

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GIULIA OLIVEIRA TIMO

DESENVOLVIMENTO DO ALGORITMO X-TOX PARA REPOSICIONAMENTO *IN SILICO* DE FÁRMACOS CONTRA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E PROVA DE CONCEITO *IN VITRO* DOS EFEITOS BACTERICIDAS E BACTERIOSTÁTICOS DOS FÁRMACOS ORLISTAT, CARVEDILOL E OTILÔNIO

Brasília – DF
2024

GIULIA OLIVEIRA TIMO

DESENVOLVIMENTO DO ALGORITMO X-TOX PARA REPOSICIONAMENTO *IN SILICO* DE FÁRMACOS CONTRA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E PROVA DE CONCEITO *IN VITRO* DOS EFEITOS BACTERICIDAS E BACTERIOSTÁTICOS DOS FÁRMACOS ORLISTAT, CARVEDILOL E OTILÔNIO

Tese apresentada como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello.

Brasília – DF

2024

GIULIA OLIVEIRA TIMO

DESENVOLVIMENTO DO ALGORITMO X-TOX PARA REPOSICIONAMENTO *IN SILICO* DE FÁRMACOS CONTRA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E PROVA DE CONCEITO *IN VITRO* DOS EFEITOS BACTERICIDAS E BACTERIOSTÁTICOS DOS FÁRMACOS ORLISTAT, CARVEDIOL E OTILÔNIO

Tese apresentada como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Brasília, 11 de setembro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello
Universidade de Brasília
Presidente

Prof. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães
Universidade de Brasília
Examinador Interno

Prof. Dr^a. Fabiani Gai Frantz
Universidade de São Paulo
Examinador Externo

Dr^a. Glaura Regina de Castro e Caldo Lima
Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal
Examinador Externo

Prof. Dr^a. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega
Universidade de Brasília
Suplente

À minha família e amigos que sempre me incentivaram a trilhar meu próprio caminho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família. À minha mãe, Ana Stela, obrigada por todo o suporte emocional que você me deu durante esses anos de estudo e pesquisa, e obrigada pelas decisões que você tomou na sua vida, que me permitiram chegar aonde estou hoje. Ao meu pai, Emílio, obrigada por ter apoiado, há anos, a minha decisão de fazer Farmácia na faculdade e por ter me dado o suporte necessário para que eu pudesse escolher seguir essa carreira, que é desafiadora. Obrigada aos meus irmãos, e em especial ao Davi, pelos assuntos aleatórios que, apesar de muitas vezes darem uma estressada, são responsáveis por muitas risadas no dia a dia.

Agradeço também aos meus amigos de vida: Yas, Gui, Santa, Rafa e Lipe. Encontrar vocês praticamente toda semana para falar água, reclamar do trabalho, conversar sobre a vida, ouvir música, debater séries e filmes, chorar as pitangas de relacionamento, jogar baralho e sinuca são os momentos de maior leveza e divertimento que eu poderia pedir. Não poderia sonhar em ter amigos mais presentes que vocês! Obrigada ao meu grupo de amigas de anos: Isa, Ninha, Lila, Pauli, Ju, Mari, Gika, Quel e Lu. Acho linda a pluralidade do nosso grupo e como, mesmo cada uma seguindo caminhos completamente diferentes, ainda encontramos momentos para tomar um vinho e nos reconectar. Obrigada às minhas amigas de curso, em especial Lu Habib e Vic. Vocês trouxeram tanta alegria durante esse período, que, mesmo a rotina mais cansativa, se tornava boa porque estávamos juntas.

Agradecimentos especiais vão para as pessoas que me auxiliaram a fazer essa pesquisa acontecer. À equipe de bacteriologia do LACEN, obrigada pela paciência que vocês tiveram comigo no início dessa empreitada; sem o direcionamento de vocês, o começo da minha jornada *in vitro* teria sido muito mais difícil. Obrigada ao Prof. Rainer Kalscheuer e aos meus *lab mates* da Heinrich Heine Universität, na Alemanha. Lasse, Rosi e Kristin, se hoje eu sei lidar com essa bactéria tão complexa, foi porque vocês me ensinaram. Um super obrigada à minha amiga iraniana, Mena, obrigada por ter sido tão gentil comigo e por ter me acolhido nos momentos difíceis que enfrentei morando em um país diferente. Dividir o laboratório com você tornou meus dias muito mais leves e agradáveis.

Obrigada às membras da banca: Prof. Dra. Pérola Magalhães, Prof. Dra. Fabiani Frantz, Dra. Glaura de Castro e Caldo Lima e Prof. Dra. Yanna Nóbrega por acreditarem no potencial da minha pesquisa e participarem dessa etapa tão importante da minha formação.

O agradecimento final vai para meu orientador, Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello. Eu sei que você não sabe lidar com elogios, mas, como você mesmo diz: "dá seus pulos". Obrigada por confiar em mim. Há 6 anos, você deu a oportunidade para uma aluna de graduação trabalhar com algo completamente diferente e inovador. Foi porque você acreditou em mim que eu consegui chegar aqui. Obrigada pelas puxadas de orelha e cobranças, mas obrigada também por ser tão acolhedor. Muitas vezes eu não acreditei em mim mesma e duvidei de muitas coisas, mas você foi a pessoa que me colocou para cima e falou: "você dá conta, fia". Eu tenho muita gratidão e um espaço de muito carinho por todas as sessões de "terapia" que você pacientemente prestou quando eu precisava de orientação. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**) - Código de Financiamento 001, e em relação ao Doutorado Sanduíche, N° de Processo: 88881.624539/2021-01.

"Durante toda a minha vida, as novas descobertas sobre a natureza me alegraram como uma criança."

Marie Curie.

RESUMO

Considerando a prevalência da tuberculose mundialmente, o aumento da resistência bacteriana e a falta de medicamentos inovadores no mercado, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que sejam capazes de enfrentar as dificuldades citadas. A utilização de metodologias *in silico* para o reposicionamento de fármacos tem sido capaz de diminuir falhas, tempo e recursos apresentados durante as fases I e II da pesquisa clínica, visto que é capaz de realizar uma rápida varredura de milhares de moléculas contra um determinado alvo, otimizando o descobrimento ou o reposicionamento de novas terapias. Em estudo prévio, foi possível identificar uma série de fármacos passíveis de reposicionamento a partir da docagem molecular de milhares de moléculas aprovadas para uso no mercado com uma proteína transmembrana (MmpL3) e duas enzimas de *Mycobacterium tuberculosis*, a saber, RNA-polimerase, alvo da Rifampicina e Enoil-ACP-redutase, alvo da Isoniazida. Posteriormente, foi realizada uma análise *in silico* da toxicidade dos fármacos selecionados utilizando o *software* Nexus da Lhasa[®]. A partir das informações obtidas pelo programa e complementadas com dados de bases externas, foi desenvolvido um algoritmo e, conseqüentemente, um novo ranking dos fármacos foi determinado levando em conta a toxicidade. Como resultado, foram selecionados cinco fármacos (Carvedilol, Cetoconazol, Daclatasvir, Orlistate e Otilônio) com baixo risco toxicológico e com potencial de interação com *M. tuberculosis* para os estudos *in vitro*. Estes fármacos foram testados de forma individual e em associação com fármacos utilizados comumente na terapêutica da tuberculose contra as cepas H37Rv, CDC 1551, Erdman, mc²6230 e XDR de *M. tuberculosis* para ensaios de MIC (*minimum inhibitory concentration*), FICI (*fractional inhibitory concentration index*), ensaio de *Kill-kinetics*, capacidade de indução de resistência e internalização com macrófagos. O estudo de MIC revelou que o Carvedilol, Orlistate e Otilônio foram os mais promissores individualmente e, durante o estudo de FICI, foi identificado que todos os três obtiveram sinergismo de atividade com pelo menos um dos fármacos padrão para tratamento da tuberculose. O estudo de *kill-kinetics* demonstrou que as associações ORL/INH, ORL/RIF, ORL/BED, CAR/INH e CAR/BED obtiveram efeito bactericida ao longo de 30 dias de tratamento e que o OTI demonstrou atividade bacteriostática em associações com INH e BED. Mais além, foi verificado que mesmo após a bactéria ser fagocitada por macrófagos, os fármacos ORL e CAR continuaram demonstrando atividade antimicobacteriana. Em experimento de indução de mutação espontânea, ORL demonstrou baixa capacidade de gerar resistência, enquanto CAR não demonstrou nenhum crescimento de cepas espontâneas. Em suma, a presente tese avaliou, utilizando ferramentas *in silico* e *in vitro*, os fármacos ORL, CAR e OTI disponíveis no mercado para reposicionamento contra *M. tuberculosis*, determinando que estes possuem atividade contra cepas sensíveis e resistentes de *Mtb*, sinergismo com fármacos de primeira e segunda linha da terapia contra TB, atividade bactericida (ORL e CAR) e bacteriostática (OTI), baixa capacidade de gerar resistência, e atividade intracelular, fornecendo assistência ao combate dessa doença secular.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; *in silico*; *in vitro*; reposicionamento de fármacos; toxicidade comparativa.

ABSTRACT

Considering the global prevalence of tuberculosis, the increase in bacterial resistance, and the lack of innovative drugs in the market, it was necessary to develop research capable of addressing these difficulties. The use of *in silico* methodologies for drug repositioning has shown to be able to reduce failures, time, and resources spent during phases I and II of clinical research, as it can swiftly screen thousands of molecules against a specific target, optimizing the discovery or repositioning of new therapies. In a previous study, it was possible to identify a series of drugs suitable for repositioning through molecular docking of thousands of market-approved molecules with a transmembrane protein (MmpL3) and two enzymes of *Mycobacterium tuberculosis*, namely RNA polymerase, the target of rifampicin, and Enoil-ACP reductase, the target of isoniazid. Subsequently, an *in silico* analysis of the toxicity of the selected drugs was conducted using the Lhasa® Nexus software. Based on the information obtained from the program and supplemented with external database data, an algorithm was developed, and consequently, a new ranking of the drugs was determined, considering toxicity. As a result, five drugs (Carvedilol, Ketoconazole, Daclatasvir, Orlistat, and Otilonium) with low toxicological risk and potential interaction with *M. tuberculosis* were selected for *in vitro* studies. These drugs were tested individually and in combination with drugs commonly used in tuberculosis therapy against *M. tuberculosis* strains H37Rv, CDC 1551, Erdman, mc²6230 and XDR for MIC (minimum inhibitory concentration) assays, FICI (fractional inhibitory concentration index), kill-kinetics assay, resistance induction capacity, and internalization with macrophages. The MIC study revealed that Carvedilol, Orlistat, and Otilonium were the most promising individually, and during the FICI study, it was identified that all three exhibited synergistic activity with at least one of the standard drugs for tuberculosis treatment. The kill-kinetics study demonstrated that the combinations ORL/INH, ORL/RIF, ORL/BED, CAR/INH and CAR/BED obtained bactericidal effect over 30 days of treatment and that OTI demonstrated bacteriostatic activity in combinations with INH and BED. Furthermore, it was observed that even after the bacteria were phagocytosed by macrophages, both ORL and CAR continued to demonstrate antimycobacterial activity. The experiment of spontaneous resistant mutants determined that ORL had low potential for developing resistance, while CAR showed no growth of resistant strains. In summary, the present thesis evaluated, using *in silico* and *in vitro* tools, the commercially available drugs ORL, CAR, and OTI for repositioning against *M. tuberculosis*, determining that they exhibit activity against both sensitive and resistant strains of *Mtb*, synergy with first- and second-line drugs used in TB therapy, bactericidal activity (ORL and CAR), bacteriostatic activity (OTI), low potential to generate resistance, and intracellular activity, thus contributing to the fight against this old-age disease.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; *in silico*; *in vitro*; drug repositioning; comparative toxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Coeficiente de incidência de tuberculose (casos por 100 mil hab.) por Unidades da Federação. Brasil, 2023^a.** Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretaria Estaduais de Saúde/Ministério da Saúde; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Saúde 2023).....26
- Figura 2. Estrutura geral do envelope de *M. tuberculosis*.** Símbolos na coloração marrom representam resíduos de manose. Símbolos na coloração azul representam resíduos de arabinose. Símbolos na coloração vermelha representam resíduos de galactose. Símbolos na coloração preta representam resíduos de glicose. Na região da cápsula, os compostos d-arabino-d-mannan, d-glucan, e d-mannan são polissacarídeos. Na região da membrana externa, as cadeias de ácido micólico (TMM: trehalose monomicolatos e TDM: trehalose dimicolatos) estão representados por verde escuro. LM: lipomanano; ManLAM: lipoarabinomanano com manose; AG: arabinogalactano; PG: peptidoglicano; SL: sulfolípídeo; PAT: poliaciltrehalose; DAT: diaciltrehalose; PIM: manosídeos fosfatidilinositol; PDIM: ptiocerosol dimicocerosatos; PGL: glicolípídeos fenólicos. Fonte: (Jackson 2014).....29
- Figura 3. Estrutura cristalográfica da enoil-ACP-redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB 4TRO).** Fonte: Protein Data Bank.32
- Figura 4. Mecanismo de ação da Isoniazida (INH) e mutação da KatG. S315T – mutação Serina315Treonina; KatG – enzima catalase-peroxidase; INH – Isoniazida; InhA-NADH – aduto enoil-ACP-redutase (InhA) associado com Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH).**.....33
- Figura 5. Estrutura cristalográfica da RNA-polimerase do complexo de iniciação de transcrição de *Mycobacterium smegmatis* (PDB 6CCV).** Fonte: Protein Data Bank.34
- Figura 6. Estrutura cristalográfica da MmpL3 de *Mycobacterium smegmatis* (6AJG).** Fonte: Protein Data Bank.....35
- Figura 7. Estruturas químicas de grupos toxicofóricos genotóxicos.** Fonte: (Melo, Homem-de-Mello et al. 2014).40
- Figura 8. Glossário das probabilidades consideradas pelo sistema Derek.** Fonte: Documento gerado pelo sistema Derek (v.6.1.0).41

Figura 9. Parâmetros e regras que influenciaram a predição de toxicidade de desenvolvimento para o fármaco de exemplo Carfilzomib. Fonte: Printscreen do layout do sistema Derek (v.6.1.0).....	42
Figura 10. Endpoints acionados por grupos toxicofóricos do Carfilzomib. Fonte: Documento gerado pelo sistema Derek (v.6.1.0).....	43
Figura 11. Endpoints não acionados pelo fármaco Carfilzomib. Fonte: Documento gerado pelo sistema Derek (v.6.1.0).....	43
Figura 12. Mecanismo de predição do software Derek. À esquerda, é apresentada a estrutura completa da molécula, com o epóxido em sombreado. Na caixa abaixo, mostra-se os endpoints gerados pelo alerta, o organismo afetado e a probabilidade de ocorrência, o código do alerta gerado pelo sistema e o grupo toxicofórico. À direita estão mostradas as referências para consulta e exemplos de moléculas que contenham o mesmo alerta. Fonte: Printscreen do layout do sistema Derek (v.6.1.0).....	44
Figura 13. Mecanismo de predição do programa Sarah. À esquerda está demonstrado o resultado da análise estatística para o composto de exemplo Latanoprosteno. Ao meio estão os fragmentos moleculares e moléculas vizinhas com suas porcentagens de similaridade com o fármaco original. À direita, está o primeiro fármaco com maior semelhança e seu resultado do Teste de Ames. Fonte: Printscreen do layout do sistema Sarah (v.3.1.0).....	46
Figura 14. Mecanismo de predição do sistema ICH M7. Predições relacionadas ao sistema ICH M7 (especificamente para o endpoint de Mutagenicidade em bactéria) realizado para a estrutura química do fármaco Latanoprosteno. A figura mostra as predições realizadas pelos sistemas Derek e Sarah no que diz respeito à mutagenicidade in vitro em bactérias e determinou, respectivamente, inativo (---) e negativo (64% de confiabilidade). O ICH M7 gera, portanto, um argumento levando em consideração ambos os resultados do Derek e Sarah, onde nenhum toxicoforo relevante foi identificado pelo sistema, e provê um resultado in silico geral (in silico overall call) como “negativo” para o composto em questão. Fonte: Printscreen do layout do sistema ICH M7.	47

Figura 15. Mecanismo de atividade do sistema Vitic. À esquerda, todos os endpoints analisados pelo Vitic. À direita, as possíveis opções de busca por estrutura no sistema. Fonte: Printscreen do layout do sistema Vitic (v.3.1.0).	48
Figura 16. Mecanismo de predição do sistema Meteor. Fragmento da predição de metabolismo Meteor para o fármaco Carvedilol. Verifica-se a via metabólica utilizada, a probabilidade da formação do metabólito, o código do sistema para cada metabólito, sua fórmula química e massa molecular. Fonte: Printscreen do layout do sistema Meteor.	49
Figura 17. Configuração de processamento utilizada no sistema Meteor. Fonte: Printscreen do layout do sistema Meteor.	54
Figura 18. Exemplo de placa de 96 poços para experimento Checkerboard. Colunas coloridas (3,13-0,024 μM) representam concentrações de fármacos padrões. Linhas coloridas (100-0,78 μM) representam concentrações de fármacos teste. Colunas brancas representam os controles dos fármacos padrão e teste em duplicata. Quadrado vermelho FICI representa a menor concentração dos fármacos padrão e teste em conjunto onde observa-se inibição de crescimento bacteriano. Retângulo vermelho DMSO (2%) representa o controle negativo e retângulo vermelho MEIO representa o controle de esterilidade do meio.....	64
Figura 19. Fluxograma para extração de metil ésteres de ácido micólico (MAME) e análise por CCD.	67
Figura 20. Fluxograma para análise de inibição intracelular com macrófagos THP-1.	70
Figura 21. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC90) dos fármacos padrão contra a cepa H37Rv de Mycobacterium tuberculosis. Cepa H37Rv na concentração de 10^6 UFC/mL. As concentrações dos fármacos Rifampicina (RIF), Isoniazida (INH), Etambutol (EMB), Delamanide (DEL) e Bedaquilina (BED) variam entre 10-0,0048 μM . Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC ₉₀ . Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata.	91
Figura 22. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC90) dos fármacos reposicionados contra a cepa H37Rv de Mycobacterium tuberculosis. Cepa H37Rv na concentração de 10^6 UFC/mL. As concentrações dos fármacos	

Orlistate (ORL), Otilônio (OTI), Carvedilol (CAR), Cetoconazol (KET) e Daclatasvir (DAC) variam entre 100-0,78µM. Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC₉₀. Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata.92

Figura 23. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC₉₀) dos fármacos reposicionado contra a cepa CDC1551 de Mycobacterium tuberculosis. Cepa CDC1551 na concentração de 10⁶ UFC/mL. As concentrações dos fármacos Orlistate (ORL), Otilônio (OTI), Carvedilol (CAR) e Cetoconazol (KET) variam entre 100-0,78µM. Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC₉₀. Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata.93

Figura 24. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC₉₀) dos fármacos reposicionados contra a cepa Erdman de Mycobacterium tuberculosis. Cepa Erdman na concentração de 10⁶ UFC/mL. As concentrações dos fármacos Orlistate (ORL), Otilônio (OTI), Carvedilol (CAR) e Cetoconazol (KET) variam entre 100-0,78µM. Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC₉₀. Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata.93

Figura 25. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC₉₀) dos fármacos reposicionados e Isoniazida (INH) contra a cepa XDR de Mycobacterium tuberculosis. Cepa Mtb XDR na concentração de 10⁶ UFC/mL. As concentrações dos fármacos Orlistate (ORL), Otilônio (OTI), Carvedilol (CAR) e Isoniazida (INH) variam entre 100-0,78µM. Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC₉₀. Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata.....95

Figura 26. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC₉₀) dos fármacos teste contra a cepa mc²6230 de Mycobacterium tuberculosis. Cepa mc²6230 na concentração de 10⁶ UFC/mL. As concentrações dos fármacos Orlistate (ORL), Otilônio (OTI) e Carvedilol (CAR) variam entre 100-0,78µM. Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC₉₀. Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata.97

Figura 27. Avaliação de kill-kinetics para os fármacos teste. Orlistate 125µM (quadrado vermelho), Otilônio 31,25µM (triângulo verde), Carvedilol 125 µM (triângulo roxo) e controle de crescimento DMSO 125µM (círculo azul). 112

Figura 28. Avaliação de kill-kinetics para a associação dos fármacos teste com Isoniazida (INH). Associação de Isoniazida+Orlistate 10/125µM (quadrado vermelho), Isoniazida+Otilônio 10/31,25µM (triângulo verde), Isoniazida+Carvedilol 10/125µM (triângulo roxo) e Isoniazida individualmente 10µM (círculo azul). 113

Figura 29. Avaliação de kill-kinetics para a associação dos fármacos teste com Rifampicina (RIF). Associação de Rifampicina+Orlistate 1/125µM (quadrado vermelho), Rifampicina+Carvedilol 1/125µM (triângulo verde) e Rifampicina individualmente 1µM (círculo azul). 114

Figura 30. Avaliação de kill-kinetics para a associação dos fármacos teste com Bedaquilina (BED). Bedaquilina+Orlistate 0,5/125µM (quadrado vermelho), Bedaquilina+Otilônio 05/31,25µM (triângulo verde), Bedaquilina+Carvedilol 0,5/125µM (triângulo roxo) e Bedaquilina individualmente 0,5µM (círculo azul). 114

Figura 31. Avaliação de MIC₉₀ após finalização do ensaio kill-kinetics. Cepa H37Rv na concentração de 10⁵ UFC/mL. A concentração dos fármacos teste Carvedilol (CAR), Orlistate (ORL) e Otilônio (OTI) variam entre 100-0,78µM. Para os fármacos Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), e Bedaquilina (BED) variam entre 10-0,078µM. Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC₉₀. Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata. 115

Figura 32. Placa de cromatografia em camada delgada demonstrando eluição dos metil ésteres de ácido micólico (MAME). Fármacos teste Otilônio (OTI), Orlistate (ORL) e Carvedilol (CAR). Isoniazida (INH) e dimetilsulfóxido (DMSO) foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. 117

Figura 33. Resultado da análise estatística Dunnett para comparar inibição de MAME entre o grupo controle (INH) e os fármacos teste. Keto-MAME (triângulo), Meo-MAME (quadrado), α-MAME (círculo). 118

Figura 34. Biossíntese do ácido micólico. Apenas a configuração cis do grupo ciclopropano dos ácidos metoxi (MeO-MAME) e ceto (Keto-MAME) é mostrada, mas *M. tuberculosis* também produz os ácidos trans-MeO-MAME e trans-Keto-MAME.

