi descrita na literatura, de modo a identificar a classe química que apresente maior afinidade pelo alvo. O próximo passo são os estudos SAR, assentes principalmente nos princípios de *docking*, de modo a garantir que a molécula estabeleça as interações necessárias com o sítio de ligação, otimizando o desempenho na sua ação farmacológica. (178)

Nos capítulos posteriores serão descritas algumas classes químicas recentemente estudadas e respetivos mecanismos de ação. Os compostos das classes químicas descritas atuam em alvos terapêuticos diferentes dos associados aos fármacos utilizados na quimioterapia atual. Este aspeto alarga horizontes para uma melhor abordagem terapêutica da TB, permitindo contornar

a seleção para resistências. O método de *docking* já foi aplicado na maioria dos compostos das classes químicas descritas para uma melhor descrição da bolsa (“*pocket*“, do inglês), ou sítio de ligação e as interações entre o ligando e o recetor, no entanto serão necessários estudos de SAR para seleção de candidatos em cada classe química, antes de prosseguir para ensaios clínicos.

6.1. Derivados de Etilenodiamina e MmpL3

Com base no farmacóforo 1,2-etilenodiamina do etambutol, foram estudados 63238 compostos usando as ferramentas de HTS, os quais, seguidos por estudos de SAR (Figura 6.1), conduziram ao composto designado por SQ109, ou *Sequella*, que atualmente se encontra nas fases IIb e III de ensaios clínicos. A molécula atua contra Mtb em fase de replicação e em fase não replicativa. Para além disso, apresenta baixa toxicidade. (182,183)

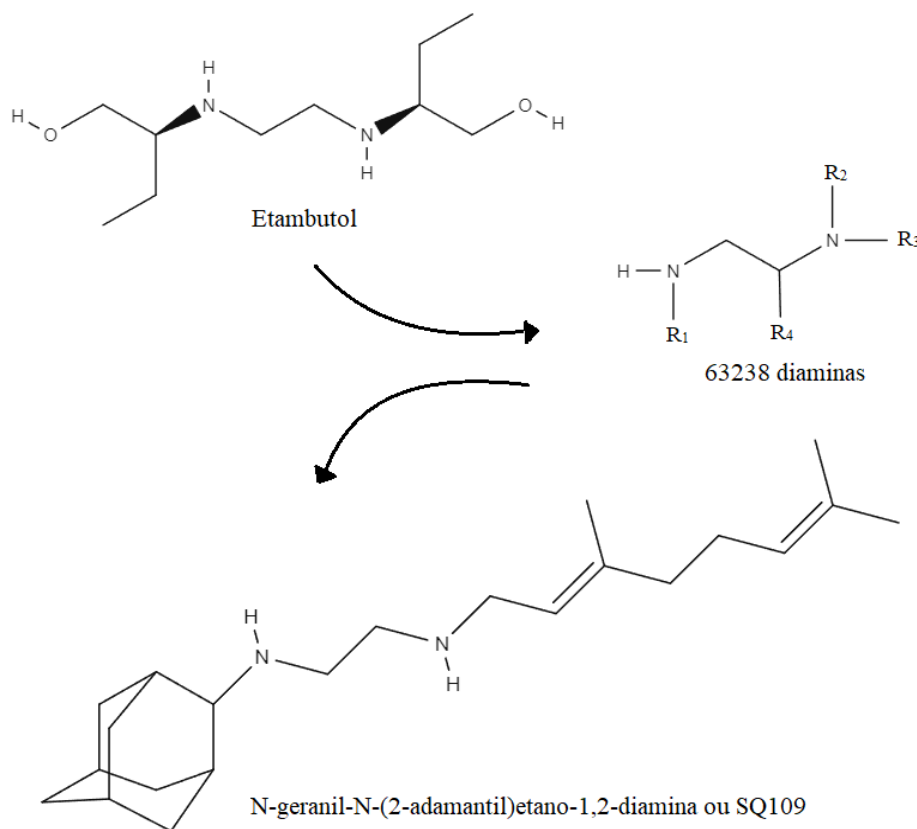


Figura 6.1 - Processo de identificação do SQ109 como novo candidato a fármaco antituberculoso (adaptado de (183))

O etambutol é administrado na dosagem 25mg/kg, associada ao aumento do risco de toxicidade ocular, e a MIC que se atinge no Mtb considera-se moderada, o que estimulou a realização de mais estudos SAR do farmacóforo do etambutol de modo a encontrar moléculas menos tóxicas, com menor MIC e mais seletivas, tal como o SQ109. (183) Foi comprovado que o SQ109 apresenta atividade bactericida dentro do MIC (0.2–0.78 µg/ml), ao contrário do etambutol que, dentro da MIC (1 µg/ml), exibe atividade bacteriostática. (183,184)

Os estudos comprovaram que a implementação do SQ109 no regime terapêutico contribui para o encurtamento deste, pois o fármaco SQ109 interage sinérgicamente com a combinação de rifampicina, isoniazida e bedaquilina. No caso da rifampicina, tal pode ser explicado pelo facto de o SQ109 promover a acumulação da rifampicina no interior da célula do Mtb devido à inibição da translocação de moléculas para o seu exterior, como consequência do seu mecanismo de ação, descrito no parágrafo seguinte. (182)

Apesar de ser derivado de etambutol e apresentar semelhanças na estrutura química, estudos realizados indicam que o mecanismo de ação do SQ109 é diferente. O SQ109 atua nas enzimas de síntese de menaquinona MenA e MenG e de proteína de membrana de micobactéria 3 (MmpL3), importante transportador dos monomicolatos de trealose, precursores do ácido micólico, sendo este último essencial para a construção da membrana da Mtb. (182,183)

A inibição do MmpL3 leva à acumulação de monomicolatos de trealose no interior da célula, incapacitando os bacilos em fase replicativa de contruir a membrana externa. O inibidor de MmpL3 atua também como desacoplador, dissipando a força motriz gerada por protões da qual depende o MmpL3, pelo que apresenta potente atividade contra Mtb hipóxico não replicante, uma vez que é um critério necessário para a formação de ATP e sobrevivência do bacilo em latência. (182)

Os estudos revelam uma relação direta entre o SQ109 e o MmpL3. No sítio de ligação entre o SQ109 e o MmpL3 (Figura 6.2), são essenciais as seguintes funcionalidades para a atividade antituberculínica: a cauda geranilo do SQ109, que estabelece interações hidrofóbicas com Val638, Ala637, Ser301, Ile249, Ile319, Leu642, Gly641, Leu686, Ile253 e Ile297; as duas funções amina, que formam pontes de hidrogénio com o Asp645; o grupo adamantilo, que encaixa na bolsa hidrofóbica formada pelos resíduos Tyr257, Phe260 e Phe649, sendo que durante a interação entre o SQ109 e MmpL3 ocorre uma disrupção de duas pontes de hidrogénio entre os resíduos Asp256-Tyr646 e Tyr257-Asp645 que são indispensáveis para a translocação de protões, sendo a consequência dessa disrupção a inibição do MmpL3. (182)

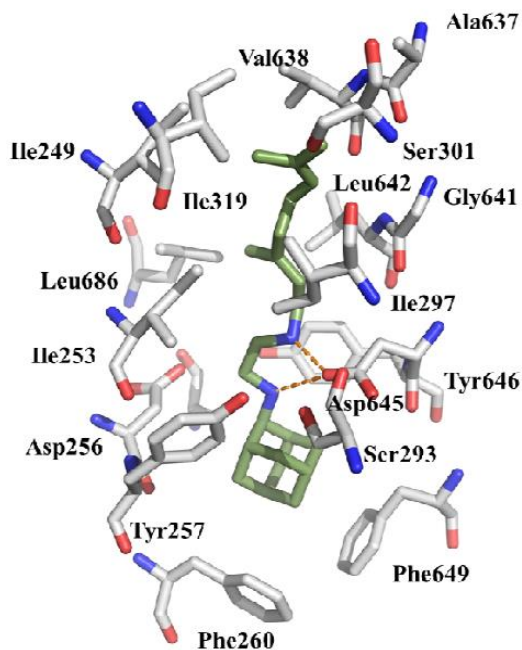


Figura 6.2 – Representação das interações a nível molecular do SQ109 (a verde) com o sítio ativo do MmpL3 (adaptado de (182))

6.2. Benzotiazinonas e DprE1

A classe de benzotiazinonas revelou-se muito promissora para o desenvolvimento de fármacos antituberculosos cujo mecanismo de ação envolve a inibição da decaprenil fosforibose epimerase (DprE1). O alvo terapêutico DprE1 é uma flavoproteína de função enzimática importante para a formação de decaprenil-fosfo-arabinose, precursor de arabinogalactano e LAM (Figura 6.3). (185) Este alvo terapêutico localiza-se no periplasma, havendo maior possibilidade de o fármaco chegar ao alvo, dada a menor dependência de poder penetrante, e só existe em procariontas, o que reduz a toxicidade dos inibidores de DprE1 nos humanos. (186)

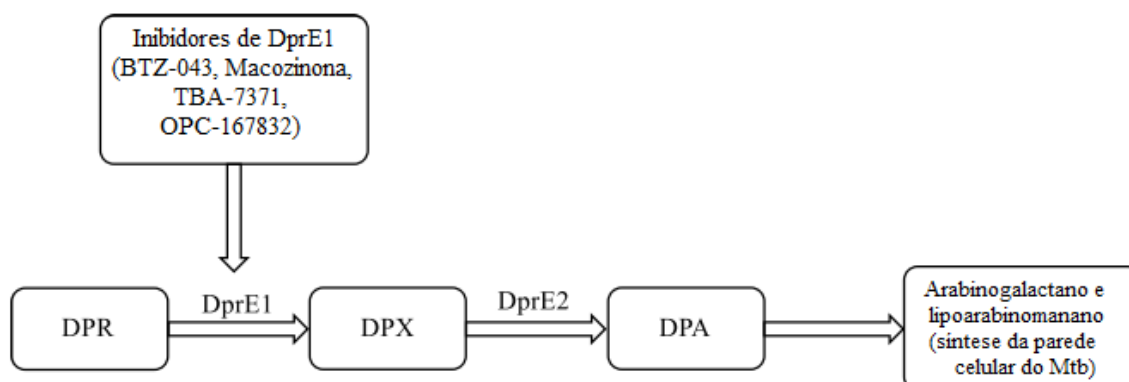


Figura 6.3 – Representação esquemática do mecanismo de ação dos inibidores de DprE1. DPR = Decaprenilfosforil-β-D-ribose, DPX = Decaprenilfosforil-2-ceto-β-D-eritro-pentofuranose, DPA = Decaprenilfosforil-β-D-arabinofuranose (adaptado de (186))