Os inibidores do ácido micólico em uso clínico são Isoniazida (INH) e Etionamida (ETH) para inibição de enoil-ACP-redutase (InhA) e em ensaios clínicos para Mmp13 representado pelo composto SQ109. Fonte: (Vilchère 2020). 119

Figura 35. RT-qPCR para enzima Enoil-ACP-redutase (InhA). Expressão de Enoil-ACP-redutase (InhA) induzida pelos compostos Isoniazida (INH), Carvedilol (CAR), Otilônio (OTI) e Orlistate (ORL). Variação em “2-fold” corresponde ao aumento da expressão de 2x em relação ao controle. **** = $p < 0,0001$ 120

Figura 36. RT-qPCR para expressão de iniB. Expressão do gene iniB induzido pelos compostos Isoniazida (INH), Carvedilol (CAR), Otilônio (OTI) e Orlistate (ORL). Variação em “2-fold” corresponde ao aumento da expressão de 2x em relação ao controle. * = $p < 0,05$; **** = $p < 0,0001$ 121

Figura 37. Estrutura molecular do fármaco Orlistate (ORL) e seus grupos farmacofóricos. Asterisco vermelho corresponde a região onde ocorre a hidrólise catalítica do anel β -lactona do ORL. Corações em azul correspondem as regiões da cadeia peptídica responsáveis pela especificidade e estabilidade da ligação ORL-Ag85C. Fonte: (Goins, Sudasinghe et al. 2018). 122

Figura 38. Avaliação de Inibição intracelular utilizando linhagem celular THP-1. ST – sem tratamento; NI – não infectado; RIF – Rifampicina (3 μ M); STREP – Estreptomicina (20 μ M); ORL – Orlistate (100 μ M); CAR – Carvedilol (100 μ M); **** = $p < 0,0001$. UFC/mL – unidades formadoras de colônia por mL. 124

Figura 39. Reavaliação de concentração inibitória mínima (MIC90) em cepas mutantes espontâneas M. tuberculosis mc26230 para o fármaco Orlistate (ORL). Cepas mutantes espontâneas (SRM) (Cepas #1-10) geradas a partir do tratamento com $5 \times \text{MIC}_{90}$ (125 μ M) previamente determinado e representado pela cepa parenteral em vermelho. 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Etapas de seleção e triagem no sistema Clarivate.....	56
Tabela 2. Critérios de exclusão para resultados obtidos pelo sistema Clarivate.....	56
Tabela 3. Triagem de 10% de fármacos por faixa de 20 anos.....	57
Tabela 4. Classificação dos fármacos selecionados in silico com potencial atuação contra os alvos MmpL3, InhA e RNAPol baseado no score CHEMPLP do software GOLD.....	72
Tabela 5. Pontuação dos endpoints in vivo sistema-específicos.....	75
Tabela 6. Pontuação dos endpoints in vivo globais.....	76
Tabela 7. Pontuação dos endpoints in vitro.....	76
Tabela 8. Classificação dos fármacos por classe farmacológica, CHEMPLP e X-Tox para alvo Enoil-ACP-redutase (InhA).....	83
Tabela 9. Classificação dos fármacos por classe farmacológica, CHEMPLP e X-Tox para alvo RNA-polimerase.....	84
Tabela 10. Classificação dos fármacos por classe farmacológica, CHEMPLP e X-Tox para alvo MmpL3.....	84
Tabela 11. Seleção final de fármacos selecionados por alvo.....	87
Tabela 12. Valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos fármacos para cada microrganismo.....	98
Tabela 13. Mtb H37Rv FICI para os fármacos Carvedilol (CAR) e Rifampicina (RIF).....	100
Tabela 14. Mtb H37Rv FICI para os fármacos Carvedilol (CAR) e Bedaquilina (BED).....	101
Tabela 15. Mtb H37Rv FICI para os fármacos Carvedilol (CAR) e Delamanide (DEL).....	101
Tabela 16. Mtb H37Rv FICI para os fármacos Orlistate (ORL) e Rifampicina (RIF).....	103
Tabela 17. Mtb H37Rv FICI para os fármacos Orlistate (ORL) e Bedaquilina (BED).....	103

Tabela 18. Mtb H37Rv FICI para os fármacos Orlistate (ORL) e Delamanide (DEL).....	104
Tabela 19. Mtb H37Rv FICI para os fármacos Otilônio (OTI) e Rifampicina (RIF).....	107
Tabela 20. Mtb H37Rv FICI para os fármacos Otilônio (OTI) e Bedaquilina (BED).....	107
Tabela 21. Mtb H37Rv FICI para os fármacos Otilônio (OTI) e Delamanide (DEL).....	108
Tabela 22. Resultados de Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI).....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADS	Albumina-Dextrose-Sódio
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BSA	Albumina de Soro Bovina
CAR	Carvedilol
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM/MIC	Concentração Inibitória Mínima
CL ₅₀	Concentração Letal
DL ₅₀	Dose Letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMB	Etambutol
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
GHS	<i>Globally Harmonized System</i>
HERG	<i>Human Ether-a-go-go Related Gene</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
ICH M7	<i>International Council on Harmonisation</i>
IL	Interleucina
INH	Isoniazida
InhA	Enoil-ACP-redutase
Kat-G	catalase-peroxidase
LAM	Lipoarabinomanano
LM	Lipomanano
LOAEL	Nível de Efeito Adverso Mais Baixo Observado
MAME	Metil Ésteres de Ácido Micólico
MmpL3	<i>Mycobacterial membrane protein Large 3</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>MtbC</i>	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida Adenina
NOAEL	Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORL	Orlistat
OTI	Otilônio
PAS	Ácido para-aminosalicílico
PDB	Protein Data Bank
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PPL	População Privada de Liberdade
PSR	População em Situação de Rua
PZA	Pirazinamida
QSAR	Relação Estrutura-Atividade Quantitativa
RIF	Rifampicina
RNApol	RNA polimerase
RT-qPCR	Reação em Cadeia da
SDF	<i>Structured Data File Format</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
STREP	Estreptomicina
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multi-resistente
TB-RR	Tuberculose resistente a Rifampicina
TB-TDR	Tuberculose totalmente resistente
TB-XDR	Tuberculose extensivamente resistente
TDM	Trealose Dimicolato
TMM	Trealose Monomicolato
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRM-TB	Teste Rápido Molecular para Tuberculose
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

\approx	Aproximadamente
Σ	Somatório
\leq	Menor ou igual a
\geq	Maior ou igual a
®	Marca registrada
Å	Ângstrom
m	Mili
Δ	Delta
α	Alfa
μ	Micro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
	1.1 Revisão da literatura	22
	1.2 Agente etiológico e patofisiologia.....	28
	1.3 Enoil-ACP-redutase (InhA)	31
	1.4 RNA polimerase (RNAPol)	33
	1.5 Mycobacterial Membrane Protein Large 3 (MmpL3)	34
	1.6 <i>Virtual Screening</i>	35
	1.7 Reposicionamento de fármacos.....	36
	1.8 Otimização de resultados utilizando toxicidade <i>in silico</i>	38
1.8.1	Derek	39
1.8.2	Sarah	44
1.8.3	ICH M7.....	46
1.8.4	Vitic	47
1.8.5	Meteor.....	48
	1.9 Ensaio <i>in vitro</i>	50
2	JUSTIFICATIVA	51
3	OBJETIVOS	52
	3.1 Objetivo geral.....	52
	3.2 Objetivos específicos	52
4	MATERIAI E MÉTODOS	53
	4.1 Avaliação <i>in silico</i>	53
4.1.1	Desenvolvimento de algoritmo para análise de toxicidade comparativa.....	53
4.1.2	Validação do algoritmo	55
	4.2 Avaliação <i>in vitro</i>	58
4.2.1	Concentração inibitória mínima (CIM).....	58
4.2.2	<i>Índice da Concentração Inibitória Fracionada</i> (FICI).....	61
4.2.3	Ensaio <i>Kill-kinetics</i>	64
4.2.4	Extração de metil ésteres de ácido micólico (MAME) e análise por CCD	65
4.2.5	Avaliação da expressão gênica de InhA e <i>iniB</i>	67
4.2.6	Inibição intracelular com macrófagos THP-1	68
4.2.7	Indução de mutação espontânea.....	70
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
	5.1 Avaliação <i>in silico</i>	72
5.1.1	Derek	73
5.1.2	Sarah	77
5.1.3	ICH M7.....	78
5.1.4	Vitic	78
5.1.5	Meteor.....	81

5.1.6	X-Tox	82
5.1.7	Seleção final de fármacos.....	86
	5.2 Validação do algoritmo X-Tox.....	87
	5.3 Avaliação <i>in vitro</i>	89
5.3.1	Concentração Inibitória Mínima (MIC ₉₀).....	89
5.3.2	Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI).....	98
5.3.3	Ensaio <i>Kill-kinetics</i>	110
5.3.4	Extração de metil ésteres de ácido micólico (MAME) e análise por CCD...	116
5.3.5	Avaliação da expressão gênica de <i>InhA</i> e <i>iniB</i>	119
5.3.6	Inibição intracelular com macrófagos THP-1	123
5.3.7	Indução de mutação espontânea.....	125
6	CONCLUSÃO.....	127
	REFERÊNCIAS.....	129
	APÊNDICES.....	148

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão da literatura

A tuberculose (TB), uma das doenças mais antigas e persistentes da humanidade, possui um histórico que remonta milhares de anos. É causada pela micobactéria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) e os primeiros vestígios da doença em humanos foram identificados em um crânio datado em 500 mil anos, na Turquia. Entretanto, a primeira detecção com alto nível de evidência, utilizando sequenciamento por PCR, detectou a presença genética da bactéria em crianças e mulheres na região do Mediterrâneo datado em 9 mil anos (Donoghue, 2016; Natarajan; Beena; Devnikar; Mali, 2020). Hipócrates, em 460-355 BC, já havia denominado como *Phthisis* uma doença que atacava os pulmões, provocando tosse, secreção e febre (Comrie, 1910). Além, descrições de doenças com características semelhantes à TB também já foram citadas em literaturas antigas Chinesas, Árabes e Indianas, esta última referindo-a como *Yakshma*, em português traduzido como “doença devastadora” (Rosenblatt, 1973; Rubin, 1995; Sharma, S.; Mohan, A., 2004; Sharma; Mohan, 2013). Evidências ao longo da história mostram que a doença já afligia populações antigas e, ao longo dos séculos, a tuberculose se tornou uma das principais causas de morbidade e mortalidade.

O século XIX e início do século XX testemunharam uma pandemia de tuberculose de proporções alarmantes, ganhando o sombrio apelido de "A Peste Branca" (Dubos; Dubos, 1987), em contraste com a conhecida “Peste Negra”, ou peste bubônica, causada pela bactéria *Yersinia pestis* (Zietz; Dunkelberg, 2004). A TB assolou as cidades, deixando uma marca indelével nas políticas de saúde pública, arte e literatura, marcando história como a doença dos românticos, poetas e reis (Buchanan; Rainsford; Kean; Kean, 2023; Pezzella, 2019; Porto, 1999; Smith, 1984). Apesar do histórico antigo, apenas em 1882 o agente causador da TB foi isolado por Robert Koch, o que representou um marco crucial na luta contra a doença e em 1905 rendeu a ele o Prêmio Nobel de Medicina, revolucionando a compreensão a respeito

da doença e estabelecendo as bases para avanços diagnósticos e terapêuticos, que já estavam em processo de pesquisa (Cambau; Drancourt, 2014; Koch, 1891).

A chegada dos antibióticos na metade do século XX, notadamente a Estreptomicina (STREP) e o Ácido para-aminosalicílico (PAS), inaugurou uma nova era no tratamento da tuberculose (Feldman; Hinshaw, 1944; Feldman; Hinshaw; Mann, 1945; Hinshaw; Feldman; Pfuete, 1946; Lehmann, 1946; Marshall, 1948). Essas descobertas ofereceram uma verdadeira chance de recuperação para inúmeros indivíduos. No entanto, o fármaco que mudou o curso da doença e é utilizado até os dias modernos, foi desenvolvido em 1952 e denominado Isoniazida (INH) (Knox; King; Woodroffe, 1952). Múltiplos estudos foram realizados ao longo dos anos a respeito da atividade individual e do sinergismo dessas drogas, a capacidade de induzir cepas resistentes e diminuir tempo de terapia (Grumbach, 1970; Knox; King; Woodroffe, 1952; Mccune; Mcdermott; Tompsett, 1956; Santha; Nazareth; Krishnamurthy; Balasubramanian *et al.*, 1989), até que o regime de 1 ano de PAS e INH suplementado com STREP foi adotado pela maior parte da Europa (Mitchison; Davies, 2012). Entretanto, o longo tempo de tratamento, o alto custo de uma internação extensa e o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos apresentaram novos desafios, demandando que uma pesquisa contínua e vigilância na luta global contra a TB continuasse avançando. Entre as décadas de 1950-70, a Pirazinamida (PZA) (Mccune ; Tompsett ; Mcdermott 1956) e Rifampicina (RIF) (Grumbach, 1970) foram desenvolvidas com o intuito de resolver essas problemáticas, resultando na mudança inédita do tempo de tratamento para apenas 6 meses ao adicionar PZA ou RIF ao esquema INH+STREP (Bmrc, 1972). Por fim, o Etambutol (EMB) também demonstrou boa atividade antimicobacteriana (Jindani; Nunn; Enarson, 2004) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) passou a adotar o esquema de 2 meses de terapia intensiva com INH/RIF/PZA/EMB + 4 meses de manutenção com INH/RIF, que é utilizado até hoje. Associado com o tratamento, Albert Calmette and Camille Guérin desenvolveram a vacina, que seria denominada BCG, partindo da cepa de *Mycobacterium bovis* (King; Park, 1929). Desde meados do século XX, a vacina desenvolvida pela dupla de bacteriologistas franceses vem sendo usada amplamente e declara-se que ao menos 90% da população mundial esteja imunizada pela BCG, apesar dos percalços que envolvem seu uso (Collette; Bourhaba; Moutschen, 2006; Price, 1982).

No final da década de 70, acreditou-se que a TB não se apresentasse mais como um problema de saúde pública mundial, entretanto, a emergência do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a consequente síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) evidenciaram novamente a TB como uma problemática importante devido à coinfeção com HIV (Natarajan; Beena; Devnikar; Mali, 2020). Em 1994, a OMS declarou oficialmente a TB como “emergência global” (Who, 1994). Associado, viu-se a eclosão de cepas resistentes aos fármacos utilizados, dando início à uma sequência de classificações como tuberculose multirresistente (TB-MDR) (Chaudhuri, 2020; Sharma, S. K.; Mohan, A., 2004), tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR) (Migliori; Loddenkemper; Blasi; Raviglione, 2007; Who, 2006) e, de forma não oficial (lê-se não reconhecida pela OMS, porém identificadas em artigos científicos), super TB-XDR (Velayati; Masjedi; Farnia; Tabarsi *et al.*, 2009) e cepas totalmente resistentes (TB-TDR) foram identificadas na região do Mediterrâneo Oriental, apontadas como resistentes aos fármacos de primeira e segunda linha: aminoglicosídeos, polipeptídeos cíclicos, fluoroquinolonas, tioamidas, análogos de serina e derivados do ácido salicílico (Velayati; Farnia; Masjedi; Ibrahim *et al.*, 2009).

Atualmente, de acordo com o último relatório publicado pela OMS, estima-se que um quarto da população mundial tenha sido infectado com TB, mas que a maioria das pessoas não irá desenvolver a doença. Apesar disso, até a pandemia do coronavírus (COVID-19), a tuberculose era a principal causa de morte por um único agente infeccioso, acima do HIV/AIDS (OMS, 2023). Entretanto, durante os anos da pandemia, houve uma queda significativa no número de pessoas diagnosticadas com TB no mundo, provavelmente devido à redução da capacidade do sistema de saúde para continuar a prestar serviços relacionados a TB, capacidade reduzida de procurar cuidados no contexto de *lockdown*, preocupações sobre os riscos de ir às unidades de saúde durante uma pandemia e estigma associado a semelhanças dos sintomas entre TB e COVID-19. As reduções no número relatado de pessoas diagnosticadas com TB entre 2020 e 2021 sugerem que o número de pessoas não tratadas também aumentou, resultando primeiro em um aumento no número de mortes por TB e mais transmissão comunitária de infecção. Em números, estima-se que entre 2019 e 2021, houve cerca de 1,4 milhões de mortes por TB entre pessoas HIV-negativas e 187.000 mortes entre pessoas vivendo com HIV, num total combinado de 1,6 milhões mundialmente, revertendo anos de declínio entre 2005 e 2019 (OMS, 2023).

Outros impactos negativos sobre a TB durante a pandemia de COVID-19 incluem uma queda entre 2019 e 2020 no número de pessoas tratadas para TB-resistente à Rifampicina (TB-RR) e TB-MDR (–17% em relação aos anos anteriores), com uma recuperação parcial (+7,5%) em 2021, além de um declínio nos gastos globais em serviços essenciais em TB (de US\$ 6,0 bilhões em 2019 para US\$ 5,4 bilhões em 2021, menos que metade do que é tido como necessário) (OMS, 2023).

Em conjunto, esses dados contribuem para a conclusão de que, mais do que nunca, são necessários esforços intensificados e apoiados por um maior financiamento com o objetivo de mitigar e reverter os impactos negativos da pandemia do coronavírus na enfermidade que é a tuberculose.

No Brasil, a Tuberculose é uma doença infecciosa que continua a ser um desafio de saúde pública. A epidemiologia dessa doença revela uma realidade complexa e multifacetada. Durante os anos da pandemia de covid-19, houve uma diminuição nos casos diagnosticados, porém, em 2022, houve uma importante recuperação nacional no número de pessoas diagnosticadas com TB e tratadas, com 38,0 casos por 100 mil habitantes e 81.604 casos novos, após dois anos de interrupções (Saúde, 2023). Em 2023, houve uma redução na ocorrência de casos e no risco de adoecimento, com 37,0 casos por 100 mil habitantes e 80.012 casos novos. Os dados de 2023 obtidos pelo Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente ainda são preliminares, o que pode explicar essa redução. Em 2022, a TB ainda levou ao óbito mais de 5 mil pessoas, com 2,72 óbitos por 100 mil habitantes e 5.845 óbitos (Saúde, 2023).

Fatores socioeconômicos, condições de vida precárias e desigualdades na distribuição de recursos de saúde contribuem para a persistência dessa enfermidade. Por exemplo, entre as populações em situação de vulnerabilidade, a coinfeção TB-HIV passou de 8,6% em 2022 para 9,3% em 2023. A partir de 2021, com exceção da população privada de liberdade (PPL), observou-se elevação do número de pessoas com TB pertencentes a algum grupo em situação de vulnerabilidade, com destaque para a população em situação de rua (PSR), que apresentou o maior aumento. As taxas de incidência variam consideravelmente entre as regiões do país, sendo mais prevalentes na região norte (Figura 1) (Saúde, 2023).

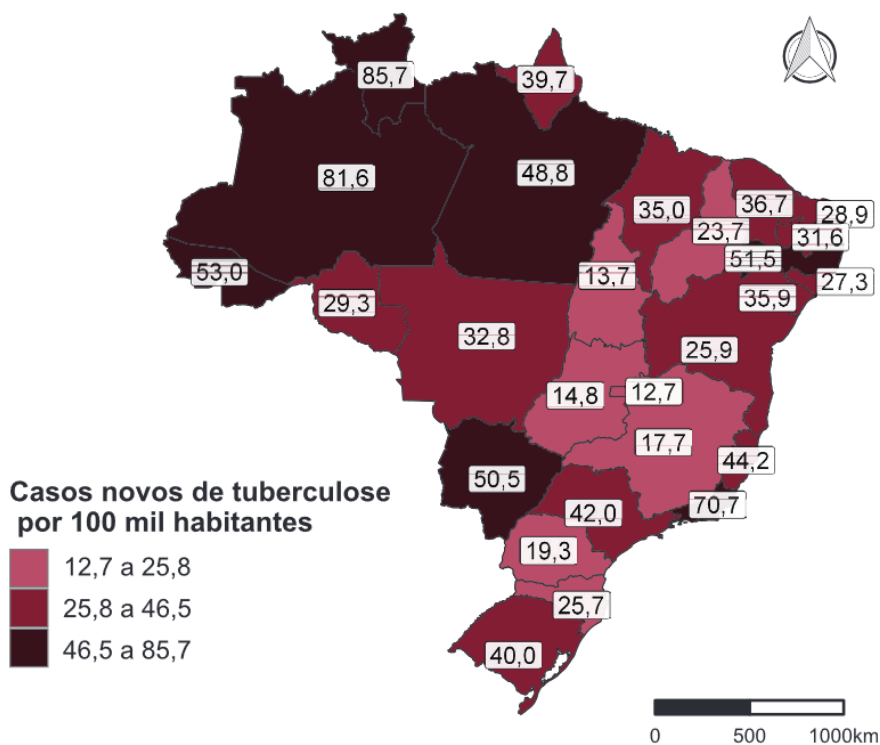


Figura 1. Coeficiente de incidência de tuberculose (casos por 100 mil hab.) por Unidades da Federação. Brasil, 2023^a. Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretaria Estaduais de Saúde/Ministério da Saúde; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Saúde, 2023).

Esforços têm sido realizados para melhorar o acesso a testes de diagnóstico mais sensíveis. Comumente, após o diagnóstico clínico e diferencial preliminar, são realizadas técnicas diagnósticas como a baciloscopia direta (método de Ziehl-Nielsen), que permite detectar entre 60-80% dos casos de TB pulmonar (Saúde, 2019). A cultura, podendo ser realizada através do meio líquido (MGIT[®]) ou sólido (Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh), que possui alta especificidade e sensibilidade, baixo custo e chance de contaminação, porém tem a desvantagem de tempo (resultado entre 15-30 dias). O teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB) a partir do GeneXpert[®], baseado na reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT), também sendo capaz de detectar resistência à Rifampicina e possui sensibilidade entre 90-95% (Saúde, 2019). Ademais, podem ser requisitados diagnósticos por imagem, mais especificamente radiografia de tórax e tomografia computadorizada de tórax. Programas de saúde pública têm sido implementados visando a redução da carga da doença, como a Estratégia Nacional para o Fim da Tuberculose no Brasil. Essa estratégia visa o diagnóstico precoce, o tratamento eficaz,

a melhoria na qualidade dos serviços de saúde e a busca ativa de casos (Saúde, 2023).

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são fundamentais para o controle da doença, mas alguns desafios persistem, como a resistência aos medicamentos utilizados no tratamento padrão. De acordo com o Manual de Recomendações e Controle da Tuberculose no Brasil, os esquemas básicos para o tratamento são seccionados de acordo com idade e tipo de infecção. Para adultos e adolescentes (≥ 10 anos de idade) o esquema 2RHZE/4RH é recomendado para tuberculose pulmonar (2 meses de Rifampicina (R), Isoniazida (H), Pirazinamida (Z) e Etambutol (E), seguidos de 4 meses da dupla RH). O esquema básico para tratamento da TB meningoencefálica e osteoarticular em adultos e adolescentes (≥ 10 anos de idade): é 2RHZE/10RH. Para crianças, o esquema básico da tuberculose pulmonar é (< 10 anos de idade): 2RHZ/4RH e para o tratamento da TB meningoencefálica e osteoarticular: 2RHZ/10RH (Saúde, 2019). O manual também aborda os esquemas de tratamento oferecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para outras condições e comorbidades como gestação, hepatopatias, nefropatias, diabetes e coinfeção pelo HIV.

Como citado acima, a Tuberculose é uma doença que pode afetar diferentes partes do corpo, sendo dividida em Tuberculose Pulmonar e Tuberculose Extrapulmonar, dependendo do local afetado. A Tuberculose Pulmonar é a forma mais comum, onde os pulmões são afetados. Os sintomas incluem tosse persistente, febre, sudorese noturna e perda de peso (Milburn, 2001). Já a Tuberculose Extrapulmonar, que abrange aproximadamente 15% das infecções, afeta órgãos e tecidos além dos pulmões, como os gânglios linfáticos, ossos, articulações, sistema nervoso central, entre outros, onde os sintomas vão depender do órgão afetado (Golden; Vikram, 2005; Rodriguez-Takeuchi; Renjifo; Medina, 2019).

A abordagem terapêutica para a Tuberculose Extrapulmonar é mais individualizada e pode envolver a adição de medicamentos específicos para garantir a erradicação da infecção em diferentes partes do corpo. Por conta disso, assim como para outras infecções bacterianas, é crucial seguir o tratamento conforme prescrito, completando o ciclo de antibióticos mesmo que os sintomas desapareçam, para prevenir a resistência bacteriana e a reativação da doença.

1.2 Agente etiológico e patofisiologia

A morfologia celular do *M. tuberculosis* é caracterizada pela sua aparência em forma de bastonete, levemente curvada, variando tipicamente de 2 a 4 micrômetros de comprimento (Yamada; Yamaguchi; Chikamatsu; Aono *et al.*, 2015). Esta micobactéria, junto com outras micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*MtbC*), são denominadas Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR), pois devido à alta concentração de lipídios em sua parede celular, conseguem reter a coloração por fucsina, mesmo após a lavagem com álcool-ácido, método este conhecido como coloração de Ziehl Neelsen (Van Deun; Hossain; Gumusboga; Rieder, 2008).

A complexa estrutura da parede celular é central para a patogenicidade da *M. tuberculosis*. De forma geral, essa estrutura é formada por três grandes classes: ácidos micólicos, arabinogalactanos (polissacarídeos) e peptidoglicanos (Jankute; Cox; Harrison; Besra, 2015) (Figura 2). Como citado acima, um dos componentes que contribui para a alta lipofilicidade da parede celular micobacteriana são os ácidos micólicos de cadeia longa, que conferem um alto grau de impermeabilidade a muitos antibióticos e evasão aos fatores imunológicos do hospedeiro (Alsayed; Beh; Foster; Payne *et al.*, 2019). Além disso, a parede celular da micobactéria é composta por uma camada de arabinogalactano, componente que, formado majoritariamente por resíduos de açúcar galactose (Gal) e arabinose (Ara) (Mcneil; Wallner; Hunter; Brennan, 1987), fornece suporte estrutural e conecta a camada de peptidoglicano à camada lipídica externa (Mcneil; Daffe; Brennan, 1990). Além disso, a parede celular micobacteriana ainda possui uma camada de peptidoglicanos, fornecendo forma, rigidez e estabilidade osmótica e, para além da *Mtb*, pode ser encontrada tanto em bacilos gram-negativos como em gram-positivos (Schleifer; Kandler, 1972).

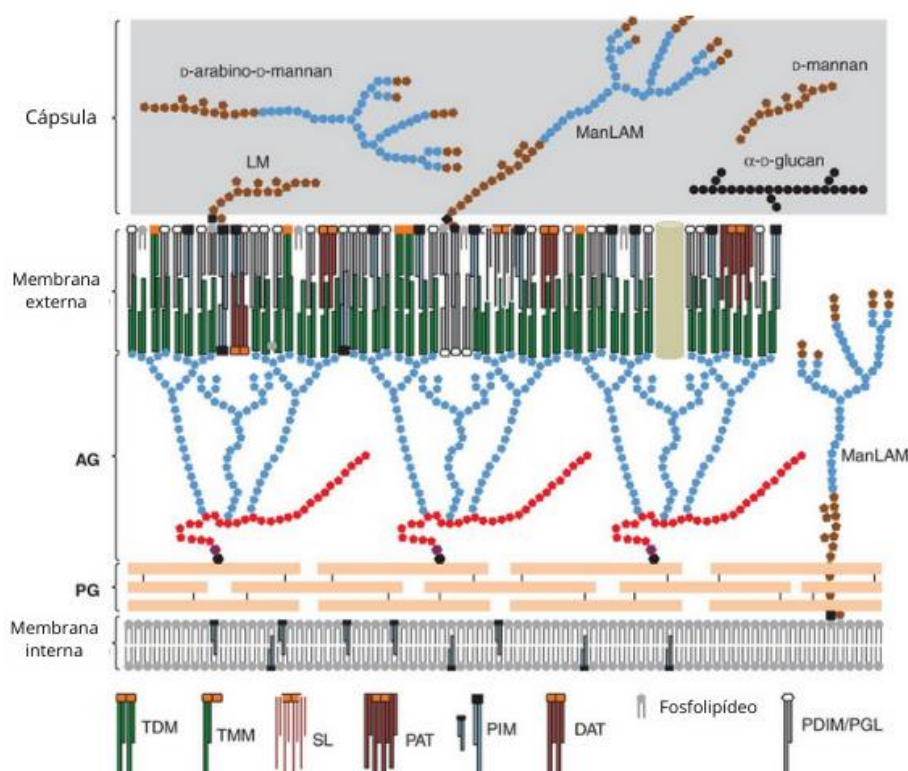


Figura 2. Estrutura geral do envelope de *M. tuberculosis*. Símbolos na coloração marrom representam resíduos de manose. Símbolos na coloração azul representam resíduos de arabinose. Símbolos na coloração vermelha representam resíduos de galactose. Símbolos na coloração preta representam resíduos de glicose. Na região da cápsula, os compostos d-arabino-d-mannan, d-glucan, e d-mannan são polissacarídeos. Na região da membrana externa, as cadeias de ácido micólico (TMM: trehalose monomicolatos e TDM: trehalose dimicolatos) estão representados por verde escuro. LM: lipomanano; ManLAM: lipoarabinomanano com manose; AG: arabinogalactano; PG: peptidoglicano; SL: sulfolípideo; PAT: poliaciltrehalose; DAT: diaciltrehalose; PIM: manosídeos fosfatidilinositol; PDIM: ptiocerol dimicocerosatos; PGL: glicolípideos fenólicos. Fonte: (Jackson, 2014).

Por fim, a estrutura celular da *M. tuberculosis* ainda possui outros componentes menos prevalentes, porém não menos essenciais, como lipoglicanos, incluindo lipoarabinomanano (LAM) e lipomanano (LM), presentes no envelope celular e importantes moléculas imunomoduladoras, interagindo com os receptores do hospedeiro, influenciando a ativação das células imunológicas e a produção de citocinas (Pitarque; Larrouy-Maumus; Payré; Jackson *et al.*, 2008). Além de glicolípídios, como fosfatidilinositol manosídeo (PIMs), componente estrutural e precursor de LAM e LM (Sancho-Vaello; Albesa-Jové; Rodrigo-Unzueta; Guerin, 2017). E também proteínas transmembrana, como a MmpL3, transportador de precursores do ácido micólico, como os trehalose monomicolatos (TMMs) do meio

intracelular para o envelope bacteriano, auxiliando na construção do mesmo e manutenção da viabilidade celular (Williams; Abramovitch, 2023).

A fisiopatologia da Tuberculose no organismo tem início com a inalação dos bacilos álcool-ácido resistentes, ou bacilos de Koch, que são levados para os pulmões. O sistema imunológico humano identifica esses invasores e inicia uma resposta imune promovida por macrófagos, células especializadas do sistema imunológico (Middleton; Chadwick; Nicholson; Dewar *et al.*, 2002). Os macrófagos, portanto, realizam a fagocitose dos bacilos com o objetivo de eliminar os invasores, porém a *Mycobacterium tuberculosis* possui mecanismos que lhe permitem sobreviver e se replicar dentro dessas células. Inicialmente, pode ocorrer a inibição da fusão com lisossomos: A bactéria interfere na fusão dos fagossomos, vesículas que envolvem e digerem os patógenos, com os lisossomos, onde ocorre a degradação, impedindo que a bactéria seja digerida pelo macrófago (Rajaram; Arnett; Azad; Guirado *et al.*, 2017). A *Mtb* também demonstra resistência ao ambiente ácido já que possui uma parede celular rica em lipídios e outros componentes que a tornam mais resistente a condições ácidas e enzimas que normalmente destroem bactérias, mas para além disto, também possuem mecanismos (como a enzima KatG e proteína CpsA), que catabolizam peróxidos gerados pela NADPH-oxidase dos macrófagos (Köster; Upadhyay; Chandra; Papavinasasundaram *et al.*, 2017; Ng; Cox; Sousa; Macmicking *et al.*, 2004). Ainda, tem a capacidade de entrar em estado de latência dentro dos macrófagos, tornando-se metabolicamente inativa por longos períodos, que gera o escape do sistema imunológico a partir da formação de granulomas (Silva Miranda; Breiman; Allain; Deknuydt *et al.*, 2012). Por fim, a bactéria pode também modular a resposta imune, interferindo na ativação dos linfócitos T, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e impedindo a ativação completa do sistema imunológico (Chandra; Grigsby; Philips, 2022).

Apesar de todos estes mecanismos de evasão ao sistema imune, boa parte das bactérias são eliminadas. As células dendríticas entram em ação, capturando antígenos bacterianos e migrando para os gânglios linfáticos, onde apresentam esses antígenos aos linfócitos T. Os linfócitos T ativados, principalmente os do tipo Th1, desempenham um papel crucial na resposta imunológica contra a TB. Eles liberam citocinas, como o interferon-gama e TNF, que ativam os macrófagos para que se

tornem mais eficientes na destruição do patógeno (O'garra; Redford; McNab; Bloom *et al.*, 2013).

Com o tempo, quando o sistema imunológico não consegue eliminar completamente as bactérias, mas contém o crescimento e replicação, ocorre um equilíbrio entre o patógeno e o hospedeiro, levando a uma infecção latente. Nesse estágio, as bactérias estão inativas, mas ainda podem se tornar ativas posteriormente, caso o sistema imunológico fique comprometido (por exemplo durante coinfeção com HIV) (Getahun; Matteelli; Abubakar; Aziz *et al.*, 2015).

A intrincada composição da parede celular influencia diretamente a fisiopatologia da tuberculose. A impermeabilidade da parede celular limita a entrada de muitos antibióticos, tornando o tratamento da TB um desafio e exigindo regimes de polifarmácia que ajam em alvos diferentes (Jackson, 2014). Além disso, o ambiente rico em lípidos da parede celular permite que a *M. tuberculosis* persista nos macrófagos do hospedeiro, onde pode escapar à vigilância imunitária e estabelecer uma infecção latente (Rahlwes; Dias; Campos; Alvarez-Arguedas *et al.*, 2023). Ademais, a complexa arquitetura da parede celular contribui para a formação de granulomas, que são estruturas imunológicas organizadas e servem tanto como mecanismo de defesa do hospedeiro quanto como nicho para persistência bacteriana (Cronan, 2022). Dentro dos granulomas, a *M. tuberculosis* pode entrar em estado de dormência, permitindo a sobrevivência a longo prazo no hospedeiro. Adicionalmente, o envelope bacteriano ainda possui bombas de efluxo, que auxiliam na expulsão de fármacos e causam uma resistência natural inata e/ou adquirida as drogas anti-TB (Goossens; Sampson; Van Rie, 2020).

Por outro lado, a mesmas estruturas celulares que causam essa grande gama de fisiopatologias também são as principais fontes de interesse no desenvolvimento de terapias, visto que se tratam de estruturas específicas de células procariontas e, mais especificamente, de micobactérias, portanto, torna fármacos que agem nessas estruturas alvo-específicos. Abaixo estão descritos três alvos de interesse selecionados para estudo desta tese.

1.3 Enoil-ACP-redutase (InhA)

A enoil-ACP-redutase (PDB 4TRO; Figura 3), codificada pelo gene *inba*, é a enzima chave para a biossíntese de ácido micólico que, como citado previamente, é uma parte essencial da parede celular de *M. tuberculosis*, sendo o alvo principal do fármaco Isoniazida (Timmins; Deretic, 2006) e Etionamida (um análogo estrutural da Isoniazida) (Wang; Langley; Gulten; Dover *et al.*, 2007), fármacos de primeira e segunda linha, respectivamente, utilizados atualmente na terapêutica da TB. Porém, há anos já tem sido identificada resistência bacteriana contra ambos os fármacos (Morlock; Metchock; Sikes; Crawford *et al.*, 2003; Seifert; Catanzaro; Catanzaro; Rodwell, 2015).

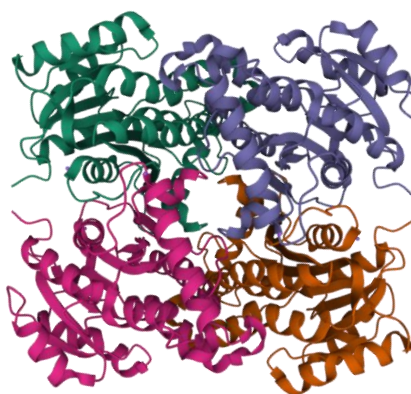


Figura 3. Estrutura cristalográfica da enoil-ACP-redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB 4TRO). Fonte: Protein Data Bank.

A Isoniazida, um pró-fármaco quimicamente denominado hidrazida do ácido nicotínico, adentra a bactéria por meio de difusão passiva e é ativada pela enzima catalase-peroxidase, ou KatG. Uma vez ativada, ela atua inibindo a enzima enoil-ACP-redutase a partir da formação de um aduto covalente com o cofator NADH da enzima. Essa inibição impede o alongamento e biossíntese de ácido micólico, o que causa a morte da bactéria (Figura 4) (Unissa; Subbian; Hanna; Selvakumar, 2016). O ácido micólico, como mencionado previamente, é um ácido graxo de cadeia longa, componente essencial da parede celular bacteriana e responsável por diversas funções, tais como suporte e integridade da parede celular, proteção às mudanças no ambiente, auxilia na evasão ao sistema imune e é responsável também por parte de sua virulência (Barkan; Hedhli; Yan; Huygen *et al.*, 2012; Vander Beken; Al Dulayymi; Naessens; Koza *et al.*, 2011; Verschoor; Baird; Grooten, 2012).

O principal mecanismo de resistência desenvolvido pela *Mtb* contra a Isoniazida e Etionamida são mutações em nucleotídeos do gene *katg*, que codifica a enzima KatG. Essas mutações genéticas pontuais geram modificações nos aminoácidos da proteína que interagem com a Isoniazida, gerando perda de afinidade. É bem reconhecida a substituição Ser315Thr (S315T), presente em 94% dos isolados clínicos resistentes à Isoniazida (Vilchère; Jacobs, 2014).

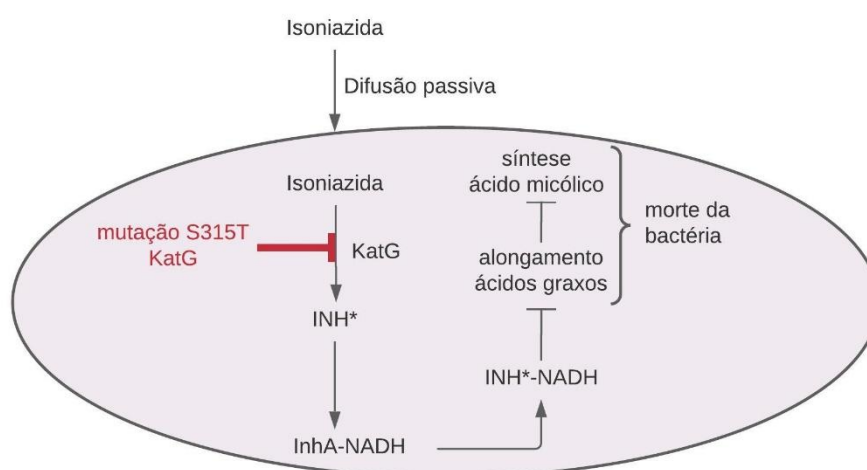


Figura 4. Mecanismo de ação da Isoniazida (INH) e mutação da KatG. S315T – mutação Serina315Treonina; KatG – enzima catalase-peroxidase; INH – Isoniazida; InhA-NADH – aduto enoil-ACP-redutase (InhA) associado com Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH).

Por ser um componente tão essencial para a sobrevivência da *Mtb*, a enoil-ACP-redutase tem sido o alvo mais pesquisado ao longo dos anos para busca de inibição (Timo; Reis; Melo; Costa *et al.*, 2019).

1.4 RNA polimerase (RNAPol)

Outro alvo de interesse é a RNA-polimerase (PDB 6CCV; Figura 5), enzima necessária para a etapa de transcrição genética, e é alvo do fármaco de primeira linha Rifampicina (Campbell; Korzheva; Mustaev; Murakami *et al.*, 2001). Porém, mutações em aminoácidos da enzima, em especial a mutação Ser531Leu (S531L), têm causado

um grande aumento na resistência a esse fármaco (Goldstein, 2014). A mutação destes aminoácidos faz com que o fármaco perca a afinidade pela enzima, permitindo que a transcrição dos genes seja realizada.

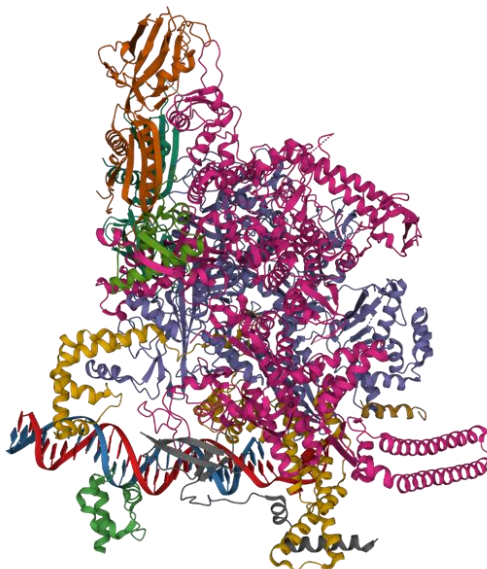


Figura 5. Estrutura cristalográfica da RNA-polimerase do complexo de iniciação de transcrição de *Mycobacterium smegmatis* (PDB 6CCV). Fonte: Protein Data Bank.

1.5 Mycobacterial Membrane Protein Large 3 (MmpL3)

A MmpL3 (PDB 6AJG; Figura 6), tem sido um novo alvo de interesse visto que a inibição da MmpL3 causa um acúmulo de precursores do ácido micólico no interior da célula e, como resultado, gera uma perturbação na integridade da parede celular. Como citado anteriormente, se trata de uma proteína transmembrana responsável, dentre outras funções, pelo trânsito de trehalose monomicolatos (TMM). Os TMMs atravessam do meio intracelular para a parede celular por meio da MmpL3, onde se ligarão com outros TMMs formando trehalose dimicolatos (TDM) e, posteriormente, a camada de ácido micólico, que compõe a parede celular juntamente com os

arabinogalactanos e peptidoglicanos (Rayasam, 2014). Portanto, inibidores desta proteína bloqueia tanto a divisão celular quanto a manutenção de bactérias viáveis.

Comparativamente, seu mecanismo age na mesma rota metabólica dos inibidores de enoil-ACP-redutase (perturbação da síntese de ácido micólico), porém através de um outro mecanismo de ação, o que se mostra interessante quando já existem tantos meios de resistência contra os inibidores de InhA (Bolla, 2020).

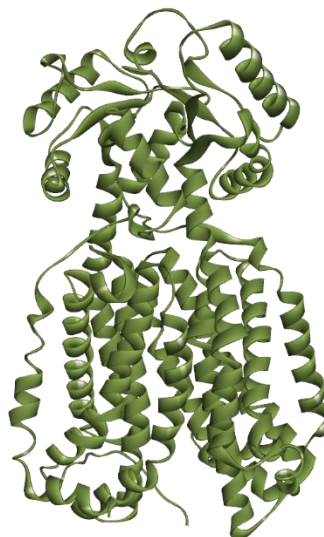


Figura 6. Estrutura cristalográfica da MmpL3 de *Mycobacterium smegmatis* (6AJG). Fonte: Protein Data Bank.

Uma observação digna de nota é a utilização da *Mycobacterium smegmatis* para o desenvolvimento dos PDBs de RNA-polimerase (6CCV) e MmpL3 (6AJG). Apesar da cepa ser considerada não patogênica, o *Mycobacterium smegmatis* compartilha uma notável semelhança genômica com o *Mycobacterium tuberculosis*. As duas bactérias compartilham aproximadamente 75% de seu material genético, e muitos dos fatores e mecanismos de virulência empregados pelo *Mycobacterium tuberculosis* se encontram conservados no *Mycobacterium smegmatis*. Esta semelhança genética permite que pesquisadores utilizem um organismo modelo mais seguro e de crescimento mais rápido para realização de experimentos (Gunasingam, 2023; Malhotra; Vedithi; Blundell, 2017).