Durante as investigações realizadas demonstrou-se que a molécula BTZ-043 (Figura 6.4), definida como composto líder, apresenta potente atividade antimicrobiana contra Mtb, atuando como inibidor covalente da DprE1. Este composto encontra-se na fase II de ensaios clínicos, uma vez que completou os estudos de segurança, tolerabilidade e atividade bactericida, com MIC=1ng/mL, na fase I. (186)

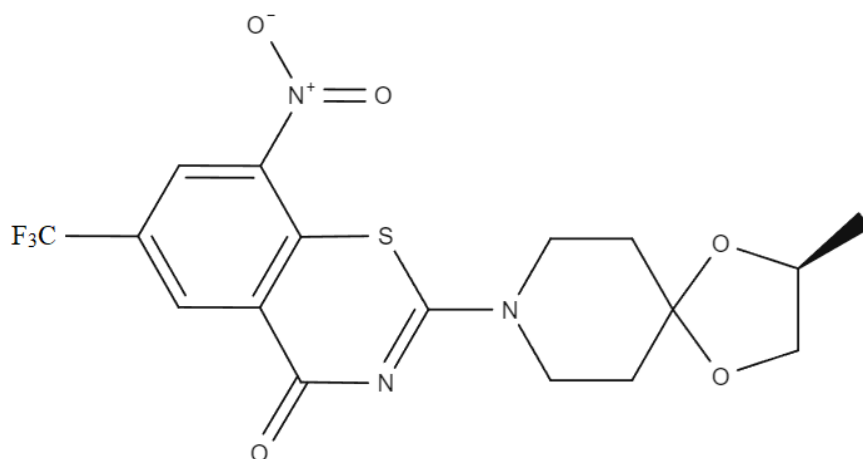


Figura 6.4 – Representação da estrutura química do BTZ-043, um inibidor covalente de DprE1.

O BTZ-043 é bioativado através da redução do grupo nitro a nitroso, que de seguida reage com o grupo tiol do resíduo Cys-387 da DprE1 formando um aduto covalente, inibindo irreversivelmente a enzima. (187) Devido à natureza eletrofílica da molécula, que é principal razão da formação da ligação covalente, existe a possibilidade de reação com as bases azotadas, nomeadamente com purinas (adenina e guanina), o que acarreta riscos de efeitos carcinogénicos e mutagénicos, bem como de genotoxicidade. De modo a limitar estes efeitos, foram desenhados inibidores de DprE1 não covalentes, como o TBA-7371 e OPC-167832, que se encontram em desenvolvimento para substituir os inibidores covalentes, ultrapassando o risco de ocorrência de efeitos mutagénicos. (186)

Como qualquer outro composto que atua inibindo a parede celular do Mtb, o BTZ-043 apresenta pouca atividade antibacteriana contra bacilos em estado não replicativo, requerendo administração concomitante de outros fármacos com potencial bacteriostático contra a bactéria em estado latente. Foi verificada sinergia entre BTZ-043 e bedaquilina, ou TMC207, um inibidor de ATP sintase, comprovada pela diminuição em 3/4 do MIC de ambos os compostos mediante a administração concomitante das duas substâncias. (185) A ATP sintase é uma das enzimas cuja atividade mantém o Mtb vivo durante o estado de latência, pelo que a associação suprarreferida propicia maior eficácia contra bacilos em estado de latência. (130) A

concentração inferior a MIC, BTZ-043 enfraquece a parede celular do Mtb e facilita a interação da bedaquilina com ATP sintase. Foi reportada a sinergia entre bedaquilina e SQ109, fundamentada pela mesma razão, ou seja, pelo facto de o candidato SQ109 atuar sobre a parede celular do Mtb, facilitando a entrada da bedaquilina na célula. (185)

6.3. 4-tiazolidinonas e AspS

Estudos de HTS envolvendo uma biblioteca de moléculas com o farmacóforo 4-tiazolidinona (Figura 6.5) revelaram a capacidade inibitória deste quimiotipo sobre a aspartil-ARN transportador (tARN) sintetase (AspS) do Mtb. (188,189)

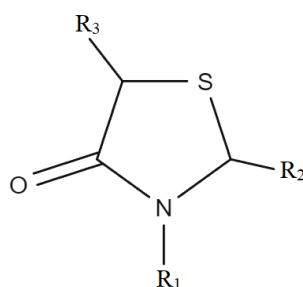


Figura 6.5 – Representação da estrutura do farmacóforo 4-tiazolidinona.

As 4-tiazolidinonas são conhecidas por apresentarem atividades biológicas diversificadas, sendo por isso uma das classes químicas mais estudadas. (190) São atribuídas a derivados de 4-tiazolidinona propriedades anti-inflamatórias, antiparasitárias, anticancerígenas, antibacterianas, antivirais, antidiabéticas, antiartríticas, a que acresce atividade agonista da hormona folículo-estimulante, capacidade inibidora da quinase 1 dependente de ciclina, e da cicloxigenase 2, entre outros. Uma das áreas mais desenvolvidas e estudadas atualmente são as propriedades antituberculosas dos derivados de 4-tiazolidinona. (191) A informação disponível indica que a atividade antituberculosa desta classe química passa pela inibição da aminoacilação efectuada pela AspS da família das enzimas aminoacil-tARN sintetase. (192) As enzimas desta família asseguram a ligação entre um aminoácido e o tARN correspondente (aminoacilação), um processo essencial para a síntese protéica. (189)

Algumas das limitações identificadas nos possíveis candidatos para inibidores de AspS do Mtb são propriedades farmacocinéticas imprecisas, interação sobre alvos não desejados e deficiências na capacidade de penetração através das membranas bacterianas. Este último aspeto orienta as futuras investigações de análogos de 4-tiazolidinona por *screening* fenotípico, através da análise do efeito das moléculas sobre a célula inteira do Mtb. (188) De entre os derivados mais investigados destacam-se os conjugados de 4-tiazolidinona-cumarina e 4-tiazolidinona-sulfametoxazol. (191,193)

6.4. Pirazolopirimidinonas e ESX-3

O ferro é um nutriente essencial para a sobrevivência de quase todos os organismos vivos, incluindo o Mtb, que infeta macrófagos e reside no ambiente de baixo teor de ferro do fagossoma. Assim, o Mtb produz sideróforos, designados por micobactina e carboximicobactina (forma solúvel da micobactina), que atuam como quelantes de íon férrico Fe^{3+} , insolúvel em soluções aquosas, condições aeróbicas e pH neutro, que posteriormente é reduzido a íon ferroso Fe^{2+} , solúvel, para ser incorporado em proteínas micobacterianas captantes de ferro, incluindo proteínas de armazenamento de ferro como bacterioferritina. (194)

Estudos de HTS com derivados de pirazolopirimidinona (Figura 6.6) mostraram um aumento de MIC em estirpes de Mtb que apresentavam mutações no gene *eccB3*, um gene que faz parte dos 11 genes que formam o *cluster esx-3* (Figura 6.7), codificador do sistema de secreção ESX-3 tipo VII. O aumento do valor de MIC em estirpes resistentes leva a considerar o ESX-3 como o alvo das pirazolopirimidinonas. (194,195) O papel do *eccB3* para a atividade do ESX-3 é desconhecida, já o ESX-3 é requerido para a captação de ferro mediado pelo sideróforo micobactina, pelo que a perda de ESX-3 está relacionada com a incapacidade do Mtb utilizar a miobactina para a captação do ferro, essencial para a sua sobrevivência. (192,194)

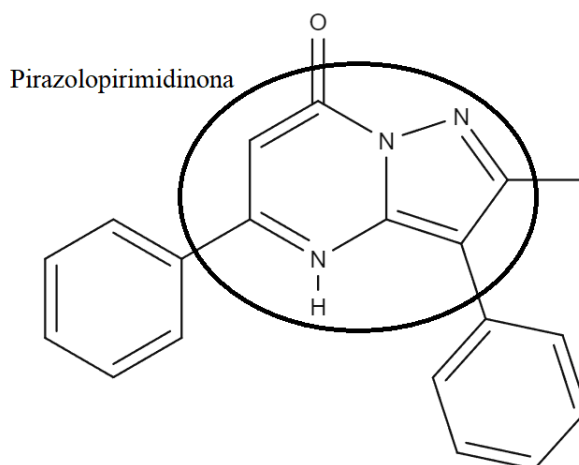


Figura 6.6 – Representação esquemática do composto *hit*, com o farmacóforo da classe das pirazolopirimidinonas assinalado pelo círculo (adaptado de (195))

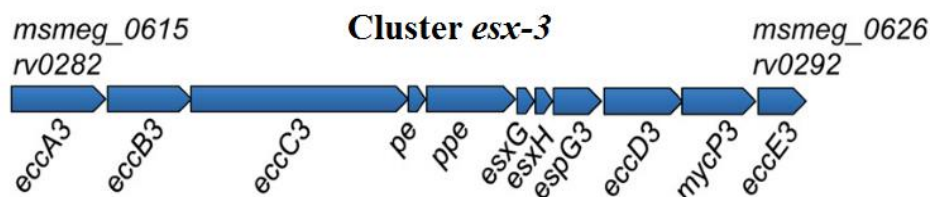


Figura 6.7 – Representação do *cluster esx-3* (adaptado de (194))

O ESX-3 não é o verdadeiro alvo das pirazolopirimidinonas, em vez disso as pequenas moléculas perturbam o metabolismo do ferro, atuando o farmacóforo pirazolopirimidinona como quelante de íons ferro. (194)

6.5. Moléculas com anel benzofurano e Pks13

O policetídeo sintase 13 (Pks13) é reconhecido como alvo de elevado interesse para o desenvolvimento de fármacos antituberculóticos, uma vez que cataliza a formação dos precursores do ácido micólico. É responsável pela condensação de dois ácidos gordos em cadeia α -alquil β -cetoacilo, o último precursor do ácido micólico, sendo também o alvo de fármacos antituberculóticos estabelecidos, como a isoniazida e a etionamida. (196,197)

O Pks13 apresenta domínios distintos, que participam na reação de condensação com funções diferentes: transportador de acilo, β -cetoacil-sintase, aciltransferase e tioesterase. O domínio tioesterase é responsável pelas reações de transferência e liberação dos grupos acilo, que são essenciais para a formação dos ácidos micólicos e seus precursores. (196,198)