1.6 Virtual Screening

Observando-se o processo de descoberta de um novo fármaco e sua liberação pelas agências regulatórias, é possível notar um longo período de pesquisa, diversos trâmites burocráticos além do alto investimento financeiro e pessoal. A utilização de metodologias *in silico* é capaz de diminuir muitas dessas dificuldades (Leelananda; Lindert, 2016). De forma geral, o *virtual screening* (termo em inglês para “varredura virtual”) é uma análise capaz de incorporar milhares ou até mesmo milhões de moléculas e realizar a interação com alvos proteicos para verificação de afinidade molecular, com o objetivo final de propor um mecanismo de ligação entre alvo e ligante (Da Silva Rocha; Olanda; Fokoue; Sant'anna, 2019). A metodologia pode ser realizada de duas maneiras. A primeira é a varredura virtual baseada em estrutura (*structure-based virtual screening*), que necessita de uma estrutura tridimensional de um determinado alvo disponível para posterior avaliação da interação com os pretendidos ligantes, baseando-se nos descritores químicos dos possíveis sítios de interação do alvo e, após docagem molecular, determina um *score* que classifica as melhores interações (Maia; Assis; De Oliveira; Da Silva *et al.*, 2020). A segunda é a varredura virtual baseada em ligante (*ligand-based virtual screening*), que utiliza uma base de dados de moléculas para análises que correlacionarão sua estrutura molecular e atividade farmacológica, utilizando, por exemplo, ferramentas de avaliação de similaridade baseadas em QSAR (do inglês *quantitative structure-activity relationship*) (Maganti; Grandhi; Ghoshal, 2016).

A técnica *in silico* pode, portanto, ser utilizada tanto para a descoberta de novas moléculas, como para auxiliar no reposicionamento de fármacos já existentes, visto que as estruturas dos fármacos estão disponíveis em diversos bancos de dados, como o PubChem, e as estruturas tridimensionais dos alvos estão disponíveis em outras bases de dados, como o Protein Data Bank (PDB). Assim sendo, necessita-se apenas de um *software* para realização da docagem molecular entre as duas estruturas, como Glide, Autodock, Gold, dentre outros (Stanzione; Giangreco; Cole, 2021).

1.7 Reposicionamento de fármacos

O conceito de reposicionamento descreve os estudos sobre fármacos aprovados para uma determinada doença, e verificação da segurança e eficácia destes sobre uma outra enfermidade. É um processo que auxilia na redução de tempo e recursos utilizados durante as etapas de fase I e II da pesquisa clínica, apesar de manter praticamente as mesmas dificuldades encontradas durante as fases III e IV das etapas regulatórias (Pushpakom; Iorio; Evers; Escott *et al.*, 2019).

Com a presença de grandes bases de dados, como citado anteriormente, o uso de técnicas de reposicionamento aumentou de forma fantástica, especialmente durante os anos críticos da pandemia (2020 e 2021), saltando de 781 pesquisas em 2019 para 1577 em 2021 (dados obtidos a partir da busca simples “drug repositioning” no site PubMed) (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Nesse sentido, o reposicionamento de fármacos é frequentemente realizado em quatro etapas. Primeiramente é determinado um alvo terapêutico e então é realizada uma varredura virtual *in silico*, onde é feita a interação dos milhares de possíveis ligantes disponíveis em bases de dados com um determinado alvo por técnicas de docagem. Em segundo lugar, são realizados ensaios *in vitro* com as melhores moléculas encontradas. As últimas duas etapas são a realização de ensaios clínicos para a indicação terapêutica proposta e a posterior farmacovigilância (Gns; Gr; Murahari; Krishnamurthy, 2019).

Há décadas a técnica do reposicionamento de fármacos vem sendo usada com sucesso no mercado, como nos exemplos da zidovudina, que inicialmente foi proposta para tratamento oncológico, e hoje é aprovada para HIV/AIDS, ou do Minoxidil, desenvolvido para hipertensão e atualmente usado para alopecia. O Sildenafil, originalmente desenvolvido para tratamento de angina, hoje é usado para a disfunção erétil, dentre muitos outros exemplos (Pushpakom; Iorio; Evers; Escott *et al.*, 2019). Em contrapartida, para o tratamento da TB há pouca informação disponível sobre o reposicionamento de fármacos. Os principais casos envolvem o reposicionamento da clofazimina, originalmente desenvolvida para hanseníase, carbapenêmicos em associação com Clavulanato (mais especificamente o Ertapenem) e novas gerações da Linezolida, como a Sutezolida e a Delpazolida (Silva; Dalcolmo; Tiberi; Arbex *et al.*, 2018). Recentemente, o reposicionamento do Verapamil, um bloqueador de canais de cálcio, foi proposto por ter-se demonstrado que este fármaco atua nas bombas de efluxo bacterianas, outro mecanismo de resistência (Sharma; Dhuriya; Deo; Bisht, 2017; Te Brake; De Kneegt; De Steenwinkel; Van Dam *et al.*, 2018). Não obstante, os

resultados das pesquisas encontradas até o momento ainda precisam de um maior aprofundamento para obter desfechos concretos.

Apesar de todo o empenho internacional encontrado em pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos inovadores contra a tuberculose, pouquíssimos ultrapassam a fase pré-clínica, ou as fases clínicas I e II, com os únicos exemplos recentes sendo a Bedaquilina e Delamanide, citados anteriormente (Saúde, 2019), tornando o reposicionamento uma ferramenta visada pela comunidade científica.

Em contrapartida, é necessário ter cautela no momento de transpor os resultados iniciais de uma análise *in silico* e até mesmo *in vitro*, na hora da realização de um reposicionamento. Haja visto a precipitação no que diz respeito ao rápido reposicionamento de fármacos para o tratamento do SARS-CoV-2. Não obstante, o reposicionamento utilizando técnicas *in silico* tem auxiliado bastante na procura de soluções contra o coronavírus (Mongia; Saha; Chouzenoux; Majumdar, 2021) e tem sido usado há décadas com êxito em diversos casos, como os citados acima. À vista desse contexto, podemos supor que é possível também realizá-lo para a tuberculose.

A utilização de uma abordagem *in silico* para efetuar o reposicionamento de fármacos pode ser uma alternativa eficaz para detectar novos mecanismos de ação para um fármaco já existente e, portanto, reduzir tempo e custos do desenvolvimento de um novo fármaco, principalmente quando novos fármacos anti-TB são urgentemente necessários. Além disto, a metodologia *in silico* também pode ser utilizada na otimização da busca de dados em toxicologia.

1.8 Otimização de resultados utilizando toxicidade *in silico*

O Sistema Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (ou GHS, do inglês *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) é um conjunto de normas técnicas criado para padronizar e classificar substâncias e misturas de acordo com três especificações: perigos à saúde, ao ambiente e físicos. O sistema foi criado com o objetivo de informar sobre os riscos durante produção, transporte e manuseio de uma determinada substância a fim de diminuir potenciais contaminações, e os fármacos estão incluídos nesta esfera. A

classificação leva em conta tanto resultados de ensaios *in vitro* quanto *in vivo* e também dados epidemiológicos e clínicos (Un, 2011).

Considerando isto, os fármacos normalmente se enquadram nas mesmas classificações GHS, visto que para sua aprovação precisam ser considerados seguros à saúde, com exceção de algumas classes, como antineoplásicos, que naturalmente necessitam ser mais tóxicos. Baseando-se nesta informação, torna-se interessante desenvolver um método computacional comparativo para racionalizar as informações toxicológicas de fármacos e determinar os menos tóxicos à saúde a título de seleção ou eliminação para seguimento em pesquisas ou até mesmo para classificação de compostos por agências reguladoras (Rybacka; Rudén; Andersson, 2014; Sun; Xia; Austin; Huang, 2012).

Para este fim, existem diversos *softwares* que analisam a relação estrutural-atividade (QSAR) entre grupos farmacofóricos e a produção de um determinado efeito toxicológico. Alguns gratuitos, como por exemplo admetSAR (Cheng; Li; Zhou; Shen *et al.*, 2012) e PROTOX (Banerjee; Eckert; Schrey; Preissner, 2018) (ambos para toxicidade aguda oral), Lazar (Maunz; Gütlein; Rautenberg; Vorgrimmler *et al.*, 2013) e OpenVirtualToxLab (Vedani; Dobler; Hu; Smieško, 2015) (ambos para toxicidade oral crônica). Outros pagos, porém, com uma análise mais abrangente, como o TOPKAT CASE Ultra (Chakravarti; Saiakhov; Klopman, 2012) e Lhasa Nexus Suite (Ponting; Burns; Foster; Hemingway *et al.*, 2022).

A Lhasa Limited® foi fundada em 1983 como uma organização sem fins lucrativos com o objetivo de promover uma colaboração entre indústrias e pesquisas a partir do compartilhamento de dados químicos e toxicológicos de suas substâncias (Marchant; Briggs; Long, 2008). Estas informações foram utilizadas para criar o sistema Nexus, uma ferramenta *in silico* que provê predições toxicológicas e metabólicas a partir dos dados fornecidos pelas entidades. Para a pesquisa, foram selecionadas as funcionalidades Derek, Sarah, ICH M7, Meteor e Vitic do *software* Nexus.

1.8.1 Derek

O software Derek, ou “*Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge*” é um sistema capaz de prever efeitos tóxicos de uma molécula baseada em informações de bases de dados e dados fornecidos por parceiros da Lhasa® sobre grupos toxicofóricos, ou seja, estruturas de uma molécula capazes de gerar toxicidade (Figura 7). O resultado do Derek é baseado em regras, alertas e *endpoints* considerando estruturas químicas que já foram testadas e demonstraram efeitos toxicológicos em bactérias e em mamíferos (Cariello; Wilson; Britt; Wedd *et al.*, 2002; Diukendjieva; Al Sharif; Alov; Pencheva *et al.*, 2017; Greene; Judson; Langowski; Marchant, 1999; Marchant; Briggs; Long, 2008). Sendo predições, os resultados do Derek possuem níveis de probabilidade de ocorrência. O sistema oferece 17 níveis de certeza (Figura 8), onde ele considera positivos os resultados de plausíveis (*plausible*) para cima e negativos os resultados equívocos (*equivocal*) para baixo.

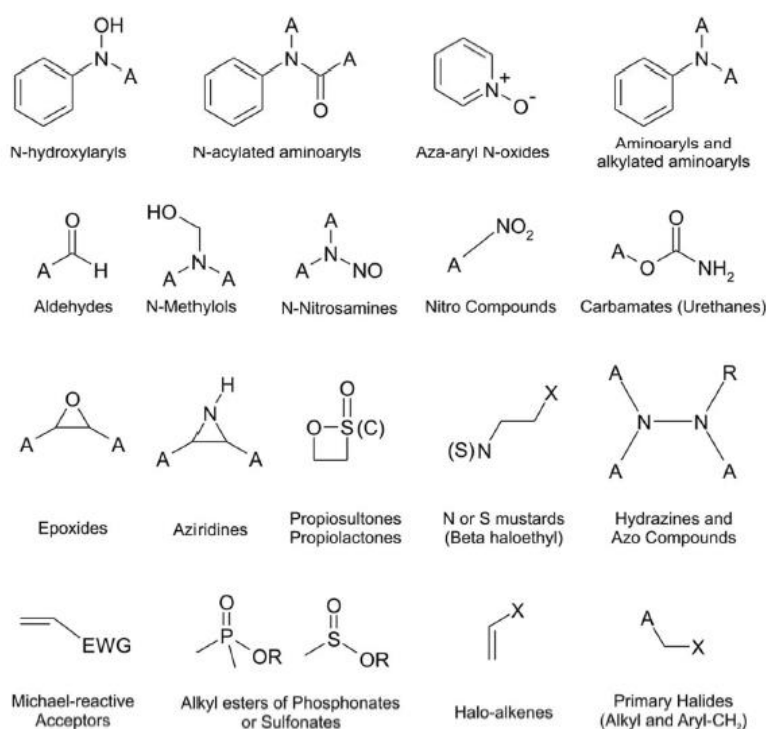


Figura 7. Estruturas químicas de grupos toxicofóricos genotóxicos. Fonte: (Melo; Homem-De-Mello; Silveira; Simeoni, 2014).

Glossary

Certain

There is proof that the proposition is true.

Probable

There is at least one strong argument that the proposition is true and there are no arguments against it.

Plausible

The weight of evidence supports the proposition.

Equivocal

There is an equal weight of evidence for and against the proposition.

Doubted

The weight of evidence opposes the proposition.

Improbable

There is at least one strong argument that the proposition is false and there are no arguments that it is true.

Impossible

There is proof that the proposition is false.

Open

There is no evidence that supports or opposes the proposition.

Contradicted

There is proof that the proposition is both true and false.

Inactive, no misclassified or unclassified features

The query structure does not match any structural alerts or examples in Derek which show activity in a bacterial reverse mutation assay (Ames test). Additionally, the query structure does not contain any unclassified or misclassified features.

Inactive, contains misclassified features

Features in the molecule are found in non-alerting mutagens in the Lhasa reference set. The prediction remains negative and the misclassified features are highlighted to enable the negative prediction to be verified by expert assessment.

Inactive, contains unclassified features

Some features in the molecule have not been found in the Lhasa reference set. The prediction remains negative and the unclassified features are highlighted to enable the negative prediction to be verified by expert assessment.

Inactive, contains misclassified and unclassified features

The query structure contains features that are misclassified and features that are unclassified. These are highlighted on the structure.

Non-sensitiser, no misclassified or unclassified features

The query structure does not match any structural alerts or examples for skin sensitisation in Derek. Additionally, the query structure does not contain any unclassified or misclassified features.

Non-sensitiser, contains misclassified features

Features in the molecule are found in non-alerting sensitisers in the Lhasa skin sensitisation negative prediction dataset. The prediction remains negative and the misclassified features are highlighted to enable the negative prediction to be verified by expert assessment.

Non-sensitiser, contains unclassified features

Some features in the molecule have not been found in the Lhasa skin sensitisation negative prediction dataset. The prediction remains negative and the unclassified features are highlighted to enable the negative prediction to be verified by expert assessment.

Non-sensitiser, contains misclassified and unclassified features

The query structure contains features that are misclassified and features that are unclassified. These are highlighted on the structure.

Figura 8. Glossário das probabilidades consideradas pelo sistema Derek. Fonte: Documento gerado pelo sistema Derek (v.6.1.0).

Para estabelecer os níveis de confiança citados acima, o sistema estabelece regras baseadas em seis informações: desfecho, alerta, espécie (bactéria ou mamífero), dados de toxicidade, propriedades físico-químicas e peso molecular, a depender dos dados disponíveis. Para exemplificação do sistema Derek, foi selecionado o fármaco Carfilzomib, um medicamento antineoplásico inibidor seletivo de proteassoma. Na Figura 9, pode-se verificar que um dos *endpoints* gerados por ele foi de toxicidade de desenvolvimento (que diz respeito ao desenvolvimento fetal em caso de mulheres grávidas), com a probabilidade plausível. De forma simplificada, os dois parâmetros que influenciaram esta predição foram a espécie (mamífero) e a

Reasoning Summary

- ◆ **Carcinogenicity in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 072 Epoxide
- ◆ **Chromosome damage in vitro in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 019 Epoxide
- ◆ **Chromosome damage in vivo in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 019 Epoxide
- ◆ **Developmental toxicity in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 602 Epoxide
- ◆ **HERG channel inhibition in vitro in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 646 HERG Pharmacophore I
- ◆ **Irritation (of the eye) in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 222 Epoxide
- ◆ **Irritation (of the skin) in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 222 Epoxide
- ◆ **Mutagenicity in vitro in bacterium is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 019 Epoxide
- ◆ **Mutagenicity in vivo in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 019 Epoxide
- ◆ **Skin sensitisation in mammal is PLAUSIBLE**
 - Alert matched: 433 Epoxide

Figura 10. **Endpoints** acionados por grupos toxicofóricos do Carfilzomib. Fonte: Documento gerado pelo sistema Derek (v.6.1.0).

Endpoints not firing any alerts at the selected reasoning level (51)

Salpha-Reductase inhibition	Nephrotoxicity
Adrenal gland toxicity	Neurotoxicity
alpha-2-mu-Globulin nephropathy	Non-specific genotoxicity in vitro
Anaphylaxis	Non-specific genotoxicity in vivo
Androgen receptor modulation	Occupational asthma
Bladder disorders	Ocular toxicity
Bladder urothelial hyperplasia	Oestrogen receptor modulation
Blood in urine	Oestrogenicity
Bone marrow toxicity	Peroxisome proliferation
Bradycardia	Phospholipidosis
Cardiotoxicity	Photo-induced chromosome damage in vitro
Cerebral oedema	Photo-induced non-specific genotoxicity in vitro
Chloracne	Photo-induced non-specific genotoxicity in vivo
Cholinesterase inhibition	Photoallergenicity
Cumulative effect on white cell count and immunology	Photocarcinogenicity
Cyanide-type effects	Photomutagenicity in vitro
Glucocorticoid receptor agonism	Phototoxicity
Hepatotoxicity	Pulmonary toxicity
High acute toxicity	Respiratory sensitisation
Irritation (of the gastrointestinal tract)	Splenotoxicity
Irritation (of the respiratory tract)	Teratogenicity
Kidney disorders	Testicular toxicity
Kidney function-related toxicity	Thyroid toxicity
Lachrymation	Uncoupler of oxidative phosphorylation
Methaemoglobinaemia	Urolithiasis
Mitochondrial dysfunction	

Figura 11. **Endpoints** não acionados pelo fármaco Carfilzomib. Fonte: Documento gerado pelo sistema Derek (v.6.1.0).

O *software* ainda mostra as referências de onde foram retiradas as informações usadas para prever os *endpoints* e exemplos de moléculas que também contém o determinado radical para exemplificação (Figura 12).

The screenshot displays the Derek Prediction software interface. On the left, the main window shows a chemical structure with an epoxide group highlighted in red. Below the structure, a message reads: "'Alert 072' selected, click above to view the original structure". The 'Prediction Navigator' pane below shows a tree view of endpoints, with 'Alert - 072: Epoxide' selected. On the right, the 'Alert Details' pane shows a table of references and a section for 'Examples' with chemical structures for styrene, ethylene oxide, and others.

ID	Title	Author	Source	Year	Su...
53	Mechanisms of e	Parker RE a	Chemical R	1959	DOL:
67	Re-evaluation of	Internation	IARC Monc	1999	Note
75	DNA adducts of	Dipple A.	Carcinoger	1995	Note
75	Guanine-adenine	Park S, Hoc	Chemical R	2004	Note
75	DNA interstrand	Romano KI	Chemical R	2007	Note
75	Lack of tumorige	El-Bayoum	Cancer Res	1996	

Figura 12. Mecanismo de predição do software Derek. À esquerda, é apresentada a estrutura completa da molécula, com o epóxido em sombreado. Na caixa abaixo, mostra-se os *endpoints* gerados pelo alerta, o organismo afetado e a probabilidade de ocorrência, o código do alerta gerado pelo sistema e o grupo toxicofórico. À direita estão mostradas as referências para consulta e exemplos de moléculas que contenham o mesmo alerta. Fonte: Printscreen do layout do sistema Derek (v.6.1.0).

1.8.2 Sarah

A funcionalidade Sarah (*Statistical based software for the prediction of mutagenicity*) age como um modelo estatístico para predição de mutagenicidade *in vitro* de uma molécula baseado no Teste de Ames (Honma, 2020). O Teste de Ames é um ensaio *in vitro* utilizado para determinação do potencial mutagênico de uma determinada molécula. O teste utiliza diversas cepas de *Salmonella typhimurium* com modificação nos genes envolvidos na síntese de histidina, um aminoácido essencial, tornando-as incapaz de produzi-lo e, portanto, dependentes de um meio enriquecido de histidina para crescer. A molécula é considerada mutagênica se for verificado o crescimento da cepa em meio livre de histidina, significando que houve uma mutação nos genes de produção da histidina e agora a bactéria é capaz de produzi-la. O modelo Sarah é baseado em dados públicos disponíveis e de doações de parceiros

relacionados ao Teste de Ames, que foram curados por membros da Lhasa® e inseridos no *software*.

O *software* Sarah funciona de duas formas. Primeiro, caso haja um “*exact match*”, ou seja, uma molécula exatamente igual a de pesquisa no *software*, será gerado um resultado com 100% de confiança para um resultado NEGATIVO ou POSITIVO para mutagenicidade baseado no Teste de Ames já realizado e curado. Segundo, caso um *exact match* não seja encontrado, o *software* dará seguimento às análises estatísticas. Inicialmente, irá dividir a molécula inicial em diversos fragmentos e irá analisar individualmente cada fragmento baseado no Teste de Ames. Posteriormente, irá procurar em sua base de dados moléculas com variáveis porcentagens de similaridade com a de interesse e seus resultados *in vitro*, sendo esta similaridade baseada no coeficiente de Tanimoto (Rogers; Tanimoto, 1960; Tanimoto, 1958). Ao fim, gerará uma probabilidade estatística utilizando os resultados positivos e negativos dos fragmentos associado aos resultados positivos e negativos dos seus semelhantes, considerando também a porcentagem de similaridade deles com a molécula de pesquisa. Ao fim, será fornecido um resultado negativo ou positivo de mutagenicidade e a porcentagem de confiança (de 0 a 100%) desse outcome baseado na análise estatística citada.

Por exemplo, na Figura 13 está demonstrado o fármaco Latanoprosteno, aprovado para glaucoma de ângulo aberto e hipertensão ocular. O *software* Sarah não conseguiu identificar em sua base de dados um *exact match*, logo, o modelo estatístico considera os resultados dos fragmentos moleculares (chamados “*hypothesis*” e sombreados em verde) e os resultados dos seus similares (*training set examples*), junto com a porcentagem de similaridade destes com o fármaco original (por exemplo, o primeiro selecionado, que possui 80% de similaridade). Portanto, baseado nas análises estatísticas desses dados, o *software* prediz que o Latanoprosteno é negativo para mutagenicidade com 64% de confiança.

The screenshot displays the Sarah Predict software interface. The main window shows the prediction result for the 'Mutagenicity in vitro' endpoint: **NEGATIVE** with 64% confidence. Below this, the chemical structure of Latanoprosteno is shown. A sidebar on the left lists 'Hypotheses' with molecular fragments and their similarity percentages (e.g., 67%, 66%). The central area shows 'Training set examples' as a grid of 12 small chemical structures with their respective similarity percentages (e.g., 80%, 52%, 45%, etc.). The right sidebar, titled 'Example compound', shows the chemical structure of Latanoprosteno and reports an 'Overall Call: Negative' and 'Similarity: 80%'. It also includes source information: 'Source: Vitic Summary Call Table', 'Dataset Call: Negative', 'Source activity call: Negative', and 'Structure ID: CAS RN®'.

Figura 13. Mecanismo de predição do programa Sarah. À esquerda está demonstrado o resultado da análise estatística para o composto de exemplo Latanoprosteno. Ao meio estão os fragmentos moleculares e moléculas vizinhas com suas porcentagens de similaridade com o fármaco original. À direita, está o primeiro fármaco com maior semelhança e seu resultado do Teste de Ames. Fonte: Printscreen do layout do sistema Sarah (v.3.1.0).

1.8.3 ICH M7

A Lhasa[®] dispõe ainda outra funcionalidade dentro do *software* chamado ICH M7 (*International Council on Harmonisation (ICH) M7 guideline*), que associa os resultados de mutagenicidade do Derek e da Sarah para gerar uma predição integrada de mutagenicidade para um composto e facilitar as análises, principalmente por agências regulatórias (Landry; Kim; Kruhlak; Cross *et al.*, 2019). Nós também utilizamos esse resultado extra de toxicidade para contabilizar nas análises dos fármacos.

Neste caso, a análise da Sarah é a mesma, pois sua análise já é apenas de mutagenicidade. No caso do Derek, o sistema faz uma análise apenas do *endpoint* de mutagenicidade *in vitro* em bactérias, que pode ser interpretado como um composto que possui um grupo toxicofórico com potencial mutagênico. Na figura abaixo (Figura 14), ainda sobre o exemplo do Latanoprosteno citado acima, pode-se identificar que o resultado da Sarah continua o mesmo, já o Derek mostra um resultado simplificado

“inativo (---)”, significando que o composto foi considerado inativo com índice de confiança que o sistema denomina como (---; três sinais negativos em quatro possíveis). Associando ambos os resultados, o sistema gera uma predição *in silico* geral, onde descreve o resultado final do composto Latanoprosteno como “Nenhum toxicóforo relevante foi identificado por ambos os sistemas. Tanto Sarah quanto Derek realizaram uma predição negativa para o composto. Não há razão para duvidar desta predição. Como resultado, uma predição *in silico* negativa pode ser realizada.”

Portanto, o sistema fornece uma predição geral de mutagenicidade para o composto, mas deixa nas mãos do investigador acatar ou não o resultado, escrever outros argumentos e, ao final, finalizar a predição gerando um relatório com todas as informações (finalize review).

2 predictions related to ICH M7 (for Mutagenicity in Bacterium) have been run for this structure.

Type	Endpoint	Species	Result	Model
ICH M7 Prediction-5				
Derek	Mutagenicity in vitro	bacteriu m	INACTIVE - - -	Derek KB 2020 1.0
Sarah	Mutagenicity in vitro	bacteriu m	NEGATIVE (64%) - - - -	Sarah Model - 2020.1

In Silico Expert Review

In Silico Overall Call: Negative (Calculated Call) ▾

Arguments Available	Argument Out...	Arguments Used	Argument Out...
<p>37 - No relevant toxicophore has been identified by either system Both Sarah Nexus and Derek Nexus have made a negative prediction for the query compound. There is no reason to doubt these predictions. As a result, an overall in silico prediction of negative can be made.</p>	Negative		

Finalise Review

Figura 14. Mecanismo de predição do sistema ICH M7. Predições relacionadas ao sistema ICH M7 (especificamente para o *endpoint* de Mutagenicidade em bactéria) realizado para a estrutura química do fármaco Latanoprosteno. A figura mostra as predições realizadas pelos sistemas Derek e Sarah no que diz respeito à mutagenicidade *in vitro* em bactérias e determinou, respectivamente, inativo (---) e negativo (64% de confiabilidade). O ICH M7 gera, portanto, um argumento levando em consideração ambos os resultados do Derek e Sarah, onde nenhum toxicóforo relevante foi identificado pelo sistema, e provê um resultado *in silico* geral (*in silico overall call*) como “negativo” para o composto em questão. Fonte: Printscreen do layout do sistema ICH M7.

1.8.4 Vitic

O Vitic é uma funcionalidade do *software* que age como uma junção de diversas bases de dados a respeito de informações toxicológicas (Marchant; Briggs; Long, 2008). Assim como nas outras funcionalidades, o pesquisador insere a molécula de pesquisa no *software* e ao selecionar o programa Vitic, o sistema faz uma varredura em bases de dados e pode prover informações sobre 11 *endpoints* diferentes para a molécula de interesse (Figura 15). É interessante citar que os *endpoints* do sistema Vitic são abrangidos pelo Derek. Entretanto neste caso, não é realizada nenhuma predição, o sistema simplesmente faz um apanhado dos resultados já obtidos sobre a estrutura de interesse relacionado aos *endpoints* disponíveis e mostra ao pesquisador de forma sistematizada. Caso não haja um *exact match*, o pesquisador ainda pode optar por pesquisar moléculas com diferentes graus de similaridade (40%-100%) com a molécula de interesse (Figura 15), novamente baseado na similaridade de Tanimoto (Tanimoto, 1958).

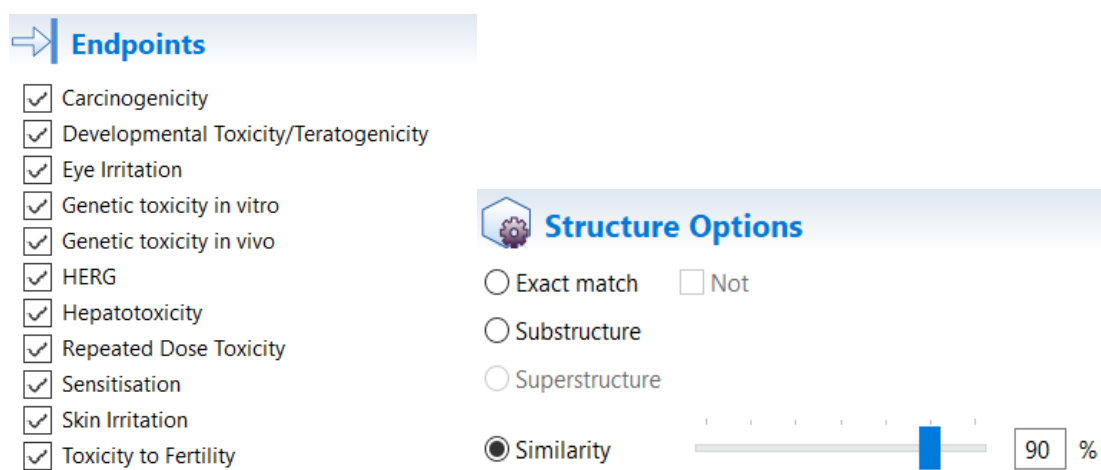


Figura 15. Mecanismo de atividade do sistema Vitic. À esquerda, todos os *endpoints* analisados pelo Vitic. À direita, as possíveis opções de busca por estrutura no sistema. Fonte: Printscreen do layout do sistema Vitic (v.3.1.0).

1.8.5 Meteor

O Meteor é uma funcionalidade que prevê as rotas metabólicas de um determinado composto. Ele utiliza uma base de dados que relaciona as vias metabólicas existentes com as estruturas químicas do composto estudado, ou seja, analisa a relação estrutura-metabolismo (Al Sharif; Vitcheva; Simeonova; Krasteva *et*

al., 2019; Tyrkkö; Pelander; Ketola; Ojanperä, 2013). O Meteor aplica regras que discriminam entre as possíveis rotas metabólicas, encontrando a mais provável dentre elas. Na figura abaixo (Figura 16) está exemplificado um recorte do metabolismo do fármaco Carvedilol no Meteor.

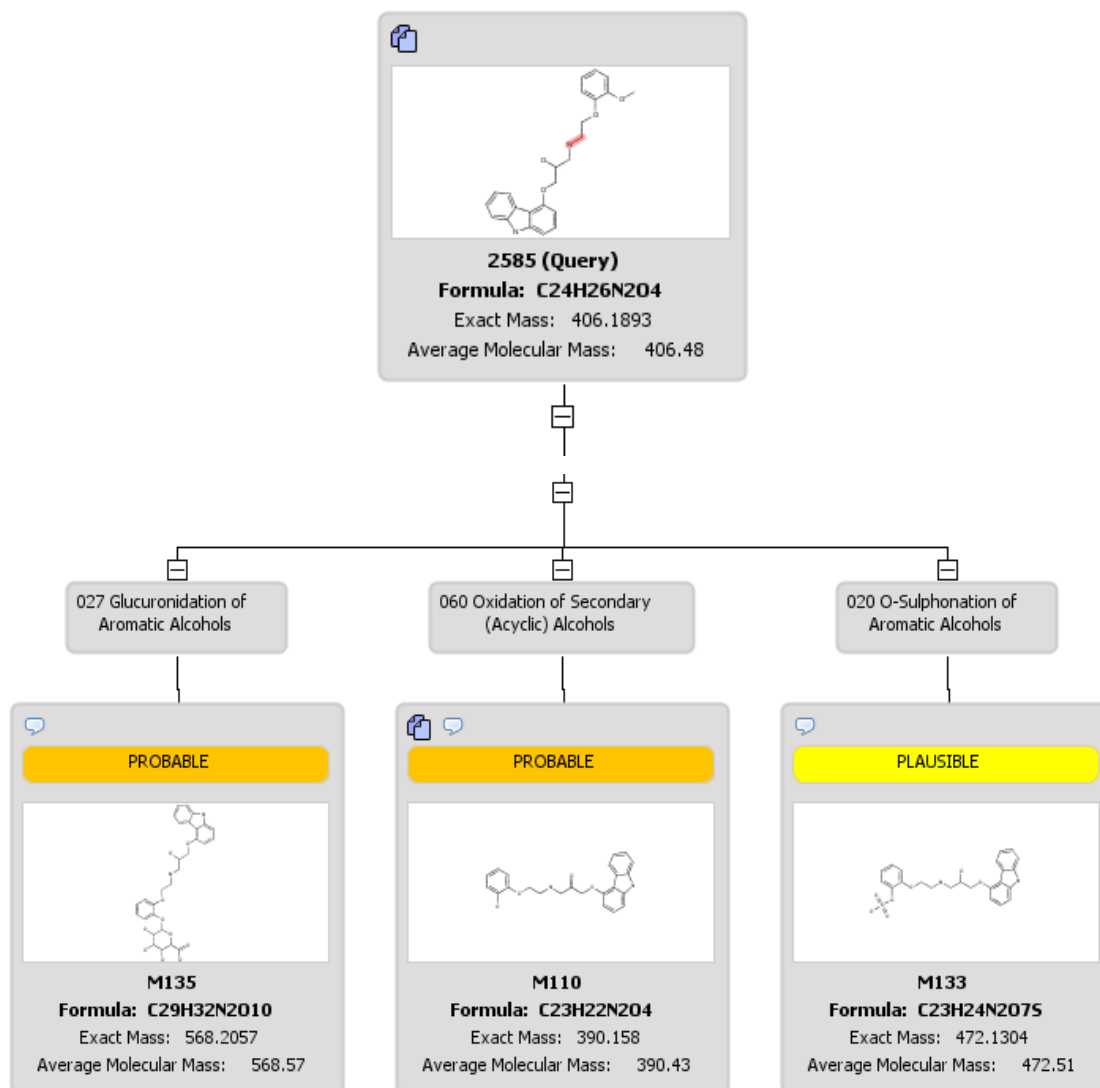


Figura 16. Mecanismo de predição do sistema Meteor. Fragmento da predição de metabolismo Meteor para o fármaco Carvedilol. Verifica-se a via metabólica utilizada, a probabilidade da formação do metabolito, o código do sistema para cada metabolito, sua fórmula química e massa molecular. Fonte: Printscreen do layout do sistema Meteor.

1.9 Ensaios *in vitro*

Após a realização do virtual *screening*, é importante corroborar os resultados obtidos *in silico* por meio de ensaios *in vitro*. Para fármacos antimicrobianos a metodologia mais utilizada é a análise da concentração inibitória mínima (CIM, ou MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*) (Timo; Reis; Melo; Costa *et al.*, 2019). Por definição, é a concentração mínima de um determinado composto que é capaz de inibir o crescimento bacteriano. Este teste é bastante eficaz na confirmação da atividade biológica prevista *in silico* (Krishnasamy; Namasivayam; Mathew; Eakambaram *et al.*, 2016; Saharan; Mahajan, 2017; Swain; Paidesetty; Padhy, 2017) e serve como triagem para determinar se um fármaco é ativo contra uma determinada patologia, devido ao fato de ser um experimento relativamente simples, barato e não necessariamente depender de um equipamento para realizar a leitura dos resultados, apesar disto tornar o entendimento do resultado mais subjetivo.

Outra metodologia *in vitro* muito utilizada é a análise de inibição enzimática (IC₅₀). A análise de IC₅₀ é utilizada para determinar a concentração de um determinado composto capaz de inibir 50% da atividade de um alvo enzimático e é, também, eficaz na análise dos resultados obtidos *in silico* (Hamza; Wagner; Evans; Frasinuk *et al.*, 2014; Jeankumar; Renuka; Kotagiri; Saxena *et al.*, 2014; Wang; Zhu; Cui; Dong *et al.*, 2013).

Para além destes ensaios, existem diversas outras metodologias que podem ser utilizadas não apenas para determinar inibição de crescimento bacteriano, mas também para verificar mecanismo de ação através de análises de alvos específicos. No presente estudo, também foram utilizadas as metodologias de cromatografia em camada delgada (CCD) para análise de inibição de ácidos micólicos específicos de *Mtb* e também Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) para verificação do potencial dos fármacos teste em aumentar a expressão de dois alvos específicos (a saber, InhA e *iniB*). Ainda além, foi aplicado o experimento *in vitro* de inibição intracelular utilizando a linhagem THP-1 de monócitos para determinar a capacidade dos fármacos em eliminar carga bacteriana intracelular.

2 JUSTIFICATIVA

A tuberculose é uma doença de longa data que tem desafiado a comunidade médica ao longo da história. O surgimento de cepas resistentes aos tratamentos convencionais, juntamente com a escassez de novos medicamentos inovadores, ressalta a necessidade premente de estratégias alternativas. O contexto histórico apresentado mostra a evolução da resistência bacteriana, desde os primeiros tratamentos com STREP até as atuais cepas multirresistentes, destacando a urgência de novas abordagens terapêuticas.

A combinação de técnicas *in silico* e *in vitro* representa uma abordagem interdisciplinar poderosa para o reposicionamento de medicamentos. A análise *in silico* permite uma triagem rápida e eficiente de moléculas candidatas, identificando aquelas com potencial atividade contra alvos específicos em *Mycobacterium tuberculosis*. Em seguida, os compostos selecionados podem ser avaliados *in vitro* para validar sua eficácia e segurança, proporcionando uma abordagem abrangente e confiável para a descoberta de novos tratamentos.

A vasta quantidade de dados disponíveis sobre compostos químicos e alvos biológicos oferece uma oportunidade única para o reposicionamento de medicamentos. A abordagem *in silico* permite explorar essa riqueza de informações de forma eficiente, identificando candidatos promissores com base em conhecimentos prévios sobre a interação medicamento-alvo. Isso otimiza o processo de descoberta, economizando tempo e recursos, e potencialmente acelerando a disponibilidade de novos tratamentos para a tuberculose.

Dada a persistência da tuberculose como um desafio de saúde global, é imperativo buscar soluções inovadoras e acessíveis. A integração de técnicas *in silico* e *in vitro* não apenas representa uma abordagem eficaz para a descoberta de novos medicamentos, mas também pode oferecer uma perspectiva de custo-efetividade em comparação com métodos tradicionais. Além disso, ao acelerar o processo de desenvolvimento de novos tratamentos, essa abordagem pode contribuir significativamente para os esforços de controle e erradicação da tuberculose em escala mundial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Encontrar fármacos com potencial de reposicionamento para tratamento da tuberculose, através de técnicas *in silico* e avaliação *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar fármacos aprovados para uso humano por *virtual screening* com potencial de interação com alvos de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Desenvolver um algoritmo para classificação dos fármacos eleitos previamente de acordo com a sua toxicidade.
- Executar ensaios *in vitro* utilizando os fármacos designados contra cepas selvagens e resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Estudar o mecanismo de ação postulado por trás da atividade dos fármacos com melhor atividade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação *in silico*

Durante estudos prévios do Laboratório de Toxicologia *in silico* da Universidade de Brasília (InSiliTox), foram selecionados três alvos de *Mycobacterium tuberculosis* (InhA, RNAPol e MmpL3). Em resumo, os alvos foram retirados do Protein Data Bank (PDB – <https://www.rcsb.org/>) e os critérios para a seleção destes foram:

- I. Resolução da estrutura cristalográfica (resolução abaixo de 3 angstroms (Å) é o recomendado devido à maior precisão estrutural da proteína);
- II. Presença de ligante conhecido pela atividade farmacológica contra o *M. tuberculosis* na estrutura cristalizada. Isto se mostra importante por conta da identificação mais clara e simples de sítios de ligação.

Após a seleção dos alvos, foi realizada uma busca na base de dados Integrity (Clarivate Analytics), a respeito de fármacos previamente aprovados por agências reguladoras mundiais. Posteriormente, foi realizado o *download* das estruturas moleculares através da base PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), foram determinadas exclusões e posteriormente foi realizado a docagem molecular de 1813 moléculas em cada um dos três alvos proteicos citados acima utilizando o *software* GOLD 5.7.0 (Cambridge Crystallographic Data Center). A partir do *score* CHEMPLP obtido pelo *software*, foi realizado um *cutoff* dos 20% melhores resultados e estes fármacos foram selecionados para a análise toxicológica computacional.

4.1.1 Desenvolvimento de algoritmo para análise de toxicidade comparativa.

Os fármacos selecionados foram então testados quanto à toxicidade, mutagenicidade e previsão de metabolismo por meio de métodos *in silico* utilizando

as funcionalidades Derek, Sarah, ICH M7, Vitic e Meteor do *software* Nexus da Lhasa®, a fim de classificar as moléculas em função de sua toxicidade para posterior ensaio *in vitro*.

Foi utilizada a versão 2.3.1 do software Nexus e, para cada funcionalidade, foram utilizadas as seguintes versões para o processamento de informações:

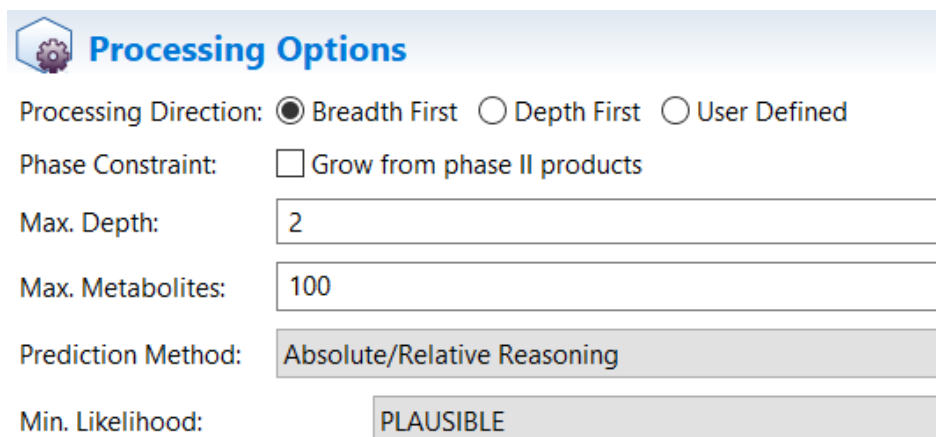
Derek: 6.1.0

Sarah: 3.1.0

Vitic: 3.1.0 (informações contidas no sistema até 03/2022)

Meteor: 3.1.0

Os fármacos tiveram seus arquivos SDF baixados do site PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e foram inseridos individualmente em cada interface do software. Para a maioria dos programas, utilizamos as configurações *default* do sistema para as análises. Especificamente para o Meteor, as configurações foram modificadas, cujas opções de processamento estão explanadas na Figura 17.



Processing Options

Processing Direction: Breadth First Depth First User Defined

Phase Constraint: Grow from phase II products

Max. Depth:

Max. Metabolites:

Prediction Method:

Min. Likelihood:

Figura 17. Configuração de processamento utilizada no sistema Meteor. Fonte: Printscreen do layout do sistema Meteor.

Primeiramente, selecionamos a restrição de probabilidade (*Min. Likelihood*) como plausível, considerando que o próprio sistema classifica como positivas as predições com o mínimo de probabilidade na opção “plausível” (que também coleta informações prováveis e certas). Segundo, selecionamos a direção de processamento como “amplitude primeiro” (*Breadth First*), que coleta informações amplas sobre as rotas de metabolismo. Após, selecionamos profundidade máxima (*Max. Depth*) de

dois, que representa a predição de metabólitos oriundos de metabólitos primários. Na sequência, foi fixado o limite máximo de 100 metabólitos e, por fim, o método de predição como absoluto/relativo. Este método estuda a probabilidade absoluta da biotransformação acontecer e a análise relativa, que avalia comparativamente a chance entre duas biotransformações diferentes acontecerem.

Posteriormente, foi desenvolvido um sistema de pontuação usando os *endpoints* fornecidos por cada aplicativo no *software*. O *software* Lhasa Nexus consiste em três ferramentas para prever a toxicidade de compostos atingidos e seus metabólitos (Derek v.6.1.0, Sarah v.3.1.0 e Meteor v.3.1.0), um banco de dados para pesquisar dados publicados sobre toxicidade (Vitic v.3.1.0) e uma ferramenta para auxiliar com propósitos regulatórios (ICH M7).

Para cada um, uma pontuação foi fornecida considerando a classificação de toxicidade, peso da evidência (*in vitro* ou *in vivo*) e gravidade do *endpoint*, bem como sistema fisiológico afetado e porcentagem de probabilidade prevista. Informações preditivas que não tinham evidências de suporte dentro do *software* foram pesquisadas no site PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) no tópico Toxicidade, como um meio de confirmar ou refutar o resultado da análise preditiva. Além disso, caso fossem encontrados novos dados de toxicidade no PubChem, estes eram adicionados ao algoritmo como uma Flag (verde, amarela ou vermelha), de acordo com sua gravidade. Também foi adicionado um Fator de Normalização para evidências apresentadas pelo aplicativo Vitic (v.3.1.0), que levou em consideração o ano em que o medicamento foi lançado, com o entendimento de que compostos mais antigos tinham maior probabilidade de ter um número maior de dados de toxicidade, quando comparados a medicamentos novos, o que não justifica o nível de toxicidade, mas sim a quantidade de dados acumulados ao longo dos anos. Após corridas as amostras nos sistemas, os arquivos em PDF foram baixados e analisados para a retirada dos dados. Os dados foram compilados em planilhas do Excel para categorizar as informações e organizar o sistema de pontuação. Todo o sistema de pontuação foi realizado de maneira manual através do Excel.