O Pks13, é um alvo bem caracterizado, pelo que para o desenvolvimento de novos fármacos inibidores de Pks13 recorre-se ao *screening* baseado no alvo, para otimizar a interação de pequenas moléculas com o recetor (Pks13). As moléculas com anel benzofurano são descritas como portadoras de várias propriedades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana (inclusivé antituberculínica), e anticancerígena. Essas moléculas, em que o composto líder é o Tam16 (Figura 6.8), atuam como inibidores do domínio tioesterase do Pks13. (196) A alteração de um único nucleótido no gene *pks13*, gene codificador do Pks13, leva ao aparecimento de estirpes resistentes aos compostos com o grupo benzofurano, justificando a suscetibilidade aos potenciais fármacos do alvo em estudo. (197)

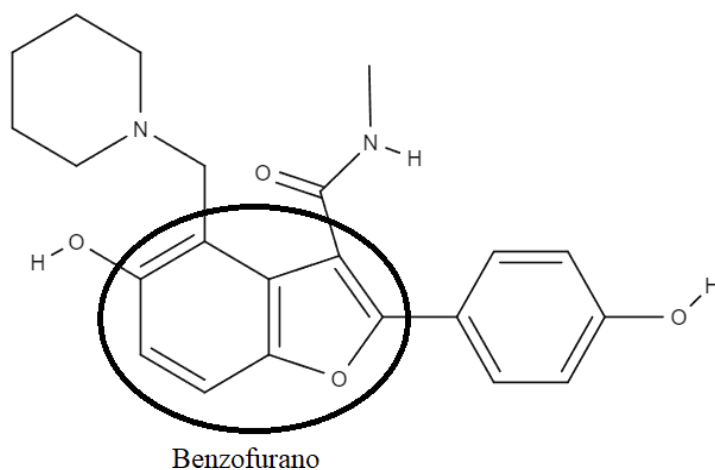


Figura 6.8 – Representação da estrutura química do composto Tam16, composto líder da classe dos benzofuranos, e do farmacóforo benzofurano assinalado pelo círculo (adaptado de (199))

O inibidor Tam16 interage de forma efetiva com os resíduos catalíticos His1699 (α 10 hélice), Ser1533 (α 7 hélice) e Asp1560 (cadeia β 5), o que contribui para o equilíbrio e a manutenção da estabilidade estrutural desses resíduos e das cadeias polipeptídicas das quais fazem parte. Além disso, a estrutura do benzofurano interage com os resíduos Phe1670 e Asn1640, o que permite manter a “alça” que liga as hélices α 4 e α 8 com menor liberdade de movimento. As interações descritas encontram-se representadas na Figura 6.9, onde também é mostrada a sobreposição da molécula no sítio alvo do Pks13. (199)

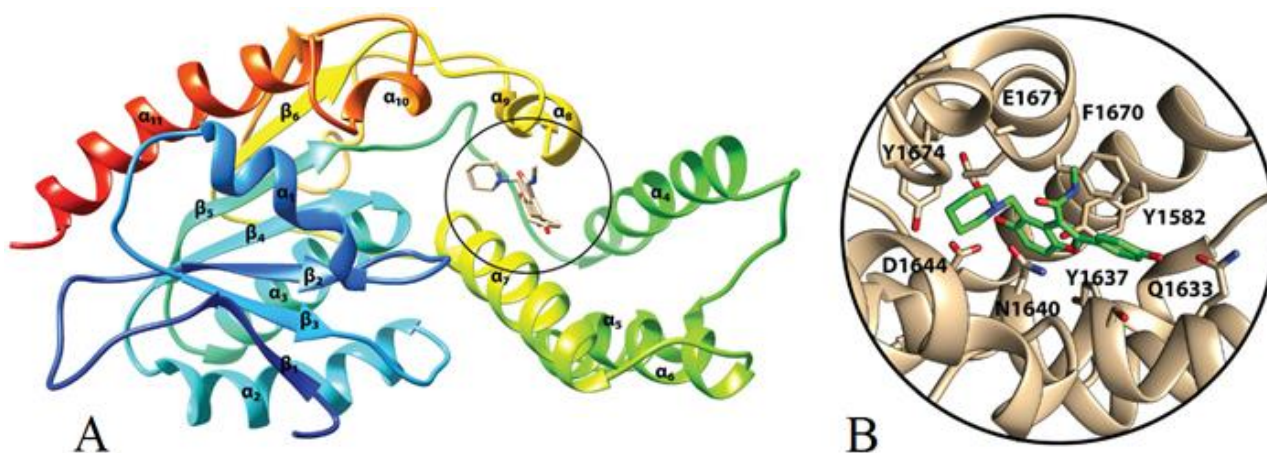


Figura 6.9 – A - Modelação da sobreposição do Tam13 com o sítio ativo do Pks13; B – Representação do Tam16 no sítio ativo e dos aminoácidos relevantes para a interação com a molécula (adaptado de (196))

A informação disponível mostra que todos esses aspetos deverão ser tidos em conta no desenho de novas moléculas baseadas no benzofurano. (199) Atualmente, encontram-se em fase de ensaios clínicos os derivados de cumestano, obtidos a partir de moléculas com anel benzofurano através da ligação do grupo éster com o grupo fenil. (196,197) Na Figura 6.10 encontra-se o esquema simplificado da síntese do cumestano a partir do derivado de benzofurano.

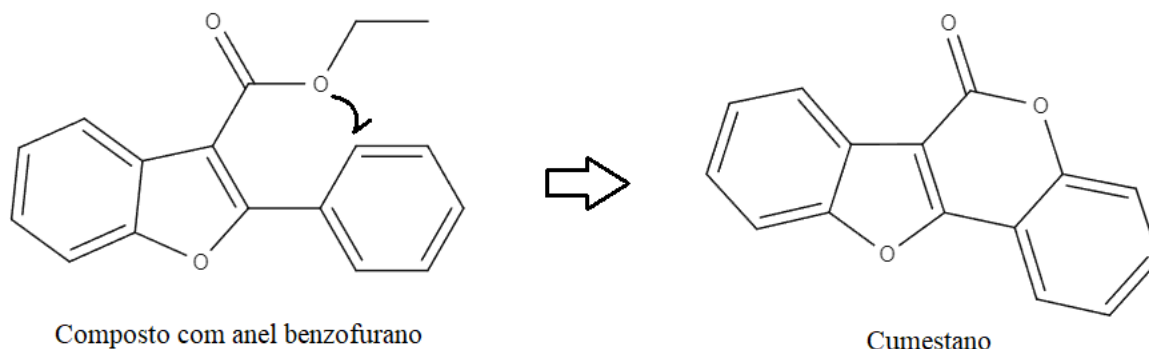


Figura 6.10 – Representação esquemática da síntese do cumestano a partir do correspondente derivado de benzofurano (adaptado de (197))

6.6. 1,2,4-Oxadiazóis e EthR

Devido à sua vasta atividade biológica, os 1,2,4-oxadiazóis são estudados relativamente ao seu potencial como novos fármacos, nomeadamente como antitússicos, anti-inflamatórios, antituberculosos e anticancerígenos. O anel de oxadiazol exibe propriedades hidrofílicas e de doador de elétrões, tornando a molécula mais resistente a alterações térmicas e a perturbações no ambiente químico e assim potenciando a estabilidade metabólica da molécula. (200)

No âmbito da terapêutica da TB, os 1,2,4-oxadiazóis foram desenhados com o propósito de estimular a bioativação da isoniazida, fármaco descrito no capítulo 2.1.1. Os compostos desta classe química inibem o EthR, codificado pelo gene *ethR*, que funciona como repressor da monooxigenase EthA, que por sua vez é a enzima responsável pela ativação da isoniazida. Assim, a coadministração dos compostos deste grupo tem como objetivo aumentar a taxa de bioativação de isoniazida e, como consequência, aumentar a concentração do fármaco em circulação sem ser necessário aumentar a dosagem a ser administrada, mitigando o risco de provocar as reações adversas associadas à toma de isoniazida, como distúrbios intestinais, hepatite, ansiedade e depressão. Sem a administração dos 1,2,4-oxadiazóis o risco de reações adversas é maior, uma vez que a MIC da isoniazida administrada é geralmente suficiente para provocar qualquer uma das reações adversas mencionadas. (138)

Novos derivados de oxadiazol, inibidores de EthR, são atualmente objeto de estudo, para com base nas suas características farmacocinéticas *in vivo* selecionar o potencial fármaco antituberculoso. Um exemplo é o composto BDM41906, designado por “etionamida *booster*”, que se encontra na fase II dos ensaios clínicos como agente antituberculoso. (200) O farmacóforo dos 1,2,4-oxadiazóis bem como a estrutura química do composto BDM41906 encontram-se representados na Figura 6.11.

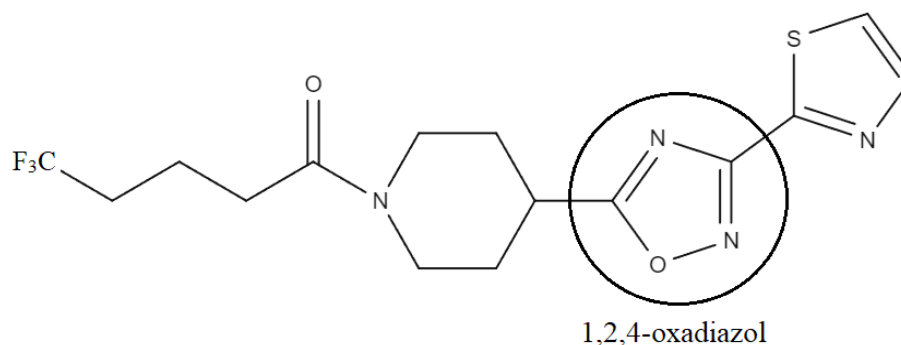


Figura 6.11 – Representação da estrutura química do composto BDM41906 e do farmacóforo 1,2,4-oxadiazol assinalado pelo círculo (adaptado de (200))

6.7. Difenil-ureias e GuaB2

A GuaB2 é uma inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH) que participa na biossíntese de nucleótidos de purina essenciais para a síntese de ADN e ARN. É a enzima responsável pela conversão da inosina 5'-monofosfato em xantosina 5'-monofosfato, junto com a conversão de NAD^+ em NADH . A xantosina 5'-monofosfato é então convertida em guanosina monofosfato. O mecanismo mais detalhado encontra-se representado na Figura 6.12. (177,201)

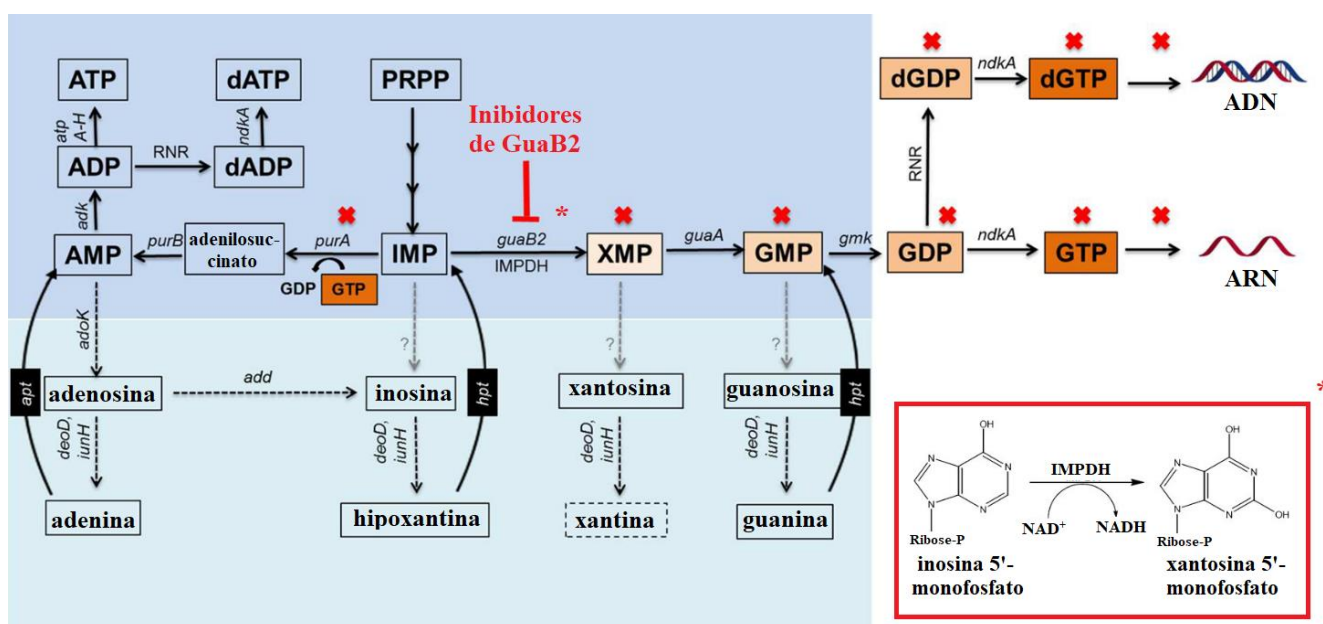


Figura 6.12 – Representação esquemática do mecanismo de ação dos inibidores de GuaB2, com referência a consequências da inibição de GuaB2. *add* = Adenosina Deaminase, *adk* = Adenilato Quinase, ADP = Adenosina Difosfato, *adoK* = Adenosina Quinase, AMP = Adenosina 5'-Monofosfato, *apt* = Adenina Fosforibosiltransferase, ATP = Adenosina Trifosfato, *atpA-H* = ATP sintase, dADP, Deoxiadenosina Difosfato, dATP = Deoxiadenosina Trifosfato, *deoD* = Purina Nucleósido Fosforilase, dGDP = Deoxiguanosina Difosfato, dGTP = Deoxiguanosina Trifosfato, *gmk* = Guanilato Quinase, GMP = Guanosina 5'- Monofosfato, GDP = Guanosina Difosfato, GTP = Guanosina Trifosfato, *guaA* = GMP Sintase, *guaB2* = Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH), *hpt* = Hipoxantina Guanina Fosforibosiltransferase, IMP = Inosina 5'- Monofosfato; *inunH* = Purina Nucleosidase, NAD^+ e NADH = Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina, *ndkA* = Nucleosido Difosfato Quinase, PRPP = 5-Fosforibosil 1-Pirofosfato, *purA* = Adenilosuccinato Sintetase, *purB* = Adenilosuccinato Liase, RNR = Ribonucleotido Redutase, XMP = Xantosina 5'-Monofosfato (adaptado de (177,201))

No Mtb, a GuaB é codificada em três genes: *guaB1*, *guaB2* e *guaB3*, sendo que só os genes *guaB2* e *guaB3* se encontram localizados num operão. No entanto, com base nos estudos de mutagênese da transposição, verificou-se que somente a enzima GuaB2 codifica IMPDH funcional. (177,202)

Foi verificado que a depleção da GuaB2 no Mtb apresenta perfil bactericida *in vitro*, nos macrófagos e *in vivo*, nomeadamente nos pulmões dos murinos, pelo que GuaB2 é validada como um novo alvo dos futuros fármacos contra TB, estimulando novos estudos dos compostos *hit* com atividade bactericida. (201) Os inibidores dessa enzima apresentariam a desejada especificidade, devido ao mecanismo de ação único, e evitar-se-ia a inibição cruzada da enzima IMPDH humana, que compartilha só 41% da sequência genómica da enzima bacteriana. (202)

Através de *screening* fenotípico, o motivo difenil-ureia foi reconhecido como potencial inibidor de quinases e de IMPDH do Mtb, nomeadamente de GuaB2. Atualmente estão em estudo 3 derivados de difenil-ureia, os compostos 7834535 (DPU-1), 7285642 (DPU-2) e 7275166 (DPU-3), cujas estruturas químicas se encontram representadas na Figura 6.13. (177) Os compostos desta classe mimetizam o NAD⁺ e NADH, pelo que a inibição da enzima passa pela ocupação do sítio onde se liga o grupo nicotinamida do NADH, com formação de interações com o anel purina de inosina 5'-monofosfato. (203)

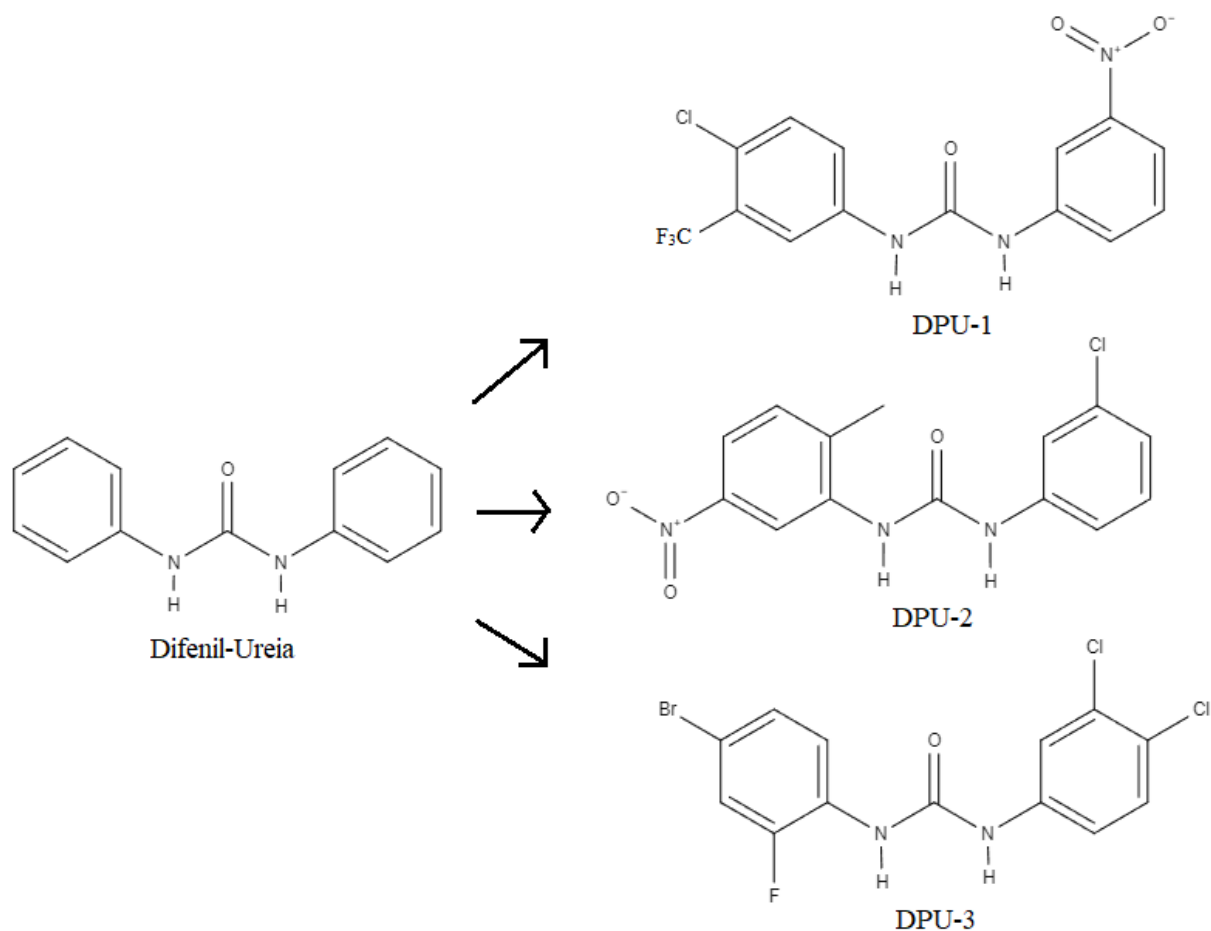


Figura 6.13 – Representação da estrutura química do farmacóforo difenil ureia e dos compostos DPU-1, DPU-2 e DPU-3 (adaptado de (203))

Conclusão

A terapêutica atual contra a TB é de longa duração e acarreta o surgimento de reações adversas, o que prejudica a adesão à terapêutica. A toma incorreta da medicação, por sua vez, gera concentrações subterapêuticas de fármaco circulante que favorecem o desenvolvimento de estirpes de Mtb resistentes aos fármacos disponíveis.

Para minimizar o desenvolvimento de resistências é essencial promover a educação do doente, no entanto em países menos desenvolvidos a adesão é maioritariamente afetada por dificuldades financeiras. Para ultrapassar as resistências e promover a eficácia o esquema terapêutico é baseado na toma concomitante de vários fármacos antituberculosos, o que aumenta ainda mais o risco de desenvolvimento de reações adversas e de manifestação de interações medicamentosas, aumentando o custo do tratamento.