4.1.2 Validação do algoritmo

A título de verificar se o algoritmo desenvolvido possuía característica reprodutível, foi realizada validação. Primeiramente foi realizada uma busca na base de dados Clarivate (Integrity Analytics) com o objetivo de localizar todos os fármacos que já haviam sido registrados por agências regulatórias mundialmente. A ordem das etapas está descrita na Tabela 1, descritas em inglês como se encontram no site:

Tabela 1. Etapas de seleção e triagem no sistema Clarivate.

Ordem	Etapas
1	Drugs and Biologics
2	Year Launched/Registered
3	From 1700 to 2021
4	Development Status → Phase
5	Registered
6	2882 results (06/08/2021)
7	Product list
8	1321 results (06/08/2021)
9	Options → Export center
10	Seleção das informações a serem exportadas para Excel
11	Downloads → Exports

1. Drogas e Biológicos; 2. Ano de lançamento/Registro; 3. De 1700 até 2021; 4. Status de desenvolvimento → Fase; 5. Registro; 6. Resultados; 7. Lista de produtos; 8. Resultados; 9. Opções → Centro de Exportação; 11. Downloads → Exportar.

Ao fim desta etapa, foi gerada uma planilha no Excel as informações buscadas. Porém, posteriormente, foi visto que havia informações não apenas a respeito de fármacos, mas a respeito também de outros instrumentos de saúde. Portanto, foram realizadas exclusões adicionais seguindo os seguintes critérios descritos na Tabela 2:

Tabela 2. Critérios de exclusão para resultados obtidos pelo sistema Clarivate.

Ordem	Itens de exclusão
1	Vaccine
2	Fixed-dose combinations

3	Complexes
4	Radiolabeled
5	Contrast agents
6	Monoclonal antibodies
7	Immunoglobulins
8	Insulin
9	Interferon/IFN
10	Peptide/protein/enzyme
11	Polymers
12	Diagnosis

1. Vacina; 2. Combinações de dose fixa; 3. Complexos (com metal); 4. Radiofármacos; 5. Agentes de contraste; 6. Anticorpos monoclonais; 7. Imunoglobulinas; 8. Insulinas; 9. Interferon (alfa/gama); 10. Peptídeos/proteínas/enzimas; 11. Polímeros; 12. Itens para diagnóstico.

Após as exclusões destes elementos, restaram apenas fármacos de estruturas químicas simples. A exclusão de, por exemplo, radiofármacos, ou fármacos que possuem um isótopo radioativo, entre outros exemplos, se deu pela dificuldade que o software possuía em os identificar e gerar uma análise completa. A presença destes tipos de compostos gerava resultados como “fora do domínio de análise” ou então “contém caracter não classificado”. Para evitar esse tipo de viés durante a validação, e analisar de forma eficaz apenas estruturas químicas de fármacos, as exclusões foram realizadas.

Terminada a exclusão, restaram 605 fármacos, que foram particionados por ano de registro. Para refinar ainda mais os resultados obtidos, estes foram divididos em grupos com 20 anos de diferença. Em seguida, selecionamos aproximadamente 10% dos medicamentos de cada período (Tabela 3). Para aqueles períodos em que não haviam compostos suficientes para a seleção de 10% (por exemplo, de 1901 a 1920, que lançou apenas 2 compostos), foi selecionado 1 composto. A seleção dos 10% em períodos de 20 anos foi realizada através de site de randomização para evitar viés de escolha.

Tabela 3. Triagem de 10% de fármacos por faixa de 20 anos.

PERÍODO	Nº	≈10%
1901-1920	2	1

1921-1940	1	1
1941-1960	16	2
1961-1980	34	3
1981-2000	188	20
2001-2021	364	38

A validação foi realizada seguindo exatamente o mesmo método de análise dos fármacos já citados através das funcionalidades do *software* Nexus, resultando em um *score* X-Tox final. Estes resultados foram compilados em uma planilha no Excel e o resultado X-Tox foi comparado com resultados previamente descritos em literatura de DL₅₀/CL₅₀, preferencialmente retirados de *Safety Data Sheets* (SDS), de Índice Terapêutico/Margem Terapêutica, preferencialmente retirados do Micromedex, dados do IARC (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer) ou dados de NOAEL (Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis) ou LOAEL (Menor Nível de Efeito Adverso Observável). Os elementos selecionados como referência correspondem a informações previamente descritas na literatura com bom nível de evidência científica a respeito da toxicidade de compostos.

4.2 Avaliação *in vitro*

4.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

4.2.1.1 *Meio de cultura*

O ensaio de concentração inibitória mínima diz respeito à dose mínima necessária de um composto para que não haja mais crescimento microbiológico. Para a realização deste ensaio com *M. tuberculosis*, o meio selecionado foi o Middlebrook 7H9 suplementado. Para a preparação de 1 litro de meio Middlebrook 7H9 estéril,

adiciona-se 4,7g do meio em pó 7H9 a 890 mL de água deionizada. Em fluxo laminar o meio foi filtrado em membrana de 0,22 μm de poro para fins de esterilização. Após filtração, foi adicionado 10 mL de glicerol a 50% (autoclavado previamente), 2,5 mL de tiloxapol a 20% (homogeneizado overnight e filtrado em membrana de 0,22 μm) e 100 mL de meio Albumina-Dextrose-Sódio (ADS). Para a preparação de 500 mL de meio ADS, adiciona-se 4,25 g de NaCl, 10 g de glicose anidra e 25 g de Albumina de Soro Bovina (BSA) em água deionizada q.s.p. 500 mL. Em fluxo laminar o meio deve ser filtrado em membrana de 0,22 μm de poro para fins de esterilização. Ambos os meios, Middlebrook 7H9 e ADS devem ser conservados em geladeira e somente aberto dentro do fluxo laminar para manter a esterilidade.

4.2.1.2 *Inóculo bacteriano*

Para os experimentos *in vitro*, foram utilizadas as cepas H37Rv, Erdman, CDC1551 e mc²6230 de *Mycobacterium tuberculosis*. Os inóculos foram preparados a partir da adição de 100 μL da solução bacteriana de estoque (preservada em meio contendo glicerol a 50% e refrigerado a -80°C) a 10 mL do meio 7H9 suplementado em garrafas de plástico PET e formato quadrado, com capacidade entre 30 e 50 mL. Adicionalmente para a cepa mc²6230, o meio foi adicionado de ácido pantotênico a 100 mg/L. A cultura bacteriana foi incubada em “shaker” a 37°C até entrar em fase log de crescimento (densidade óptica, ou absorbância, a 600 nm [OD600] entre 0,5 e 1, sendo o valor 1 associado à concentração de 3×10^8 Unidades Formadoras de Colônia/mL (UFC/mL).

Para os testes, preparou-se uma diluição do inóculo inicial, para que se obtivesse a concentração de 1×10^6 UFC/mL, valor padronizado para os experimentos.

4.2.1.3 *Diluição dos compostos testados*

Todos os compostos selecionados para análise MIC (Carvedilol, Daclatasvir, Orlistate, Cetoconazol e Otilônio) e os fármacos de controle positivo (Isoniazida, Rifampicina, Etambutol, Delamanide e Bedaquilina) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). Os compostos testes foram diluídos para que as concentrações finais na placa de 96 poços estivessem na faixa de 100 a 0,78 μM (8 pontos em diluição seriada) e com concentração máxima de DMSO a 2%. Para cada um dos fármacos controle, foram utilizadas diluições diferentes de acordo com os valores aproximados dos MICs de cada um na literatura. A saber, Isoniazida e Etambutol entre 10 e 0,0045 μM (12 pontos em diluição seriada), Bedaquilina e Delamanide entre 2,5 e 0,019 μM (8 pontos em diluição seriada) e Rifampicina entre 0,3125 e 0,0024 μM (8 pontos em diluição seriada).

4.2.1.4 *Composição das placas de 96 poços*

O MIC foi determinado em placas de 96 poços com fundo em “u” e preparadas como descrito abaixo:

- I. No primeiro poço da primeira coluna foi adicionado 98 μL de meio Middlebrook 7H9. No restante da coluna, foi adicionado 50 μL do mesmo meio.
- II. No primeiro poço, foi adicionado 2 μL do composto teste (preparado na concentração de 10 mM) ou do controle (controle negativo de atividade, 100% de crescimento bacteriano: 2 μL de DMSO; controle positivo de atividade: 2 μL do padrão de Rifampicina ou Isoniazida preparado na concentração de 1 mM; controle de esterilidade: 2 μL de meio)
- III. Realizou-se a diluição seriada, passando 50 μL do primeiro para o segundo poço, homogeneizando e transferindo-se 50 μL do segundo para o terceiro, repetindo a operação até o último poço, onde se retirou 50 μL que foi descartado, para que todos os poços tivessem volume de 50 μL .
- IV. Aos 50 μL de meio, em cada poço foi adicionado 50 μL do inóculo bacteriano preparado para a concentração de 1×10^6 UFC/mL (exceto no

grupo de controle da esterilidade, que teve a adição de 50 µL de meio). Ao final, todos os poços devem possuir volume final de 100 µL. As concentrações dos compostos testes nos poços ficaram entre 100 µM e 0,78 µM. As concentrações dos controles positivos de atividade (Rifampicina e Isoniazida) ficaram entre 10 µM e 0,078 µM.

- V. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.
- VI. As placas foram incubadas por 5 dias em estufa a 37°C e 80% de umidade.
- VII. Após a incubação, adicionou-se 10 µL por poço de uma solução de resazurina preparada a 100 µg/mL.
- VIII. As placas foram protegidas da luz por cobertura com papel alumínio e reincubadas “overnight”, em temperatura ambiente.
- IX. No dia seguinte, adicionou-se 100 µL de uma solução de formalina a 10% para fixação do material biológico.
- X. As placas foram então analisadas em leitor de microplacas TECAN Infinite® 200 PRO, no modo de fluorescência, com excitação em 540nm e emissão em 590nm.
- XI. A avaliação da atividade antimicobacteriana foi realizada pela inserção dos resultados obtidos na fórmula contida na Equação 1 e plotagem dos cálculos em gráfico semilog utilizando-se o software GraphPad Prism v.9:

Equação 1. Crescimento bacteriano pelo método da resazurina e leitura da fluorescência.

$$\%Crescimento\ em\ relação\ ao\ controle = \left(\frac{Fl_{teste} - Fl_{estéril}}{Fl_{DMSO} - Fl_{estéril}} \right) \times 100$$

*FI = valor da Fluorescência.

4.2.2 Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI)

O experimento FICI, também denominado de “*checkerboard*” quantifica a interação entre dois compostos para verificação de sinergismo, sem-efeito ou antagonismo entre eles. O ensaio teve por objetivo identificar o possível sinergismo entre os fármacos teste e os fármacos de tratamento padrão para tuberculose, o que significaria a diminuição da concentração inibitória mínima para um ou ambos. Para a execução, a concentração da cultura bacteriana e as faixas de concentração dos fármacos foram os mesmos utilizados para o experimento do MIC. Também foi utilizada placa de 96 poços com fundo redondo, porém com o *layout* adaptado para o experimento (Figura 18).

- I. Na linha 1A-H (vertical), adicionou-se 100 μ L dos fármacos controle em uma concentração 4x maior do que a desejada no final (exemplo: caso a concentração final do poço desejada seja 100 μ M, adiciona-se a solução com a concentração inicial de 400 μ M).
- II. Adicionou-se 50 μ L de meio 7H9 em todas as outras linhas e colunas, até a coluna 8.
- III. Realizou-se a diluição seriada, passando 50 μ L do primeiro para o segundo poço, homogeneizando e transferindo-se 50 μ L do segundo para o terceiro, repetindo a operação até a coluna 8, descartando-se os últimos 50 μ L para que cada poço tenha apenas 50 μ L.
- IV. Após realizadas as etapas acima, adicionou-se 50 μ L da diluição dos compostos testes nas colunas A1-8 (horizontal) em uma concentração 2x da concentração final desejada.
- V. Realizar a diluição seriada na direção 1A-H (vertical) e descartar os últimos 50 μ L, para que cada poço tenha apenas 50 μ L.
- VI. Adicionar 50 μ L do inóculo de concentração 1×10^6 UFC/mL para que cada poço entre 1-8 e A-H tenha 100 μ L.
- VII. As colunas 9 e 10 foram utilizadas para fazer o controle do MIC do fármaco padrão para o tratamento da TB e as colunas 11 e 12 para o controle do MIC do fármaco teste. Ambas em duplicata.
- VIII. Os poços correspondentes à linha H 9 e 10 foram utilizadas para o controle negativo com DMSO e os poços H 11 e 12 foram utilizados para o controle estéril (apenas meio 7H9).

IX. As concentrações utilizadas para o ensaio *checkerboard* foram as mesmas utilizadas para a determinação do MIC. Porém foram selecionados apenas os fármacos mais promissores do MIC para o ensaio FICI. As combinações estão descritas abaixo:

- Carvedilol + Rifampicina
- Carvedilol + Bedaquilina
- Carvedilol + Delamanide
- Orlistate + Rifampicina
- Orlistate + Bedaquilina
- Orlistate + Delamanide
- Otilônio + Rifampicina
- Otilônio + Bedaquilina
- Otilônio + Delamanide

X. Todas as outras etapas a respeito de incubação, adição de resazurina e leitura das placas foram realizadas da mesma maneira do MIC (vide itens VI-X do tópico 4.2.1.4 *Composição das placas de 96 poços*).

XI. A análise da leitura, entretanto, é feita seguindo o seguinte cálculo:

Equação 2. Cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI)

$$FICI = \frac{MIC_{\text{combinado}}}{MIC_{\text{individual}}} + \frac{MIC_{\text{combinado}}}{MIC_{\text{individual}}}$$

XII. A interpretação dos resultados do cálculo se dá da seguinte forma:

- $FICI < 0,5$ indica sinergismo
- $0,5 < FICI < 1$ indica efeito aditivo
- $1 < FICI < 2$ indica efeito indiferente
- $FICI > 2$ indica antagonismo

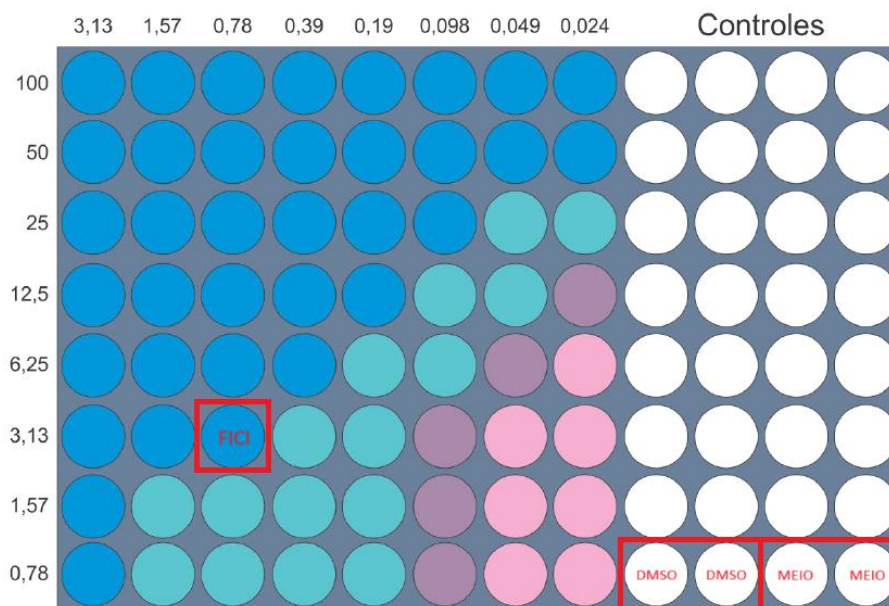


Figura 18. Exemplo de placa de 96 poços para experimento Checkerboard. Colunas coloridas (3,13-0,024 μM) representam concentrações de fármacos padrões. Linhas coloridas (100-0,78 μM) representam concentrações de fármacos teste. Colunas brancas representam os controles dos fármacos padrão e teste em duplicata. Quadrado vermelho FICI representa a menor concentração dos fármacos padrão e teste em conjunto onde observa-se inibição de crescimento bacteriano. Retângulo vermelho DMSO (2%) representa o controle negativo e retângulo vermelho MEIO representa o controle de esterilidade do meio.

4.2.3 Ensaio *Kill-kinetics*

O ensaio, também denominado cinética *time-kill*, possui como objetivo estudar a atividade de um agente antimicrobiano contra uma cepa bacteriana para determinar a atividade bactericida ou bacteriostática do agente ao longo do tempo. Para este ensaio, foram selecionados os fármacos individuais Carvedilol, Orlistate e Otilônio, assim como os fármacos padrão Isoniazida, Rifampicina e Bedaquilina. Também foi realizado o kill-kinetics para as associações que possuíram um resultado sinérgico no ensaio FICI (o que significa $\text{FICI} < 0,5$). Para realizar o experimento, adicionou-se 10mL de uma diluição do inóculo de *M. tuberculosis* H37Rv em meio Middlebrook 7H9 suplementado para que a concentração final seja de 2×10^6 UFC/mL em frascos PETG de fundo quadrado. Após, adicionou-se um volume dos compostos em uma concentração 5xMIC em cada um dos frascos. Estes foram incubados em “shaker” à 37°C durante 21 dias. Para o controle de crescimento foi utilizado DMSO (125 μL de

uma solução 100% DMSO em 10mL de meio) e o controle de esterilidade do meio (apenas 10mL do meio 7H9 suplementado). O experimento foi feito em duplicata.

No dia zero, assim que o inóculo foi preparado, foram passados 200 μ L em triplicata (de cada duplicata) para três poços de uma placa de 96 poços. Nas fileiras seguintes da placa foram adicionados 180 μ L de meio líquido 7H9. Na sequência, passou-se à diluição seriada a partir de 20 μ L do inóculo não diluído, obtendo-se, portanto, uma sequência de diluições decimais, com concentração decrescente, de 10^0 (sem diluição) até 10^7 (diluído 10.000.000 de vezes). 100 μ L de cada diluição foram então aplicados e espalhados em placa de Petri contendo o meio sólido 7H10 (mesmo meio Middlebrook 7H9 completo adicionado de ágar para solidificação). As placas foram então incubadas em estufa a 37°C e 80% de umidade, protegidas da luz, por 21 dias, quando foram então reabertas e as colônias crescidas foram contadas. A cada 3 dias o mesmo processo realizado no dia zero foi repetido, até o dia 30. Após a contagem, o número de UFC/mL foi calculado para o inóculo não diluído e plotado em gráfico no software GraphPad Prism 9.0.0.

- Carvedilol + Rifampicina
- Carvedilol + Bedaquilina
- Carvedilol + Isoniazida
- Orlistate + Rifampicina
- Orlistate + Bedaquilina
- Orlistate + Isoniazida
- Otilônio + Bedaquilina
- Otilônio + Isoniazida

Obs: a Isoniazida apresentou resultados instáveis e pouco replicáveis durante o ensaio com microplacas e resazurina, entretanto, devido ao seu amplo uso e escolha na terapia de primeira linha, o fármaco foi selecionado para os ensaios de *kill-kinetics*.

4.2.4 Extração de metil ésteres de ácido micólico (MAME) e análise por CCD

Para a avaliação do perfil de ácidos micólicos, foram preparados 15mL de inóculos de *Mtb* em meio líquido Middlebrook 7H9 suplementado, contendo 1×10^6 UFC/mL, em garrafas de poliestireno de fundo quadrado. A cada inóculo, em duplicata, foram adicionados os padrões dos fármacos teste (Otilônio, Orlistate e Carvedilol) em concentração final equivalente à metade do MIC₉₀ (concentração subletal). Como controle foi usado o fármaco Isoniazida, também em duplicata e na mesma concentração de metade do MIC₉₀. Como branco utilizou-se o DMSO, sendo adicionado no mesmo volume em que foi utilizado como solvente nos outros grupos a um inóculo. Os frascos foram mantidos sob agitação constante a 37°C, e foram analisados após 9 dias para confirmação que haviam ultrapassado 0,5 de absorbância em 600nm.

Os inóculos crescidos foram transferidos para tubos de vidro com tampa de rosca estéreis e foram centrifugados a 4000G. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi extraído por agitação constante “overnight” com 6mL de uma mistura 2:1 de clorofórmio e metanol. Após nova centrifugação a 4000G, o sobrenadante obtido foi separado para avaliação futura dos “lipídios livres” e o pellet foi seco sob fluxo de nitrogênio.

Ao pellet foram adicionados 2mL de hidróxido de tetrabutylamônio (TBAH) a 15% e após 30 segundos de vórtex foi aquecido a 100°C “overnight” em placa aquecedora. Foram adicionados então 2mL de água, 1mL de diclorometano e 250µL de iodeto de metila. Os tubos foram então agitados por 30 minutos e posteriormente centrifugados a 4000G por 1h. A fração aquosa foi desprezada e a fração orgânica foi transferida para vials de vidro, onde foi deixada em repouso, evaporando em capela química. O resíduo foi então ressuspendido em diclorometano (150µL) e 10µL foram aplicados em placa cromatográfica (CCD) de sílica pré-aquecida a 60°C. A eluição das amostras foi realizada em cuba de vidro, saturada com a fase móvel contendo éter de petróleo e éter etílico (95:5). Assim que a fase móvel alcançava o ponto de 10cm após o local da aplicação da amostra, a placa era retirada da cuba, seca e retornada para a cuba, para repetir a eluição, por 6 vezes. Ao final das seis eluições, as placas foram submersas em ácido fosfomolibdico por 15 segundos e levadas para estufa a 110°C por 15 minutos. O método descrito acima está compilado na Figura 19.