A disseminação de estirpes de Mtb multirresistentes tornou evidente a importância do desenho e desenvolvimento de novos fármacos que apresentem menor toxicidade, que sejam capazes de diminuir a duração de tratamento, com novas formulações, mais baratas e fáceis de utilizar. Também é consensual entre a comunidade científica que o desenvolvimento de novos fármacos deve assentar na identificação de novos alvos de Mtb, ou seja, buscando moléculas que atuem sobre alvos terapêuticos distintos dos implicados nos fármacos atuais, assim majorando a probabilidade de eficácia contra as estirpes resistentes.

Tendo em conta toda a pesquisa feita em torno do tema, são evidentes os progressos no que toca ao tratamento e controlo de Mtb. Atualmente decorrem importantes estudos em torno da TB latente, visando desenvolver fármacos que atuem sobre a micobactéria no estado dormente e não só em estado de replicação, o que contribuirá para um maior controlo da doença e para a diminuição do índice de transmissibilidade.

Com o reforço da investigação para a descoberta de novas terapêuticas que colmatem as necessidades do tratamento contra a TB, são constantemente desenhadas novas moléculas e propostos novos candidatos a fármacos, após estudos usando vários métodos de triagem. Este trabalho descreve algumas classes químicas promissoras, resultantes de investigação mais recente, assinalando a amplitude do trabalho realizado mas também do trabalho que ainda deverá ser desenvolvido para que alguns dos candidatos selecionados possam ampliar o arsenal de fármacos disponíveis para sua futura utilização em humanos.

Das classes químicas estudadas ao longo deste trabalho, as moléculas mais promissoras a assinalar são o derivado de etilenodiamina SQ109 como inibidor do transportador MmpL3, que se encontra atualmente nas fases IIb e III de ensaios clínicos; o composto BTZ-043, um inibidor da DprE1, considerado o composto líder da classe das benzotiazinonas; o composto Tam16, um inibidor de Pks13, considerado como o composto líder da classe dos derivados de benzofurano; o composto BDM41906, um oxadiazol que se encontra na fase II dos ensaios clínicos e atua como inibidor de EthR, e 3 derivados de difenil-ureia, os compostos DPU-1, DPU-2 e DPU-3, que atuam como inibidores de GuaB2.

Finalmente, é consensual que um maior controlo sobre a doença requer forte investimento no desenvolvimento de vacinas, por forma a que o mundo possa contar com uma vacina que apresente maior eficácia em pessoas das faixas etárias superiores, de modo a diminuir o número de infetados e a incidência de desenvolvimento de doença a nível global. Estão em curso estudos visando a implementação de vacinas que previnam a infeção pelo Mtb, por exemplo, a vacina DAR-90.

Bibliografia

1. Gordon S V, Parish T. Microbe Profile: Mycobacterium tuberculosis: Humanity's deadly microbial foe. *Microbiology*. 2018;164(4):437–9.
2. Baya B, Diarra B, Diabate S, Kone B, Goita D, Sarro Y dit S, et al. Association of Mycobacterium africanum Infection with Slower Disease Progression Compared with Mycobacterium tuberculosis in Malian Patients with Tuberculosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2020;102(1):36–41.
3. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, Novak SM, Rowlinson M-C, Salfinger M, et al. Practice Guidelines for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(2):1–66.
4. Bloom BR, Atun R, Cohen T, Dye C, Fraser H, Gomez GB, et al. Tuberculosis. In: *Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 6): Major Infectious Diseases*. The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2017. p. 233–313.
5. Campo M, Kawamura M, MD, MPH. Patient Education - Tuberculosis: Information Series. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195:7–8.
6. Massabni AC, Bonini EH. Tuberculose: história e evolução dos tratamentos da doença. *Rev Bras Multidiscip*. 2019;22(2):6–34.
7. Zellwegwer J-P, Sotgiu G, Corradi M, Durando P. The diagnosis of latent tuberculosis infection (LTBI): currently available tests, future developments, and perspectives to eliminate tuberculosis (TB). *Med Lav*. 2020;111(3):170–83.
8. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg*. 2017;58(1):E9-12.
9. Prabhu R, Singh V. The History of Tuberculosis: Past, Present, and Future. *Adv Microbiol*. 2019;9(11):931–42.
10. Frith J. History of Tuberculosis. Part 1 - Phthisis, consumption and the White Plague. *History*. 2014;22(2):29–35.
11. Bhattacharya S, Bynum H, Gradmann C, Brimnes N, Altink H, Falzon D, et al.

- Tuberculosis, A Short History. Medcalf A, Altink H, Saavedra M, Bhattacharya S, editors. Hyderabad: Orient Blackswan Private Limited; 2013. 1–45 p.
12. Taylor GM, Stewart GR, Cooke M, Chaplin S, Ladva S, Kirkup J, et al. Koch's Bacillus - A look at the first isolate of Mycobacterium tuberculosis from a modern perspective. *Microbiology*. 2003;149(11):3213–20.
 13. Murray JF, Schraufnagel DE, Hopewell PC. Treatment of Tuberculosis, A Historical Perspective. *ATS Discov Ser*. 2015;12(12):1749–59.
 14. Al-Humadi HW, Al-Saigh RJ, Al-Humadi AW. Addressing the challenges of tuberculosis: A brief historical account. *Front Pharmacol*. 2017;8(689):1–10.
 15. Mondoni M, Centanni S, Sotgiu G. New perspectives on difficult-to-treat tuberculosis based on old therapeutic approaches. *Int J Infect Dis*. 2020;92S:S91–9.
 16. Geneva: World Health Organization. Global tuberculosis report 2021.
 17. Serviço Nacional de Saúde. Tuberculose | Redução de casos [Internet]. 2021 [cited 2022 Mar 15]. Available from: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2021/10/15/tuberculose-reducao-de-casos-2/>
 18. Pereira L. Parecer MCEESIP Nº 02/ 2016. In [cited 2022 Apr 1]. Available from: https://www.ordemenfermeiros.pt/arquivo/documentos/Documents/MCEESIP_Parecer_02_2016_VacinacaoTuberculoseCriançasGruposRisco.pdf
 19. Wildner LM, Nogueira CL, Souza S. Micobactérias : Epidemiologia e Diagnóstico. *Rev Patol Trop*. 2011;40(3):207–29.
 20. Zulu M, Monde N, Nkhoma P, Malama S, Munyeme M. Nontuberculous Mycobacteria in Humans, Animals, and Water in Zambia: A Systematic Review. *Front Trop Dis*. 2021;2(679501):1–13.
 21. Van Ingen J. Diagnosis of Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Respir Crit Care Med*. 2013;34(1):103–9.
 22. Sakamoto K. The Pathology of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Vet Pathol*. 2012;49(3):423–39.
 23. Khandelwal S, Dubey W. Overview of Mycobacterium: A Review. *Eur J Mol Clin Med*. 2020;7(11):6198–213.

24. Batt SM, Minnikin DE, Besra GS. The thick waxy coat of mycobacteria, a protective layer against antibiotics and the host's immune system. *Biochem J.* 2020;477(10):1983–2006.
25. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 2018;14(49):5–14.
26. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011(814943):1–17.
27. Hirayama D, Iida T, Nakase H. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(92):1–14.
28. Thornton CS, Mellett M, Jarand J, Barss L, Field SK, Fisher DA. The respiratory microbiome and nontuberculous mycobacteria: an emerging concern in human health. *Eur Respir Rev.* 2021;30(200299):1–15.
29. Jimenez-Duran G, Luque-Martin R, Patel M, Koppe E, Bernard S, Sharp C, et al. Pharmacological validation of targets regulating CD14 during macrophage differentiation. *EBioMedicine* 61. 2020;61(103039):1–11.
30. Lam A, Prabhu R, M. Gross C, Riesenber LA, Singh V, Aggarwal S. Role of apoptosis and autophagy in tuberculosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017;313(2):L218–29.
31. Robinson CM, Nau GJ. Interleukin-12 and Interleukin-27 Regulate Macrophage Control of Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis.* 2008;198(3):359–66.
32. Kisuya J, Chemtai A, Raballah E, Keter A, Ouma C. The diagnostic accuracy of Th1 (IFN- γ , TNF- α , and IL-2) and Th2 (IL-4, IL-6 and IL-10) cytokines response in AFB microscopy smear negative PTB- HIV co-infected patients. *Sci Rep.* 2019;9(2966):1–12.
33. Chandrasekharan UM, Siemionow M, Unsal M, Yang L, Poptic E, Bohn J, et al. Tumor necrosis factor α (TNF- α) receptor-II is required for TNF- α -induced leukocyte-endothelial interaction in vivo. *Blood.* 2007;109(5):1938–44.
34. Awad AS, You H, Gao T, Cooper TK, Nedospasov SA, Vacher J, et al. Macrophage-derived tumor necrosis factor- α mediates diabetic renal injury. *Kidney Int.* 2015;88(4):722–33.

35. Couto Teixeira H, Abramo C, Munk ME. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso . *J Bras Pneumol*. 2007;33(3):323–34.
36. Dispenza MC. Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc*. 2019;40(6):470–3.
37. Guler R, Ozturk M, Sabeel S, Motaung B, Parihar SP, Thienemann F, et al. Targeting Molecular Inflammatory Pathways in Granuloma as Host-Directed Therapies for Tuberculosis. *Front Immunol*. 2021;12(733853):1–16.
38. Coulter C, National Tuberculosis Advisory Committee. Infection control guidelines for the management of patients with suspected or confirmed pulmonary tuberculosis in healthcare settings. *Policy Guidel*. 2016;40(3):E360–6.
39. Churchyard G, Kim P, Shah NS, Rustomjee R, Gandhi N, Mathema B, et al. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. *J Infect Dis*. 2017;216(S6):S629–35.
40. Concepcion NDP, Laya BF, Andronikou S, Daltro PAN, Sanchez MO, Uy JAU, et al. Standardized radiographic interpretation of thoracic tuberculosis in children. *Pediatr Radiol*. 2017;47(10):1237–48.
41. Moule MG, Cirillo JD. Mycobacterium tuberculosis Dissemination Plays a Critical Role in Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(65):1–12.
42. Delgado BJ, Bajaj T. Ghon Complex. *StatPearls* [Internet]. 2021 [cited 2022 Mar 26]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551706/>
43. Mirzaei R, Babakhani S, Ajorloo P, Ahmadi RH, Hosseini-Fard SR, Keyvani H, et al. The emerging role of exosomal miRNAs as a diagnostic and therapeutic biomarker in Mycobacterium tuberculosis infection. *Mol Med*. 2021;27(34):1–31.
44. Nachiappan AC, Rahbar K, Shi X, Guy ES, Mortani Barbosa EJ, Shroff GS, et al. Pulmonary tuberculosis: Role of radiology in diagnosis and management. *Radiographics*. 2017;37(1):52–72.
45. Qiu B, Wu Z, Tao B, Li Z, Song H, Tian D, et al. Risk factors for types of recurrent tuberculosis (reactivation versus reinfection): A global systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2022;116:14–20.

46. Burrill J, Williams CJ, Bain G, Conder G, Hine AL, Misra RR. Tuberculosis: A Radiologic Review. *RadioGraphics*. 2007;27(5):1255–73.
47. van Leeuwen LM, Boot M, Kuijl C, Picavet DI, van Stempvoort G, van der Pol SMA, et al. Mycobacteria employ two different mechanisms to cross the blood–brain barrier. *Cell Microbiol*. 2018;20(e12858):1–17.
48. Seedat UF, Seedat F. Post-primary pulmonary TB haemoptysis – When there is more than meets the eye. *Respir Med Case Reports*. 2018;25:96–9.
49. Hunter RL, Actor JK, Hwang SA, Khan A, Urbanowski ME, Kaushal D, et al. Pathogenesis and Animal Models of Post-Primary (Bronchogenic) Tuberculosis, A Review. *Pathog* 2018, Vol 7, Page 19. 2018;7(19):1–11.
50. Cross AS. What is a virulence factor? *Crit Care*. 2008;12(196):1–2.
51. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, García JS, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, et al. Virulence factors of the mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence*. 2013;4(1):3–66.
52. Upadhyay S, Mittal E, Philips JA. Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. *Pathog Dis*. 2018;76(4):1–12.
53. Bussi C, Gutierrez MG. Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(4):341–61.
54. Méndez-López M V. Genes y determinantes de virulencia de Mycobacterium tuberculosis que contribuyen a la evasión de la respuesta inmune. *Vaccimonitor*. 2020;29(2):82–92.
55. Lienard J, Nobs E, Lovins V, Mover E, Valfridsson C, Carlsson F. The Mycobacterium marinum ESX-1 system mediates phagosomal permeabilization and type I interferon production via separable mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(2):1160–6.
56. Augenstreich J, Arbues A, Simeone R, Haanappel E, Wegener A, Sayes F, et al. ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of Mycobacterium tuberculosis act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis. *Cell Microbiol*. 2017;19(e12726):1–19.
57. Cambier CJ, O’Leary SM, O’Sullivan MP, Keane J, Ramakrishnan L. Phenolic Glycolipid Facilitates Mycobacterial Escape from Microbicidal Tissue-Resident

- Macrophages. *Immunity*. 2017;47(3):552–65.
58. Court N, Rose S, Bourigault ML, Front S, Martin OR, Dowling JK, et al. Mycobacterial PIMs inhibit host inflammatory responses through CD14-dependent and CD14-independent mechanisms. *PLoS One*. 2011;6(9):1–12.
 59. Bajaj D, Batra JK. 14 - Heat Shock Proteins in Mycobacterium tuberculosis: Involvement in Survival and Virulence of the Pathogen. In: Cardona P-J, editor. *Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli*. InTech; 2012. p. 256–76.
 60. Bulut Y, Michelsen KS, Hayrapetian L, Naiki Y, Spallek R, Singh M, et al. Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins use diverse toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *J Biol Chem*. 2005;280(22):20961–7.
 61. Jee B, Singh Y, Yadav R, Lang F. Small Heat Shock Protein16.3 of Mycobacterium tuberculosis: After Two Decades of Functional Characterization. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(1):368–80.
 62. Srivastava SK, Ruigrok VJB, Thompson NJ, Trilling AK, Heck AJR, Van Rijn C, et al. 16 kDa Heat Shock Protein from Heat-Inactivated Mycobacterium tuberculosis Is a Homodimer-Suitability for Diagnostic Applications with Specific Llama VHH Monoclonals. *PLoS One*. 2013;8(5):1–11.
 63. López M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. The 19-kDa Mycobacterium tuberculosis protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol*. 2003;170(5):2409–16.
 64. Braunstein M, Bensing BA, Sullam PM. The Two Distinct Types of SecA2-Dependent Export Systems. *Microbiol Spectr*. 2019;7(3):1–17.
 65. Kolbe K, Veleti SK, Reiling N, Lindhorst TK. Lectins of Mycobacterium tuberculosis – rarely studied proteins. *Beilstein J Org Chem*. 2019;15(1):1–15.
 66. Shah GH, Ewetola R, Etheredge G, Maluantesa L, Waterfield K, Engetele E, et al. Risk factors for tb/hiv coinfection and consequences for patient outcomes: Evidence from 241 clinics in the Democratic republic of Congo. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(5165):1–13.
 67. Bruchfeld J, Correia-Neves M, Källenius G. Tuberculosis and HIV Coinfection. *Cold*

- Spring Harb Perspect Med. 2015;5(a017871):1–15.
68. Bento J, Silva AS, Rodrigues F, Duarte R. Métodos Diagnósticos em Tuberculose. *Acta Med Port.* 2011;21(1):145–54.
 69. Scriba TJ, Netea MG, Ginsberg AM. Key recent advances in TB vaccine development and understanding of protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol.* 2020;50(101431):1–10.
 70. Kaufmann SHE, Parida SK. Tuberculosis in Africa: Learning from Pathogenesis for Biomarker Identification. *Cell Host Microbe.* 2008;4(3):219–28.
 71. Koch R, Calmette A, Guérin C, Kaufmann SHE. Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(9):699–704.
 72. Weerasuriya CK, Clark RA, White RG, Harris RC. New tuberculosis vaccines: advances in clinical development and modelling. *J Intern Med.* 2020;288(6):661–81.
 73. Bansal R, Sharma D, Singh R. Tuberculosis and its Treatment: An Overview. *Mini-Reviews Med Chem.* 2016;18(1):58–71.
 74. Peixoto AS, Araújo RM, Schindler HC, Pimentel LMLM. Treatment of Sensitive Tuberculosis: Mechanisms of Action and Resistance. *J Sci Tech Res.* 2019;18(4):13715–8.
 75. Geneva: World Health Organization. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care, 2017 update.
 76. Geneva: World Health Organization. Consolidated Guidelines on Drug-Resistant Tuberculosis Treatment.
 77. Singh R, Dwivedi SP, Gaharwar US, Meena R, Rajamani P, Prasad T. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Appl Microbiol.* 2020;128(6):1547–67.
 78. Fernandes GF, Salgado HR, Santos JL. Isoniazid: A Review of Characteristics, Properties and Analytical Methods. *Crit Rev Anal Chem.* 2017;47(4):298–308.
 79. Khan SR, Manialawy Y, Siraki AG. Isoniazid and host immune system interactions: A proposal for a novel comprehensive mode of action. *Br J Pharmacol.* 2019;176(24):4599–608.

80. Lavender C, Globan M, Sievers A, Billman-Jacobe H, Fyfe J. Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates Collected in Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(10):4074.
81. Ushtanit A, Kulagina E, Mikhailova Y, Makarova M, Safonova S, Zimenkov D. Molecular Determinants of Ethionamide Resistance in Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antibiotics.* 2022;11(133):1–10.
82. Arun KB, Madhavan A, Abraham B, Balaji M, Sivakumar KC, Nisha P, et al. Acetylation of isoniazid is a novel mechanism of isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65(1):e00456-20; 1–17.
83. Abraham AO, Nasiru AU, Abdulazeez AK, Seun OO, Ogbonna DW. Mechanism of Drug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis. *Am J Biomed Sci Res.* 2020;7(5):378–83.
84. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119628; 1–13.
85. Angelova VT, Valcheva V, Pencheva T, Voynikov Y, Vassilev N, Mihaylova R, et al. Synthesis, antimycobacterial activity and docking study of 2-aryloxy-1-benzopyrano[4,3-c]pyrazol-4(1H)-one derivatives and related hydrazide-hydrazones. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2017;27(13):2996–3002.
86. Ma Z, Ginsberg AM, Spigelman M. Antimycobacterium agents. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry II.* 2006. p. 699–730.
87. Yendapally R, Lee RE. Design, synthesis, and evaluation of novel ethambutol analogues. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2008;18(5):1607–11.
88. Da Silva Lima CH, Cã Ferreira Bispo MDL, De Souza MVN. Pyrazinamide: An essential drug in the tuberculosis treatment. *Rev Virtual Quim.* 2011;3(3):159–80.
89. Adams RA, Leon G, Miller NM, Reyes SP, Thantrong CH, Thokkadam AM, et al. Rifamycin antibiotics and the mechanisms of their failure. *J Antibiot (Tokyo).* 2021;74(11):786–98.
90. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell.* 2001;104(6):901–12.

91. Njire M, Tan Y, Mugweru J, Wang C, Guo J, Yew WW, et al. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Review and update. *Adv Med Sci*. 2016;61(1):63–71.
92. Gopal P, Grüber G, Dartois V, Dick T. Pharmacological and Molecular Mechanisms Behind the Sterilizing Activity of Pyrazinamide. *Trends Pharmacol Sci*. 2019;40(12):930–40.
93. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr*. 2013;2(4):1–12.
94. den Hertog AL, Sengstake S, Anthony RM. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* fails to bite? *Pathog Dis*. 2015;73(6):1–5.
95. Miotto P, Cabibbe AM, Feuerriegel S, Casali N, Drobniewski F, Rodionova Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamide resistance determinants: A multicenter study. *MBio*. 2014;5(5):e01819-14;1-10.
96. Zhu C, Liu Y, Hu L, Yang M, He ZG. Molecular mechanism of the synergistic activity of ethambutol and isoniazid against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*. 2019;293(43):16741–50.
97. Li MC, Chen R, Lin SQ, Lu Y, Liu HC, Li GL, et al. Detecting Ethambutol Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in China: A Comparison Between Phenotypic Drug Susceptibility Testing Methods and DNA Sequencing of *embAB*. *Front Microbiol*. 2020;11(781):1–7.
98. Zhang L, Zhao Y, Gao Y, Wu L, Gao R, Zhang Q, et al. Structures of cell wall arabinosyltransferases with the anti-tuberculosis drug ethambutol. *Science (80-)*. 2020;368(6496):1–15.
99. Dartois VA, Rubin EJ. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. *Nat Rev Microbiol* 2022. 2022;1–17.
100. Jabeen K, Shakoor S, Hasan R. Fluoroquinolone-resistant tuberculosis: Implications in settings with weak healthcare systems. *Int J Infect Dis*. 2015;32:118–23.
101. Espinosa-Pereiro J, Sánchez-Montalvá A, Aznar ML, Espiau M. MDR Tuberculosis Treatment. *Medicina (B Aires)*. 2022;58(188):1–34.
102. WHO. WHO treatment guidelines for drug- resistant tuberculosis. 2016;