A análise dos resultados foi realizada por escaneamento de todas as placas eluidas. O arquivo foi convertido em escala de cinza utilizando-se o software Adobe

Photoshop. A função “inversão de cores” foi utilizada para deixar as manchas mais claras que o fundo da placa. O arquivo foi então salvo como .jpeg de alta resolução. Esse arquivo foi então importado para o software Fiji ImageJ, onde foram obtidos espectros de intensidade de pixels cinza, em três pontos de cada mancha. Cada espectro foi salvo como arquivo .csv e aberto no software Origin, onde cada espectro foi transformado em uma curva suavizada, obtendo-se “picos”, que foram então integrados para a obtenção da área sob a curva. Os valores obtidos de área foram então exportados para o software GraphPad Prism 9.0.0 e as médias dos grupos teste foram comparadas com o controle através do teste de Dunnett.

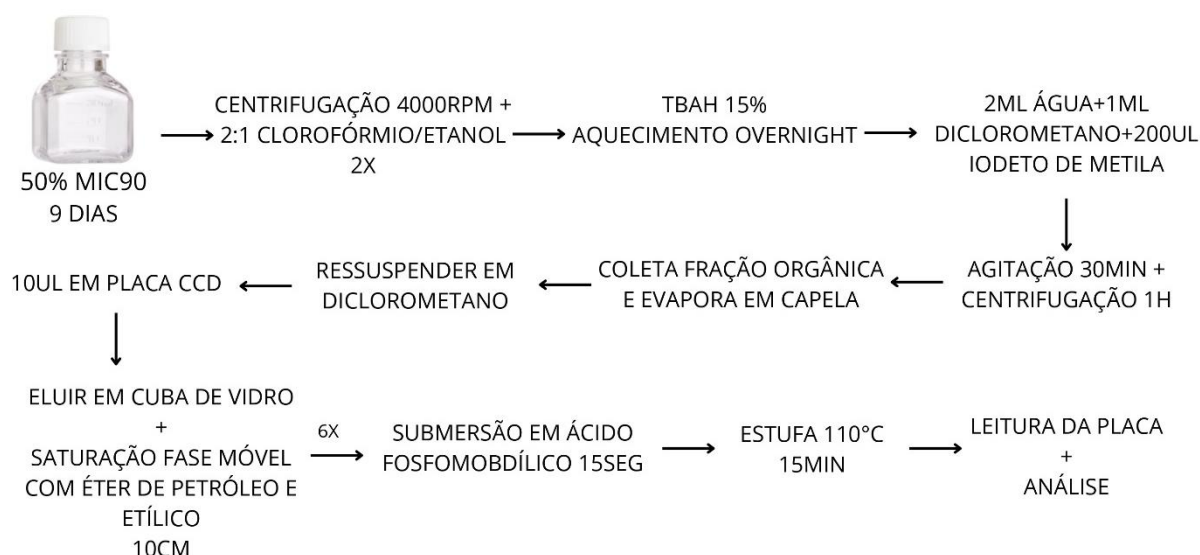


Figura 19. Fluxograma para extração de metil ésteres de ácido micólico (MAME) e análise por CCD.

4.2.5 Avaliação da expressão gênica de *InhA* e *iniB*

Como é sabido, expressão da enzima enoil-ACP-redutase (*InhA*) é aumentada quando a *Mtb* é exposta à INH. Da mesma forma, quando há bloqueio da *InhA* pela INH, um grupo de genes, chamados *iniABC* (*Isoniazid-Inducible genes A, B, and C*) também são induzidos. Para verificar se o ORL é capaz de realizar as mesmas induções, visto que nosso *screening* computacional identificou o fármaco como possível inibidor de *InhA*, inóculos submetidos a concentrações não letais (metade do

MIC₉₀) dos nossos compostos e à INH foram avaliados por qPCR para a quantificação de RNAm referente aos genes da *InhA* e do *iniB*.

O RNA foi quantificado utilizando o kit GoTaq[®] Probe 1-Step RT-qPCR. O RNA foi descongelado, e 100 ng foram transferidos para a placa de 96 poços do qPCR em triplicatas. A amplificação foi realizada utilizando os oligonucleotídeos e o GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix. Os seguintes passos do qPCR foram executados: para a transcrição reversa, 1 ciclo por 15 min a 37°C; para a inativação da transcriptase reversa e ativação da GoTag[®] DNA Polymerase, 1 ciclo por 5 min a 95°C; para a desnaturação, 40 ciclos por 10 s a 95°C; para o anelamento, 40 ciclos por 30 s a 60°C; para a elongação, 40 ciclos por 30 s a 72°C. O sistema de qPCR Mx3005P da Agilent Technologies, especificado pelo fabricante, foi utilizado para realizar o RT-qPCR. A quantificação do RT-qPCR foi realizada utilizando o método $\Delta\Delta Ct$. A expressão do mRNA foi calculada em relação à amplificação do gene de referência *16SrRNA*, resultando em valores de ΔCt . Os valores de $\Delta\Delta Ct$ foram calibrados para o controle de DMSO para calcular os valores de $\Delta\Delta Ct$. Os resultados foram inseridos no software GraphPad Prism 9.0.0 para análise estatística.

4.2.6 Inibição intracelular com macrófagos THP-1

Um dos grandes obstáculos encontrados durante o desenvolvimento de antimicobacterianos para o tratamento da TB se dá pelo fato da bactéria ser fagocitada por macrófagos alveolares no sistema respiratório, sobreviver no interior da célula e, assim, evadir tanto do sistema imune quanto da sua eliminação por antibióticos. Portanto, torna-se interessante encontrar fármacos que sejam capazes de adentrar macrófagos e eliminar a bactéria remanescente internamente. Portanto, foi realizado o ensaio de inibição intracelular com a linhagem de macrófagos THP-1, que é executado em duas etapas: a diferenciação celular, a infecção com *Mtb* e o tratamento com os fármacos. O método descrito abaixo está compilado na Figura 20.

- I. Para a diferenciação, foi preparada uma cultura de células THP-1 em meio RPMI + 10% SFB (soro fetal bovino).

- II. As células foram contadas e a densidade ajustada para 2×10^5 UFC/mL.
- III. Foi adicionado forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) na proporção 1:1000 a partir de uma solução estoque de $50 \mu\text{M}$.
- IV. As células foram semeadas em um volume apropriado nos poços (para uma placa de 96 poços, foi semeado $100 \mu\text{L}$ por poço).
- V. As células foram encubadas a 37°C e 5% de CO_2 durante a noite para diferenciação.
- VI. No dia seguinte, lavou-se as células duas vezes com PBS pré-aquecido e adicionado $100 \mu\text{L}$ RPMI fresco por poço.
- VII. Verificou-se a diferenciação ao microscópio. Obs: nem todas as células formarão ramificações, mas se ainda houver células anexadas, o experimento está correto.
- VIII. As células foram novamente encubadas a 37°C e 5% de CO_2 durante 3 horas.
- IX. Para o processo de infecção com *Mtb*, foi utilizada a cepa repórter pBEN::mCherry (Hsp60)/GFP com um promotor ATc induzível para expressão de proteína verde fluorescente (GFP). Para expressão adequada de GFP, adicionou-se 200 ng/mL de GFP à cultura de TB e a cultura foi então encubada por mais uma semana em 7H9 fresco + higromicina na concentração $150 \mu\text{g/mL}$.
- X. Após, preparou-se a cultura de bactérias para infectar as células THP-1 diferenciadas. A densidade celular das bactérias foi ajustada para infectar as células com uma multiplicidade de infecção (MOI) igual a 3, o que significa 3 partículas bacterianas para cada macrófago. Incubar de forma estática a 37°C durante três horas.
- XI. As células foram lavadas duas vezes com PBS pré-aquecido e adicionado RPMI fresco conforme descrito acima.
- XII. Como controles foram utilizados DMSO, Rifampicina ($3 \mu\text{M}$), Estreptomicina ($20 \mu\text{M}$) e controle estéril. As substâncias-teste (ORL e CAR) foram aplicadas em uma concentração $4 \times \text{MIC}$ ($100 \mu\text{M}$).
- XIII. As placas foram incubadas estaticamente durante cinco dias.
- XIV. Lavou-se então duas vezes com PBS pré-aquecido.

- XV. Para lisar os macrófagos foi utilizado ddH₂O (destilada e deionizada), pré-aquecida + 0,05% de Tyloxapol. Verificou-se a lise a cada cinco minutos e a solução resuspendida vigorosamente caso a lise não fosse satisfatória.
- XVI. Foram plaqueadas diferentes diluições em placas ágar Middlebrook 7H10 e incubadas durante duas a três semanas e para a contagem de colônias.
- XVII. Os resultados foram inseridos no software GraphPad Prism 9.0.0 para análise estatística.

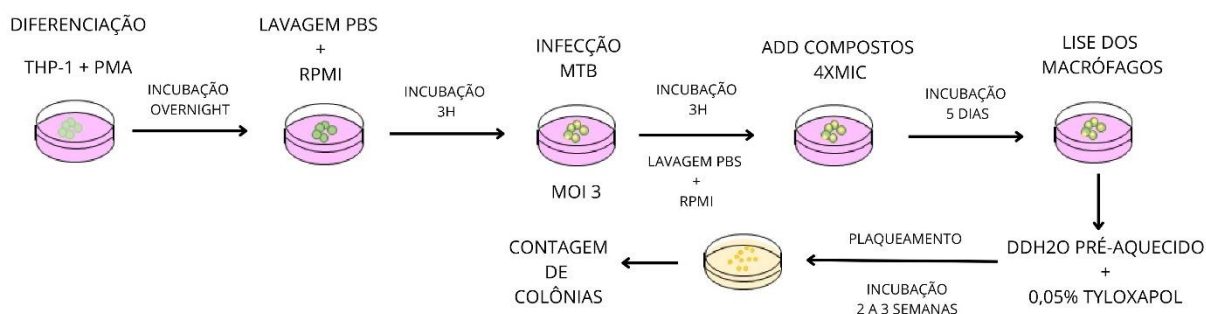


Figura 20. Fluxograma para análise de inibição intracelular com macrófagos THP-1.

4.2.7 Indução de mutação espontânea

Além disso, para investigar se os fármacos de interesse eram capazes de gerar resistência, a pesquisa realizou a indução de mutantes resistentes espontâneos usando 5xMIC₉₀ determinado previamente para a cepa *M. tuberculosis* mc²6230, plaqueando 1×10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ UFC em placas de ágar quadradas de 120 mm (meio sólido Middlebrook 7H10 adicionado de 100 mg/L de ácido pantotênico). Após 4 e 6 semanas de incubação a 37 °C, 10 colônias independentes foram selecionadas para uma nova análise de MIC a título de verificar mudança na concentração inibitória mínima (vide método 4.2.1. Concentração inibitória mínima (CIM)). A cepa mc²6230 é idêntica à cepa H37Rv, exceto pela deleção do gene que codifica a enzima pantotenato sintetase, o que diminui consideravelmente a virulência da bactéria e

possibilita que a mesma seja cultivada em laboratório com nível de biossegurança 2, e não 3 como requer a cepa H37Rv “selvagem”.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação *in silico*

Como citado previamente, o reposicionamento de fármacos tem se mostrado uma ferramenta útil na otimização e busca de novas terapias. Baseando-se nessa premissa, foi investigado em bases de dados fármacos previamente aprovados para uso em diversas enfermidades contra alvos de *M. tuberculosis* objetivando um possível reposicionamento. Na Tabela 4, estão descritos os fármacos com a maior probabilidade de se ligar contra os alvos designados.

Tabela 4. Classificação dos fármacos selecionados *in silico* com potencial atuação contra os alvos MmpL3, InhA e RNAPol baseado no score CHEMPLP do software GOLD.

Classificação	MmpL3 (6AJG)	RNAPol (6CCV)	InhA (4TRO)
1	Filoquinona	Coenzima Q10	Fenilbutirato de Glicerol
2	Benzetônio	Tocoretinato	Coenzima Q10
3	Nefazodona	Deferoxamina	Netarsudil
4	Salmeterol	Venetoclax	Cobicistat
5	Otilônio	Nalbufina	Visomitin
6	Carvedilol	Gadofosveset	Indinavir
7	Amtolmetina Guacila	Latanoprosteno	Orlistate
8	Silodosina	Daclatasvir	Carfilzomib
9	Saroglitazar	Lomitapida	
10	Cetoconazol		

Fonte: Reis (2020). Classificação de acordo com a pontuação CHEMPLP obtida pelo *software* GOLD.

Devido a grande quantidade de fármacos selecionados com possível interação com os alvos de *M. tuberculosis*, mostrou-se necessário determinar um método que

fosse capaz de reduzir a quantidade de fármacos testados durante a etapa *in vitro*. Sabendo disto, foi desenvolvido um algoritmo, denominado X-Tox, para determinar a toxicidade destes fármacos de forma quantitativa, objetivando a seleção dos menos tóxicos para o seguimento dos experimentos *in vitro*.

A análise toxicológica de fármacos de forma quantitativa, ou seja, a determinação um número de acordo com os eventos toxicológicos associados à sua exposição, é uma atividade complexa, pois pode-se entender que se trata de algo subjetivo. Entretanto, foram estabelecidos critérios para o desenvolvimento do X-Tox e suas determinadas pontuações, para diminuir o enviesamento neste tipo de tomada de decisão. Um dos pontos cruciais analisados foi a severidade do evento toxicológico, onde eventos considerados graves e/ou de difícil ou nenhuma resolução, como por exemplo carcinogenicidade ou teratogenicidade, receberam uma nota mais alta do que eventos de menor gravidade e/ou de fácil resolução, como sensibilização da pele. É importante frisar que outras considerações também foram feitas, como a capacidade de permanência da toxicidade mesmo após a cessação do uso, o sistema acometido, se o evento possui evidências *in vitro* ou *in vivo*, se a evidência é de predição ou já foi identificada *in vivo*, a probabilidade de ocorrência do evento e se existe tratamento e/ou terapia de suporte. Dito isso, existem diversos *softwares* capazes de obter dados de predição e literatura a respeito da toxicidade de compostos, como os citados anteriormente admetSAR ou TOPKAT Case Ultra. O programa Nexus, da corporação Lhasa®, foi selecionado devido ao fato de ser um dos mais compreensivos no sentido de quantidade de informação, visto que possui tanto informações de predição, quanto dados de literatura e de metabolismo de compostos, tendo a possibilidade também de analisar a toxicidade dos metabólitos. Apesar disto, é um software pago e o desenvolvimento do algoritmo só se deu desta forma pois o laboratório obtinha licença para utilizar. Entretanto, os *endpoints* abordados pelo *software* Nexus, por exemplo de mutagenicidade, estão presentes em diversos outros *softwares* de livre acesso. Portanto, o *score* X-Tox foi desenvolvido utilizando o sistema da Lhasa®, mas pode ser aplicado a qualquer outro *software* de análise e predição toxicológica que possua os mesmos *endpoints*.

5.1.1 Derek

Considerando o mecanismo de funcionamento do Derek elucidado na Introdução, as pontuações para o programa Derek foram criadas levando em consideração quatro itens:

- I. Se o *endpoint* é baseado em resultados *in vitro* ou *in vivo*:
 - a) Se *in vitro*, o *endpoint* recebe 1 ponto;
 - b) Se *in vivo*, o *endpoint* recebe 2 pontos caso seja GLOBAL;
 - c) Se *in vivo* for sistema-específico, recebe pontuação de acordo com sistema acometido.

- II. Divisão por sistema acometido:
 - a) Reprodutivo/Desenvolvimento: 5 pontos
 - b) Neurológico: 5 pontos
 - c) Cardiovascular: 4 pontos
 - d) Respiratório: 4 pontos
 - e) Imunológico: 4 pontos
 - f) Endócrino: 3 pontos
 - g) Urinário: 3 pontos
 - h) Gastrointestinal/Digestório: 2 pontos
 - i) Derme/Ocular: 1 ponto

- III. Probabilidade de ocorrência:
 - a) Se CERTO (CERTAIN): 5 pontos
 - b) Se PROVÁVEL (PROBABLE): 4 pontos
 - c) Se PLAUSÍVEL (PLAUSIBLE): 3 pontos
 - d) Se EQUÍVOCO (EQUIVOCAL): 2 pontos
 - e) Se DUVIDOSO (DOUBTED): 1 ponto
 - f) Outros abaixo: 0 pontos

- IV. Por fim, foi instaurado uma pontuação individual para cada *endpoint*:
 - a) Se *endpoint* é *in vivo* SISTEMA-ESPECÍFICO (Tabela 5):
 - o é capaz de gerar eventos extremamente tóxicos, permanentes e/ou morte: 1 ponto

- é capaz de gerar eventos tóxicos facilmente solucionáveis e/ou pouco severos: 0,5 ponto
- b) Se *endpoint* é *in vivo* GLOBAL (Tabela 6):
 - Pontuação varia de acordo com a severidade.
- c) Se *endpoint* é *IN VITRO* (Tabela 7):
 - Pontuação varia de acordo com a severidade.

Tabela 5. Pontuação dos *endpoints in vivo* sistema-específicos.

SISTEMAS	ENDPOINTS
Reprodutivo/ Desenvolvimento - 5	Teratogenicidade – 1 Toxicidade de desenvolvimento - 1 Toxicidade testicular – 0,5
Neurológico - 5	Edema cerebral - 1 Inibição de colinesterase – 0,5
Cardiovascular - 4	Cardiotoxicidade - 1 Bradicardia -0,5 Metahemoglobinemia - 0,5
Respiratório - 4	Toxicidade pulmonar - 1 Irritação de trato respiratório - 0,5 Asma ocupacional - 0,5 Sensitização de trato respiratório - 0,5
Imunológico - 4	Efeito em contagem de leucócitos e imunológicos - 0,5 Esplenotoxicidade – 0,5
Endócrino - 3	Toxicidade de glândula adrenal - 0,5 Toxicidade de tireoide - 0,5 Estrogenicidade - 0,5 Inibição de 5-alfa-redutase - 0,5 Agonista de receptor glicocorticoide - 0,5 Modulação de receptor androgênico - 0,5 Modulação de receptor estrogênico - 0,5
Urinário - 3	Nefrotoxicidade - 0,5 Toxicidade de função renal - 0,5 Distúrbios renais - 0,5 Urolitíase - 0,5 Hematúria - 0,5 Hiperplasia urotelial da bexiga - 0,5 Nefropatia por alfa-2-Globulina - 0,5 Distúrbios da bexiga - 0,5

Digestório/TGI - 2	Hepatotoxicidade - 0,5 Irritação do trato gastrointestinal - 0,5
Derme/Ocular - 1	Cloracne - 0,5 Toxicidade ocular - 0,5 Irritação ocular - 0,5 Fototoxicidade - 0,5 Irritação da pele - 0,5 Sensitização da pele - 0,5 Fotoalergenicidade - 0,5 Lacrimação - 0,5

Tabela 6. Pontuação dos *endpoints in vivo* globais.

ENDPOINTS IN VIVO GLOBAIS (2 pontos)	
Carcinogenicidade – 5	Fotocarcinogenicidade - 4
Anafilaxia – 5	Genotoxicidade não-específica <i>in vivo</i> - 4
Toxicidade de medula óssea – 5	Disfunção mitocondrial - 4
Toxicidade aguda alta – 5	Desacoplador de fosforilação oxidativa - 3
Mutagenicidade <i>in vivo</i> – 5	Proliferação de peroxissomo - 3
Dano cromossomal <i>in vivo</i> - 5	Genotoxicidade não específica fotoinduzida - 3
Efeitos tipo cianóticos - 5	Fosfolipidose - 2

Tabela 7. Pontuação dos *endpoints in vitro*.

ENDPOINTS IN VITRO (1 ponto)	
Dano cromossomal <i>in vitro</i> – 3	Dano cromossomal fotoinduzido <i>in vitro</i> - 2

Inibição de canal HERG <i>in vitro</i> – 3	Genotoxicidade não específica fotoinduzida <i>in vitro</i> - 2
Mutagenicidade <i>in vitro</i> – 3	Fotomutagenicidade <i>in vitro</i> - 2
Genotoxicidade não-específica <i>in vitro</i> - 2	

Considerando o sistema de pontuação descrito, a equação para o cálculo da pontuação Derek (DK) é:

Equação 3. Cálculo para obtenção da pontuação Derek.

$$\text{Probabilidade} * (\text{in vitro}; \text{in vivo GLOBAL}; \text{in vivo sist. específico}) * \text{nível de tox. do endpoint} = DK$$

Logo, moléculas muito tóxicas, apresentarão um score Derek alto e moléculas com baixa toxicidade terão scores mais baixos.

5.1.2 Sarah

Considerando o mecanismo de funcionamento do *software* Sarah elucidado na Introdução, e levando em conta que o resultado pode ser POSITIVO ou NEGATIVO e cada um varia de 0-100% de probabilidade, foi novamente estabelecido um sistema de pontuação para essa predição:

- I. Negativo 100% → 0 ponto
- II. Negativo <100%-50% → 1 ponto
- III. Negativo <50%-0% → 2 pontos
- IV. Positivo 0%->50% → 3 pontos
- V. Positivo 50%->100% → 4 pontos
- VI. Positivo 100% → 5 pontos

Portanto, scores Sarah (SRH) mais altos significam maior chance de causar mutagenicidade e scores mais baixos significam que a molécula possui menor potencial mutagênico.

5.1.3 ICH M7

Como explicado previamente, o programa ICH M7 utiliza dados resumidos a respeito de mutagenicidade das funcionalidades Sarah e Derek para auxiliar na tomada de decisões do ponto de vista regulatório. Levando em consideração que a predição do *software* Sarah dentro do ICH M7 é a mesma do Sarah completo, ela não foi contabilizada. Para o estudo em questão, como apenas o resultado do Derek trouxe nova análise sobre mutagenicidade no ICH M7, foi atribuída pontuação apenas a ele. As novas probabilidades encontradas no Derek (M7D) para essa funcionalidade são:

- I. Inativo:
 - a) (----): 0 ponto
 - b) (---): 1 ponto
 - c) (--): 2 pontos
 - d) (-): 3 pontos
- II. Plausível:
 - a) (+): 1 ponto
 - b) (++): 2 pontos
 - c) (+++): 3 pontos
 - d) (++++): 4 pontos

A predição do ICH M7 Derek é somada à pontuação final pois apresenta um novo dado de predição que deve ser considerado para a análise completa de mutagenicidade dos fármacos.

Observação: o esquema de pontuação para esse programa foi instaurado baseado apenas nos desfechos obtidos através dos fármacos teste e dos fármacos do processo de validação. É possível que outros fármacos acusam outros níveis de probabilidade, porém não foi possível ter acesso aos dados completos do programa.