103. Rendon A, Tiberi S, Scardigli A, D'Ambrosio L, Centis R, Caminero JA, et al. Classification of drugs to treat multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): evidence and perspectives. *J Thorac Dis.* 2016;8(10):2666–71.
104. Zhang T, Jiang G, Wen S, Huo F, Wang F, Huang H, et al. Para-aminosalicylic acid increases the susceptibility to isoniazid in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Drug Resist.* 2019;12:825–9.
105. Zheng J, Rubin EJ, Bifani P, Mathys V, Lim V, Au M, et al. Para-Aminosalicylic Acid Is a Prodrug Targeting Dihydrofolate Reductase in *Mycobacterium Tuberculosis*. *J Biol Chem.* 2013;288(32):23447–56.
106. Minato Y, Thiede JM, Kordus SL, McKlveen EJ, Turman BJ, Baughn AD. *Mycobacterium tuberculosis* folate metabolism and the mechanistic basis for para-aminosalicylic acid susceptibility and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(9):5097–106.
107. Marriner GA, Nayyar A, Uh E, Wong SY, Mukherjee T, Via LE, et al. The medicinal chemistry of tuberculosis chemotherapy. *Top Med Chem.* 2011;7:47–124.
108. Owusu E, Amartey BT, Afutu E, Boafo N. Aminoglycoside Therapy for Tuberculosis: Evidence for Ototoxicity among Tuberculosis Patients in Ghana. *Diseases.* 2022;10(10):1–13.
109. Green KD, Punetha A, Hou C, Garneau-Tsodikova S, Tsodikov O V. Probing the Robustness of Inhibitors of Tuberculosis Aminoglycoside Resistance Enzyme Eis by Mutagenesis. *ACS Infect Dis.* 2019;5(10):1772–8.
110. Sanz-García F, Anoz-Carbonell E, Pérez-Herrán E, Martín C, Lucía A, Rodrigues L, et al. Mycobacterial Aminoglycoside Acetyltransferases: A Little of Drug Resistance, and a Lot of Other Roles. *Front Microbiol.* 2019;10(46):1–11.
111. Reeves AZ, Campbell PJ, Sultana R, Malik S, Murray M, Plikaytis BB, et al. Aminoglycoside Cross-Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Due to Mutations in the 5' Untranslated Region of *whiB7*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(4):1857–65.
112. Fonseca JD, Knight GM, McHugh TD. The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Infect Dis.* 2015;32:94–100.

113. Setny P, Trylska J. Search for novel aminoglycosides by combining fragment-based virtual screening and 3D-QSAR scoring. *J Chem Inf Model*. 2009;49(2):390–400.
114. Sarathy JP, Gruber G, Dick T. Re-Understanding the Mechanisms of Action of the Anti-Mycobacterial Drug Bedaquiline. *Antibiotics*. 2019;8(261):1–12.
115. Guglielmetti L, Jaspard M, Le Dû D, Lachâtre M, Marigot-Outtandy D, Bernard C, et al. Long-term outcome and safety of prolonged bedaquiline treatment for multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J*. 2017;49(3):1–11.
116. Ignatius EH, Dooley KE. New Drugs for the Treatment of Tuberculosis. *Clin Chest Med*. 2019;40(4):811–27.
117. Mishra GP, Mulani J. Implications of bedaquiline-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(2):166.
118. Nugraha RV, Yunivita V, Santoso P, Aarnoutse RE, Ruslami R. Clofazimine as a treatment for multidrug-resistant tuberculosis: A review. *Sci Pharm*. 2021;89(19):1–18.
119. Nguyen TVA, Anthony RM, Bañuls AL, Vu DH, Alffenaar JWC. Bedaquiline Resistance: Its Emergence, Mechanism, and Prevention. *Clin Infect Dis*. 2018;66(10):1625–30.
120. Jain PP, Degani MS, Raju A, Ray M, Rajan MGR. Rational drug design based synthesis of novel arylquinolines as anti-tuberculosis agents. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2013;23(22):6097–105.
121. Armstrong T, Fenn SJ, Hardie KR. JMM Profile: Carbapenems: a broad-spectrum antibiotic. *J Med Microbiol*. 2021;70(12):1–5.
122. Codjoe F, Donkor E. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci*. 2018;6(1):1–28.
123. De Rosa M, Verdino A, Soriente A, Marabotti A. The odd couple(S): An overview of beta-lactam antibiotics bearing more than one pharmacophoric group. *Int J Mol Sci*. 2021;22(617):1–21.
124. Gupta R, Al-Kharji NMSA, Alqurafi MA, Nguyen TQ, Chai W, Quan P, et al. Atypically Modified Carbapenem Antibiotics Display Improved Antimycobacterial Activity in the Absence of β -Lactamase Inhibitors. *ACS Infect Dis*. 2021;7(8):2425–36.
125. Deshpande D, Alffenaar JWC, Köser CU, Dheda K, Chapagain ML, Simbar N, et al. D-

- Cycloserine Pharmacokinetics/Pharmacodynamics, Susceptibility, and Dosing Implications in Multidrug-resistant Tuberculosis: A Faustian Deal. *Clin Infect Dis*. 2018;67(S3):S308–16.
126. Court R, Centner CM, Chirehwa M, Wiesner L, Denti P, De Vries N, et al. Neuropsychiatric toxicity and cycloserine concentrations during treatment for multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Infect Dis*. 2021;105:688–94.
 127. Evangelopoulos D, Prosser GA, Rodgers A, Dagg BM, Khatri B, Ho MM, et al. Comparative fitness analysis of D-cycloserine resistant mutants reveals both fitness-neutral and high-fitness cost genotypes. *Nat Commun* 2019. 2019;10(1):1–11.
 128. Wang J, Pang Y, Jing W, Chen W, Guo R, Han X, et al. Efficacy and safety of cycloserine-containing regimens in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: a nationwide retrospective cohort study in China. *Infect Drug Resist*. 2019;12:763.
 129. Nematollahi A, Sun G, Jayawickrama GS, Church WB. Kynurenine Aminotransferase Isozyme Inhibitors: A Review. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6):1–22.
 130. Mirnejad R, Asadi A, Khoshnood S, Mirzaei H, Heidary M, Fattorini L, et al. Clofazimine: A useful antibiotic for drug-resistant tuberculosis. *Biomed Pharmacother*. 2018;105:1353–9.
 131. van Staden D, Haynes RK, Viljoen JM. Adapting Clofazimine for Treatment of Cutaneous Tuberculosis by Using Self-Double-Emulsifying Drug Delivery Systems. *Antibiotics*. 2022;11(806):1–25.
 132. Yano T, Kassovska-Bratinova S, Shin Teh J, Winkler J, Sullivan K, Isaacs A, et al. Reduction of clofazimine by mycobacterial type 2 NADH: Quinone Oxidoreductase: A pathway for the generation of bactericidal levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2011;286(12):10276–87.
 133. Dalcolmo M, Gayoso R, Sotgiu G, D'Ambrosio L, Rocha JL, Borga L, et al. Effectiveness and safety of clofazimine in multidrug-resistant tuberculosis: a nationwide report from Brazil. *Eur Respir J*. 2017;49(3):1602445;1-10.
 134. Kumar D, Negi B, Rawat DS. The anti-tuberculosis agents under development and the challenges ahead. *Future Med Chem*. 2015;7(15):1–24.
 135. Khoshnood S, Taki E, Sadeghifard N, Kaviar VH, Haddadi MH, Farshadzadeh Z, et al.

- Mechanism of Action, Resistance, Synergism, and Clinical Implications of Delamanid Against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol.* 2021;12(717045):1–13.
136. Hayashi M, Nishiyama A, Kitamoto R, Tateishi Y, Osada-Oka M, Nishiuchi Y, et al. Adduct Formation of Delamanid with NAD in *Mycobacteria*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(5).
 137. Lewis JM, Sloan DJ. The role of delamanid in the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Ther Clin Risk Manag.* 2015;11:779–91.
 138. Flipo M, Desroses M, Lecat-Guillet N, Dirié B, Carette X, Leroux F, et al. Ethionamide boosters: Synthesis, biological activity, and structure-activity relationships of a series of 1,2,4-oxadiazole EthR inhibitors. *J Med Chem.* 2011;54(8):2994–3010.
 139. Goldberg S, LoBue P. Pulmonary tuberculosis: Focus on the fluoroquinolones. *Clin Med Insights Ther.* 2010;2:341–52.
 140. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry.* 2014;53(10):1565–74.
 141. Mitscher LA. Bacterial topoisomerase inhibitors: Quinolone and pyridone antibacterial agents. *Chem Rev.* 2005;105(2):559–92.
 142. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 2014;22(8):438–45.
 143. Agyeman AA, Ofori-Asenso R. Efficacy and safety profile of linezolid in the treatment of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016;15(41):1–17.
 144. Mockeliunas L, Keutzer L, Sturkenboom MGG, Bolhuis MS, Hulskotte LMG, Akkerman OW, et al. Model-Informed Precision Dosing of Linezolid in Patients with Drug-Resistant Tuberculosis. *Pharmaceutics.* 2022;14(753):1–15.
 145. Hashemian SMR, Farhadi T, Ganjparvar M. Linezolid: A review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:1759–67.

146. Munita JM, Bayer AS, Arias CA. Evolving Resistance among Gram-positive Pathogens. *Clin Infect Dis*. 2015;61(Suppl 2):S48–57.
147. Letswee G, Kamau H, Gaida R, Truter I. Haematological adverse effects associated with linezolid in patients with drug-resistant tuberculosis: an exploratory study. *Int J Pharm Pract*. 2019;27(6):575–7.
148. Sterling TR, Njie G, Zenner D, Cohn DL, Reves R, Ahmed A, et al. Guidelines for the Treatment of Latent Tuberculosis Infection: Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, 2020. *Recomm reports*. 2020;69(1):1–11.
149. WHO. Latent tuberculosis infection: Updated and consolidated guidelines for programmatic management. 2018;1–64.
150. Fox GJ, Dobler CC, Marais BJ, Denholm JT. Preventive therapy for latent tuberculosis infection—the promise and the challenges. *Int J Infect Dis*. 2017;56:68–76.
151. Huaman MA, Sterling TR. Treatment of Latent Tuberculosis Infection—An Update. *Clin Chest Med*. 2019;40(4):839–48.
152. Van De Water BJ, Brooks MB, Huang CC, Trevisi L, Lecca L, Contreras C, et al. Tuberculosis clinical presentation and treatment outcomes in pregnancy: A prospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2020;20(686):1–8.
153. Miele K, Bamrah Morris S, Tepper NK. Tuberculosis in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2020;135(6):1444–53.
154. Bishara H, Vinitzky O, Satim R, Keness Y, Chazan B, Miron D. Tuberculosis in pregnancy and the puerperium. *Thorax*. 2001;56(6):494–9.
155. Law R, Bozzo P, Koren G, Einarson A. FDA pregnancy risk categories and the CPS: Do they help or are they a hindrance? *Can Fam Physician*. 2010;56:239–41.
156. Garessus EDG, Mielke H, Gundert-Remy U. Exposure of Infants to Isoniazid via Breast Milk after Maternal Drug Intake of Recommended Doses Is Clinically Insignificant Irrespective of Metaboliser Status. A Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Modelling Approach to Estimate Drug Exposure of. *Front Pharmacol*. 2019;10(5):1–13.
157. Loveday M, Hlangu S, Furin J. Breastfeeding in women living with tuberculosis. *Int J*

- Tuberc Lung Dis. 2020;24(9):880–91.
158. World Health Organization. Treatment of TB in children. In: Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children . 2nd ed. 2014. p. 33–8.
 159. Starke JR, Erkens C, Ritz N, Kitai I. Strengthening Tuberculosis Services for Children and Adolescents in Low Endemic Settings. *Pathogens*. 2022;11(158):1–16.
 160. McKenna L, Sari AH, Mane S, Scardigli A, Brigden G, Rouzier V, et al. Pediatric Tuberculosis Research and Development: Progress, Priorities and Funding Opportunities. *Pathogens*. 2022;11(128):1–13.
 161. Geneva: World Health Organization. Management of Tuberculosis and HIV co-infection-Clinical protocol for the WHO, European Region. *Epidemiology*. 2005;
 162. Torpey K, Agyei-Nkansah A, Ogyiri L, Forson A, Lartey M, Ampofo W, et al. Management of TB/HIV co-infection: the state of the evidence. *Ghana Med J*. 2020;54(3):196.
 163. Rojano B, Caminero JA, Hayek M. Curving tuberculosis: Current trends and future needs. *Ann Glob Heal*. 2019;85(1):1–7.
 164. DGS. Tuberculose em Portugal 2018 (dados provisórios) - Programa Nacional para a tuberculose.
 165. Leung CC, Lange C, Zhang Y, Chiang C-Y, Van Weezenbeek C, Mori T, et al. Challenges to the global control of tuberculosis. *Respirology*. 2013;18(4):596–604.
 166. Laniado-Laborín R. Opinion and analysis Clinical challenges in the era of multiple and extensively drug-resistant tuberculosis. *Rev Panam Salud Publica*. 2017;41(e167):1–6.
 167. Udwardia Z, Furin J. Quality of drug-resistant tuberculosis care: Gaps and solutions. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*. 2019;16(100101):1–5.
 168. Dover LG, Coxon GD. Current status and research strategies in tuberculosis drug development. *J Med Chem*. 2011;54(18):6157–65.
 169. Abrogoua DP, Kamenan BAT, Ahui BJM, Doffou E. Pharmaceutical interventions in the management of tuberculosis in a pneumophtisiology department, Ivory Coast. *Ther Clin Risk Manag*. 2016;12:1749–56.

170. Bandothkar B, Shandil RK, Bhat J, Balganesht TS. Two decades of tb drug discovery efforts-What have we learned? *Appl Sci.* 2020;10(5704):1–19.
171. Mi J, Gong W, Wu X, Al Attar AM. Advances in Key Drug Target Identification and New Drug Development for Tuberculosis. *Biomed Res Int.* 2022;2022:1–23.
172. Guzman JD, Montes-Rincón X, Ribón W. Research and Development of New Drugs Against Tuberculosis. In: *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management.* IntechOpen; 2013. p. 331–58.
173. Taylor D. The pharmaceutical industry and the future of drug development. Vols. 2016-Janua, *Issues in Environmental Science and Technology.* 2016. 1–33 p.
174. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(11):935–49.
175. Croston GE. The utility of target-based discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2017;12(5):427–9.
176. Berg EL. Phenotypic Screening. *Drug Discov World.* 2017;18:26–31.
177. Usha V, Gurcha SS, Lovering AL, Lloyd AJ, Papaemmanouil A, Reynolds RC, et al. Identification of novel diphenyl urea inhibitors of Mt-GuaB2 active against *Mycobacterium tuberculosis.* *Microbiology.* 2011;157(1):290–9.
178. Oh S, Trifonov L, Yadav VD, Barry CE, Boshoff HI. Tuberculosis Drug Discovery: A Decade of Hit Assessment for Defined Targets. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11(611304):1–23.
179. Working Group for New TB Drugs. Clinical Pipeline [Internet]. [cited 2022 Aug 14]. Available from: <https://www.newtbdrugs.org/pipeline/clinical>
180. Manjunatha UH, Smith PW. Perspective: Challenges and opportunities in TB drug discovery from phenotypic screening. *Biorgan Med Chem.* 2015;12(16):1–11.
181. Shetye GS, Franzblau SG, Cho S. New tuberculosis drug targets, their inhibitors, and potential therapeutic impact. *Transl Res.* 2020;220:68–97.
182. Shao M, McNeil M, Cook GM, Lu X. MmpL3 inhibitors as antituberculosis drugs. *Eur J Med Chem.* 2020;200:1–25.

183. Sacksteder KA, Protopopova M, Barry CE, Andries K, Nacy CA. Discovery and development of SQ109: A new antitubercular drug with a novel mechanism of action. *Future Microbiol.* 2012;7(7):823–37.
184. Resumo das Características do Medicamento: Turesis 400mg comprimidos. Available from: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
185. Lechartier B, Hartkoorn RC, Cole ST. In vitro combination studies of benzothiazinone lead compound BTZ043 against mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):5790–3.
186. Imran M, Alshrari AS, Thabet HK, Abida, Afroz Bakht M. Synthetic molecules as DprE1 inhibitors: A patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2021;31(8):759–72.
187. Makarov V, Lechartier B, Zhang M, Neres J, van der Sar AM, Raadsen SA, et al. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. *EMBO Mol Med.* 2014;6(3):372–83.
188. Soto R, Perez-Herran E, Rodriguez B, Duma BM, Cacho-Izquierdo M, Mendoza-Losana A, et al. Identification and characterization of aspartyl-tRNA synthetase inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* by an integrated whole-cell target-based approach. *Sci Rep.* 2018;8(12664):1–9.
189. Gurha SS, Usha V, Cox JAG, Fütterer K, Abrahams KA, Bhatt A, et al. Biochemical and structural characterization of mycobacterial aspartyl-tRNA synthetase AspS, a promising TB drug target. *PLoS One.* 2014;9(11).
190. Thomas B, Ls A, Harindran J. Novel Mannich Bases of 4-Thiazolidinone Derivatives As Antitubercular Agents. 2014;4(2):351–9.
191. Bhat MA, Al-Omar MA, Naglah AM, Khan AA. Synthesis of novel sulfamethoxazole 4-thiazolidinone hybrids and their biological evaluation. *Molecules.* 2020;25(16).
192. Ioerger TR, O'Malley T, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Mohaideen N, et al. Identification of New Drug Targets and Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* 2013;8(9):1–13.
193. Madar JM, Shastri LA, Shastri S, Holiyachi M, Naik NS, Shaikh F, et al. Synthesis and characterization of coumarin-4-thiazolidinone scaffolds as new class of anti-tuberculosis and antibacterial agents. *IOSR J Appl Chem.* 2018;11(7):77–101.

194. Dragset MS, Poce G, Alfonso S, Padilla-Benavides T, Ioerger TR, Kaneko T, et al. A Novel Antimycobacterial Compound Acts as an Intracellular Iron Chelator. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(4):2264.
195. Oh S, Libardo MDJ, Azeeza S, Pauly GT, Roma JSO, Sajid A, et al. Structure-Activity Relationships of Pyrazolo[1,5- a]pyrimidin-7(4 H)-ones as Antitubercular Agents. *ACS Infect Dis.* 2021;7(2):479–92.
196. Çınaroğlu SS, Timuçin E. Insights into an alternative benzofuran binding mode and novel scaffolds of polyketide synthase 13 inhibitors. *J Mol Model.* 2019;25(5):1–12.
197. Zhang W, Lun S, Wang SH, Jiang XW, Yang F, Tang J, et al. Identification of Novel Coumestan Derivatives as Polyketide Synthase 13 Inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Chem.* 2018;61(3):791–803.
198. Wilson C, Ray P, Zuccotto F, Hernandez J, Aggarwal A, Mackenzie C, et al. Optimization of TAM16, a Benzofuran That Inhibits the Thioesterase Activity of Pks13; Evaluation toward a Preclinical Candidate for a Novel Antituberculosis Clinical Target. *J Med Chem.* 2022;65(1):409–23.
199. Cruz JN, Costa JFS, Khayat AS, Kuca K, Barros CAL, Neto AMJC. Molecular dynamics simulation and binding free energy studies of novel leads belonging to the benzofuran class inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Polyketide Synthase 13. *J Biomol Struct Dyn.* 2019;37(6):1616–27.
200. Atmaram UA, Selvaraj ., Roopan M. Biological activity of oxadiazole and thiadiazole derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2022 1069. 2022;106(9):3489–505.
201. Singh V, Donini S, Pacitto A, Sala C, Hartkoorn RC, Dhar N, et al. The inosine monophosphate dehydrogenase, GuaB2, is a vulnerable new bactericidal drug target for tuberculosis. *ACS Infect Dis.* 2017;3(1):5–17.
202. Miggiano R, Morrone C, Rossi F, Rizzi M. Targeting Genome Integrity in *Mycobacterium Tuberculosis*: From Nucleotide Synthesis to DNA Replication and Repair. *Molecules.* 2020;25(5):1–15.
203. Cox JAG, Mugumbate G, Del Peral LVG, Jankute M, Abrahams KA, Jervis P, et al. Novel inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* GuaB2 identified by a target based high-throughput phenotypic screen. *Sci Reports .* 2016;6(1):1–10.