5.1.4 Vitic

Considerando que os resultados do Vitic (VT) são retirados de documentos e não de predições, eles foram utilizados de forma a comprovar ou anular os resultados do Derek, já que todos os *endpoints* do Vitic estão dentro da lista de *endpoints* do Derek. Sabendo disto, o sistema de pontuação do programa Vitic (VT) se dão da seguinte forma:

- I. Se o resultado do Derek está presente no Vitic e confirma a predição do Derek → multiplica-se a pontuação do Derek por dois (2);
- II. Se o resultado do Derek está presente no Vitic, mas antagonizam-se entre si → multiplica-se a pontuação do Derek por zero (0);
- III. Ainda há o caso de o resultado estar presente no Derek, porém não no Vitic → checar literatura.

No caso da literatura, foi estabelecido que a pesquisa deve ser realizada no PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), no tópico “*Toxicity*”. A base de dados PubChem (PC) foi selecionada por ser a maior base de dados pública sobre informações a respeito de substâncias. Seu banco de dados é composto por mais de 116 milhões de substâncias fornecidas por centenas de organizações diferentes sendo constantemente atualizada. Para a busca na literatura a respeito da toxicidade de compostos não resgatadas pelo Vitic, porém que apresentaram alertas no Derek, foi determinado que:

- I. Se o PubChem confirma resultado do Derek → multiplica-se a pontuação do Derek por dois (2);
- II. Se antagoniza o resultado do Derek → multiplica-se a pontuação do Derek por zero (0);
- III. Se a predição do Derek não for encontrada nem pelo Vitic nem pelo PubChem → multiplica-se a pontuação do Derek por 1, para mantê-la como alerta.

Caso informações novas sobre toxicidade sejam identificadas no PubChem, porém não captadas pelo Vitic e não previstas pelo Derek (visto que o Vitic possui apenas 11 *endpoints* e que o Derek é apenas uma funcionalidade de predição toxicológica), elas foram consideradas como AVISOS (FLAGS) no momento da tomada de decisão, e inseridas na equação final, pois são dados importantes de

toxicidade. Entretanto, apenas serão consideradas FLAGS as denominadas “Toxicidades Evidentes Não Descritas Anteriormente”, ou TENDAs. Isso significa que são informações novas não identificadas pelo *software* Nexus, porém sendo estes eventos toxicológicos já muito bem estabelecidos na literatura por meio de ensaios *in vivo* com humanos e de vigilância epidemiológica. Desta forma, foi estabelecido o sistema de FLAGS:

- I. VERDES – eventos adversos leves e que não necessitam de acompanhamento (Ex: cefaleia, distúrbios do trato gastrointestinal etc.) → 20 pontos;
- II. AMARELAS – eventos de gravidade mediana e que requerem acompanhamento (Ex: alteração de exames como TGO, TGP, taxa de filtração glomerular etc.) → 50 pontos;
- III. VERMELHAS – eventos graves, potencialmente irreversíveis e/ou morte. Neste caso, podem ser eventos impedidores de uso, mesmo que sua pontuação de predição no *software* tenha sido baixa (Ex: teratogenicidade, carcinogenicidade etc.) → 100 pontos.

Ainda pode existir um outro caso, no qual o resultado esteja presente individualmente no Vitic (VTi – parâmetro diferente do VT que altera o Derek). Ou seja, que não tenha sido prevista pelo Derek e também não tenha sido encontrada pela busca no PubMed. Este tipo de ocasião ocorre devido ao fato de o *software* possuir uma base de dados “*in house*”, com informações fornecidas por indústrias parceiras. Neste caso, o único item modificado para a equação Derek diz respeito a um valor fixo para probabilidade. A probabilidade será CERTA (5 pontos), visto que as informações são retiradas de bases de dados (e não de predição) e o restante da equação segue igual à do Derek.

Mais além, é possível que para fármacos muito antigos, haja muitas informações a respeito de sua toxicidade e, portanto, aparentem ter um *score* toxicológico maior. O que não significa que eles necessariamente sejam mais tóxicos, apenas que há mais informações sobre ele. Isso ocorre principalmente quando fármacos antigos são comparados com novos, ou recém aprovados para uso, onde não há ainda uma gama de informações suficientes para tecer uma análise toxicológica aprofundada.

Por conta disso, foi criado um fator de normalização (F_n) para a antiguidade do fármaco. A equação se trata da divisão da pontuação individual do Vitic (V_{Ti}) por $1+(idade/100)$ sendo “idade” a quantidade de tempo no qual o fármaco foi aprovado para uso por qualquer agência regulatória. Para tal análise, apenas foram levadas em consideração as pontuações derivadas do Vitic individual (V_{Ti}), considerando que as outras análises são independentes da idade do fármaco, visto que são predições e não baseadas em literatura.

Exemplo. Considere que o score V_{Ti} é de 20 pontos e o fármaco foi aprovado há 30 anos, a equação para adequar o fator de normalização será:

Equação 4. Cálculo do Fator de normalização dos resultados Vitic.

$$F_n = \frac{V_{Ti}}{1+\left(\frac{idade\ do\ fármaco}{100}\right)} = \frac{20}{1+\left(\frac{30}{100}\right)} = \frac{20}{1,3} = \mathbf{15,38}$$

5.1.5 Meteor

Considerando o funcionamento do Meteor, mais um sistema de pontuação foi criado para racionalizar os resultados de metabólitos, em relação à probabilidade de formação dos metabólitos:

- I. Resultados PLAUSÍVEIS → 0,5 ponto
- II. Resultados PROVÁVEIS → 1 ponto
- III. Resultados CERTOS → 2 pontos

Apesar de terem a mesma nomenclatura, a probabilidade de formação de metabólitos é diferente da probabilidade de ocorrência dos *endpoints* Derek. Para realçar esta diferença, foram estabelecidas diferentes pontuações.

Adicionalmente, todos os metabólitos passaram pelo *screening* do Derek, para prever também a toxicidade dos metabólitos, que foram avaliados seguindo o mesmo sistema de pontuação utilizado para o Derek completo (Vide Equação 3. Cálculo para obtenção da pontuação Derek.)

Tendo em mente que o sistema não consegue prever outras características farmacocinéticas dos fármacos dentro dos organismos, foi realizada uma pesquisa em bases de dados para identificar as taxas de excreção inalterada dos fármacos selecionados, pois esse fator cinético altera a taxa de formação de metabólitos e, portanto, a importância do resultado do Meteor.

A primeira base de dados de escolha foi a do PubChem que, como citado anteriormente, é uma base confiável e constantemente atualizada. Caso não encontrada, uma segunda pesquisa foi realizada no PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) para encontrar dados de cinética dos fármacos. Logo, baseado nos percentuais de excreção inalterada do fármaco a pontuação estabelecida foi de:

- I. 0-10% - 1
- II. >10 e <30% - 0,8
- III. >30 e <50% - 0,6
- IV. >50 e <70% - 0,4
- V. >70 e <90% - 0,2
- VI. >90 e 100% - 0

Portanto, a equação para cálculo da pontuação dos metabólitos (MT) é:

Equação 5. Cálculo para obtenção da pontuação para metabólitos a partir do Meteor.

$$\frac{[(\sum \text{metabólitos} * \text{pontuação Derek}) * \text{probabilidade de ocorrência}]}{n^{\text{metabólitos}}} * \text{taxa de excreção inalterada} = MT$$

Dados completos extraídos do *software* para análise de metabólitos podem ser encontrados no APÊNDICE E.

5.1.6 X-Tox

Considerando toda a metodologia e resultados apresentados até o momento, abaixo se encontra o resultado final das análises de toxicidade, mutagenicidade e metabolismo. Se trata da soma de todos os fatores descritos, e foi denominada *Expert*

Toxicity Score (X-Tox). O algoritmo completo está disposto no Fluxograma 1 (APÊNDICE – A):

Equação 6. Algoritmo final X-Tox

$$DK * VT + DK * PC + SRH + M7D + VTixFn + MT + FLAG = X_Tox$$

*Legenda: DKxVT – Derek dependente do Vitic; DKxPC – Derek dependente do PubChem; SRH - Sarah; M7D: ICH M7 Derek; VTi - Vitic individual; Fn – Fator de normalização; MT – Meteor; FLAG – avisos vermelhos, amarelos ou verdes.

Após o desenvolvimento e aplicação do algoritmo X-Tox para todos os fármacos de potencial interação com alvos de *Mycobacterium tuberculosis*, foi determinada uma nova classificação dos fármacos previamente selecionados *in silico* baseando-se no score toxicológico (Tabelas 8-10). Análise destrinchada de cada fármaco pode ser encontrada nos APÊNDICES – B-D.

Tabela 8. Classificação dos fármacos por classe farmacológica, CHEMPLP e X-Tox para alvo Enoil-ACP-redutase (InhA).

Fármaco (Classe Farmacológica)	CHEMPLP.Fitness Score	X-Tox
Orlistate (Inibidor de lipase pancreática)	106.98	13.5
Cobicistate (Inibidor seletivo de CYP3A)	111.38	17
Fenilbutirato de Glicerol (Quelante de nitrogênio)	122.62	23.1
Netarsudil (Inibidor de Rho quinase)	111.79	33
Visomitin (Antioxidante)	111.13	41.3
Coenzima Q10 (Suplemento)	119.36	49.8
Indinavir (Inibidor de protease viral)	108.57	97.9

Carfilzomibe (Inibidor de proteassoma)	97,37	215,9
NAD-Isoniazida (ligante original)	105,42	-

Tabela 9. Classificação dos fármacos por classe farmacológica, CHEMPLP e X-Tox para alvo RNA-polimerase.

Fármaco (Classe Farmacológica)	CHEMPLP.Fitness Score	X-Tox
Gadofosveset (Agente de contraste)	77,65	6
Daclatasvir (Inibidor seletivo de NSSA de HCV)	74,65	9,3
Nalbufina (Agonista- antagonista opioide)	84,29	26,1
Coenzima Q10 (Suplemento)	104,52	49,8
Latanoprosteno (Análogo de prostaglandina F2 α)	75,68	53,7
Tocoretinato (Atividade de vit. E e A)	88,56	102,2
Deferoxamina (Quelante de ferro)	86,63	112,5
Lomitapida (Inibidor de MTP)	73,47	114,6
Venetoclax (Inibidor de linfoma de célula B)	86,22	196,1
Rifampicina (ligante original)	81,61	-

Tabela 10. Classificação dos fármacos por classe farmacológica, CHEMPLP e X-Tox para alvo MmpL3.

Fármaco (Classe Farmacológica)	CHEMPLP.Fitness Score	X-Tox
--------------------------------------	-----------------------	-------

Saroglitazar (Agonista dual PPAR α/γ)	111,72	3
Otilônio (Antiespasmódico; amônio quaternário)	116,09	21,4
Carvedilol (Antagonista adrenérgico α -1 e β -1)	114,76	40,7
Silodosina (Antagonista adrenérgico α -1)	112,11	44,7
Amtolmetina guacila (Anti-inflamatório não esteroidal)	113,28	56,5
Fitoquinona (Vitamina K)	132,15	67,6
Nefazodona (Inibidor seletivo de recaptação de dopamina e noradrenalina)	119,44	77,1
Cetoconazol (Antifúngico)	111,26	98,5
Benzetônio (Antisséptico)	119,61	122,5
Salmeterol (Agonista adrenérgico β -2)	117,4	123,7
SQ 109 (ligante original)	99,97	-

Utilizando dados de predição e de literatura, foi possível realizar um ranking de toxicidade para moléculas, com o objetivo de auxiliar na escolha de fármacos menos tóxicos para o seguimento de experimentos, um feito não verificado ainda pela literatura científica. A análise toxicológica costuma ser realizada de forma qualitativa, ao buscar se uma droga possui ou não determinados aspectos que podem gerar eventos tóxicos. Por exemplo, a presença de grupos toxicofóricos como epóxidos ou

azidas, que são muito reativas e podem causar dano celular. Ou mesmo quando a análise é a respeito de dados quantitativos, como por exemplo o NOAEL (Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis), este demonstra apenas uma dose máxima na qual não é possível observar eventos adversos. O racional desenvolvido, entretanto, busca associar dados de predição e de experimentos, e denotar, para cada um, um valor fixo considerando o nível de evidência científico e severidade, tipo de sistema acometido, dentre outros critérios já citados, para que se tenha uma análise mais completa do fármaco, observando quaisquer tipos de toxicidade que ele pode gerar, ao contrário de uma análise específica de grupo toxicofórico, por exemplo.

5.1.7 Seleção final de fármacos

Entretanto, mesmo após a classificação dos fármacos menos tóxicos a partir do resultado X-Tox, foi necessário fazer uma posterior seleção dos compostos a serem testados *in vitro*. Isso se deu por conta de limitações técnicas, como a falta da disposição de um laboratório de nível de biossegurança 3 (NB3), e limitações financeiras para aquisição de todos os compostos, materiais e equipamentos para a realização de um ensaio tão extensivo. Vários destes fármacos eram de obtenção limitada por conta do seu valor monetário alto, ou de difícil acesso por não serem aprovados pela Anvisa para uso especificamente no Brasil, ou então fármacos novos no mercado que ainda estavam sob patente exclusiva de determinada indústria. Portanto, após a classificação dos fármacos baseado no *score* X-Tox, foi realizada uma posterior seleção tendo essas limitações em consideração.

Como é sabido, a micobactéria que causa tuberculose é extremamente contagiosa e seu manejo em laboratórios NB3 é obrigatório, assim como outros entes exóticos que possam causar doenças sérias ou potencialmente fatais como resultado de exposição por inalação. O único laboratório NB3 em Brasília-DF está localizado no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN). Apesar disso, este é um laboratório majoritariamente para diagnóstico, e a única cepa não clínica disponível e permitida neste laboratório a título de pesquisa é a H37Ra, uma cepa avirulenta de *M. tuberculosis*. Apesar das similaridades entre a cepa avirulenta e sua forma virulenta

(H37Rv), a última é a preconizada para os experimentos *in vitro*. Com essa problemática, foi necessária uma busca por laboratórios em universidades que trabalhassem com pesquisa. Por estes motivos, a presente pesquisa fez uma parceria com o laboratório do Professor Doutor Rainer Kalscheuer, da Heinrich-Heine-Universität, na cidade de Düsseldorf, Alemanha. Os experimentos descritos na sessão “*in vitro*” foram realizados no laboratório gentilmente cedido pelo professor Kalscheuer.

Após todas as considerações e análise minuciosa, foram selecionados cinco fármacos finais para a realização dos ensaios *in vitro* (Tabela 11).

Tabela 11. Seleção final de fármacos selecionados por alvo.

	Alvos		
	MmpL3	InhA	RNA-pol
Fármacos	Otilônio	Orlistate	Daclatasvir
	Carvedilol		
	Cetoconazol		

Observação: o Cetoconazol apresentou um X-Tox elevado, estando classificado na posição 8 da lista de fármacos da MmpL3. Normalmente, o fármaco não seria considerado para análise por conta do alto X-Tox, entretanto, o composto foi doado para a nossa pesquisa pelo INCQS/Fiocruz, levando-o a ser incluído nos ensaios realizados. Além deste fator, derivados imidazólicos, como o próprio Cetoconazol já apresentaram resultados na literatura a respeito de atividades antituberculosa (Byrne; Denkin; Gu; Nuernberger *et al.*, 2007; Sun; Zhang, 1999).

5.2 Validação do algoritmo X-Tox

Após a triagem e processo de exclusão de 605 compostos, 65 fármacos foram selecionados para análise de validação do algoritmo desenvolvido (APÊNDICE E).

Com isso, esperava ser possível desenvolver uma análise que mostrasse a correlação dos valores X-Tox com os dados de toxicologia da literatura. Entretanto, a análise comparativa da toxicidade farmacológica se mostrou um processo complexo e desafiador por várias razões. Primeiramente, deve-se considerar que o algoritmo X-Tox leva em consideração dados de predição computacional, dados *in vitro* e dados *in vivo*, ou seja, visualiza os fármacos de uma perspectiva macroscópica, enquanto os dados retirados de cada material analisam compostos para um único desfecho. Ademais, os dados buscados para toxicidade de um fármaco podem variar significativamente dependendo de fatores como a dosagem, a via de administração, a duração e o tipo de animal utilizado para estudo (nos casos de DL₅₀ e NOAEL). Diferentes estudos usam modelos animais distintos, diferentes condições experimentais, ou até mesmo diferentes critérios para avaliar a toxicidade. Isso pode levar a resultados que não são diretamente comparáveis, dificultando a formação de conclusões gerais sobre a toxicidade relativa dos fármacos.

Outra dificuldade encontrada se deu pela falta de homogeneidade dos dados disponíveis em literatura. Dos 65 fármacos triados, dados para apenas 47 compostos (72,31%) dos compostos foram encontrados para DL₅₀/CL₅₀. Para NOAEL/LOAEL, dados para 56 compostos (86,15%) foram obtidos. No caso de Índice Terapêutico/Margem Terapêutica, dados para apenas 34 fármacos foram encontrados (52,31%). Para dados do IARC sobre carcinogenicidade, apenas os fármacos Progesterona e Dapsona apresentavam resultados (APÊNDICE E).

Além disso, a toxicidade farmacológica pode ser tanto aguda quanto crônica. A toxicidade aguda se refere a efeitos adversos que ocorrem logo após a administração do fármaco, enquanto a toxicidade crônica envolve efeitos que surgem após exposição prolongada. A comparação entre toxicidades que ocorrem em diferentes momentos e sob diferentes condições de exposição adicionou mais uma camada de complexidade.

Por fim, a interpretação dos dados de toxicidade pode ser influenciada por fatores como a sensibilidade dos métodos de detecção usados, a interpretação estatística dos resultados e a qualidade geral do estudo. Erros ou variações nesses aspectos podem levar a conclusões equivocadas ou a subestimação da toxicidade de um fármaco. Esses fatores tornaram difícil a comparação direta entre diferentes estudos e o algoritmo X-Tox. Nesse tópico, a tese ressalta que mais estudos são

necessários para determinar uma forma adequada de comparar o algoritmo desenvolvido a título de validação.

Para além da busca por alvos farmacológicos, os métodos computacionais podem e servem como auxílio também quando analisa-se outros pontos, como foi demonstrado pelo uso de *softwares* para análise de toxicidade. Apesar de existirem diversas ferramentas que podem ser utilizadas para este fim, elas variam em alguns aspectos, como objetivos e custos. Ao final, fica a critério do cientista ou instituição selecionar qual abordagem mais se adequa à pesquisa que está sendo realizada, seja esta mais orientada a regras e conhecimento científico acumulado ou mais tendente para modelos QSAR e métodos estatísticos. Apesar de já serem instrumentos utilizados na pesquisa e na indústria há anos, ainda há espaço para aperfeiçoamento e debate. Nesta questão, é importante frisar alguns pontos a respeito do uso de métodos computacionais.

Primeiramente que são métodos preditivos, ou seja, baseiam-se em análises que não necessariamente vão ser transpostos para efeitos *in vitro* ou *in vivo*. Neste caso, as ferramentas auxiliam em uma varredura inicial quando se tem milhares de compostos para triagem. Ainda nesse aspecto, é importante o entendimento também que, a interação *in silico* é essencialmente isso: interação. Não se pode inferir a existência de inibição e/ou superexpressão de um determinado alvo pelas técnicas que utilizamos.

5.3 Avaliação *in vitro*

5.3.1 Concentração Inibitória Mínima (MIC₉₀)

Posteriormente aos experimentos computacionais, foram realizados os ensaios *in vitro* para determinar o potencial de inibição dos fármacos selecionados. Portanto, para o primeiro experimento, o objetivo foi identificar qual a concentração inibitória mínima necessária para evitar ao menos 90% do crescimento bacteriano (MIC₉₀). Para todos os fármacos, Carvedilol (CAR) Cetoconazol (KET), Daclatasvir (DAC), Orlistate

(ORL) e Otilônio (OTI), a faixa de concentração foi de 100-0,78 μ M (8 pontos), diluídos em DMSO (2%). A busca do MIC foi executada utilizando primeiramente a cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, a cepa virulenta da micobactéria mais comumente utilizada e preconizada para este tipo de ensaio. Após o *screening* inicial, foram selecionadas mais duas cepas, a cepa CDC1551 e Erdman, a título de aprofundar o conhecimento da atividade dos melhores fármacos, ou seja, fármacos cujo MIC₉₀ tenha sido abaixo de 100 μ M. Isso significa que compostos onde não foi possível determinar o MIC₉₀ para a cepa H37Rv, não foram selecionados para os experimentos futuros. Para controle positivo, foram utilizados os fármacos de primeira linha Rifampicina (RIF), Isoniazida (INH) e Etambutol (EMB), e dois compostos mais recentes de segunda linha, Delamanide (DEL) e Bedaquilina (BED), todos na faixa de diluição entre 10 e 0,0048 μ M (12 pontos em diluição seriada). Como controle negativo, foi utilizado DMSO 2%, devido a esta ser a maior concentração final de DMSO (nos poços com a maior concentração dos fármacos, a 100 μ M).

Os valores de MIC obtidos para os fármacos padrão em relação a cepa *Mtb* H37Rv foram os seguintes: RIF 0,039 μ M, INH 0,078 μ M, EMB 5 μ M, DEL 0,0097 μ M (\approx 0,01 μ M) e BED 0,156 μ M (Figura 21). Considerando que é normal uma variação de duas a três vezes em comparação com valores obtidos pela literatura (Early; Alling, 2015), os resultados encontrados pelo experimento estão dentro das faixas determinadas pela literatura. Para a RIF, o valor esperado se encontra entre 0,07-0,3 μ M (Bemer-Melchior; Bryskier; Drugeon, 2000), já para INH foi determinado em 0,09 μ M (Knox; King; Woodroffe, 1952), para o EMB entre 3 e 12,2 μ M (Jadaun; Agarwal; Sharma; Ahmed *et al.*, 2007). Para os novos fármacos, BED entre 0,007 e 0,45 μ M (Lopez; Siqueira De Oliveira; Pinhata; Chimara *et al.*, 2019) e DEL entre 0,01 e 0,09 μ M (Szumowski; Lynch, 2015). Concentrações inibitórias mínimas representadas por outras unidades de medida nas referências, como mg/mL, mg/L ou μ g/mL e μ g/L foram devidamente convertidas para a unidade de medida μ M utilizada nesta tese.

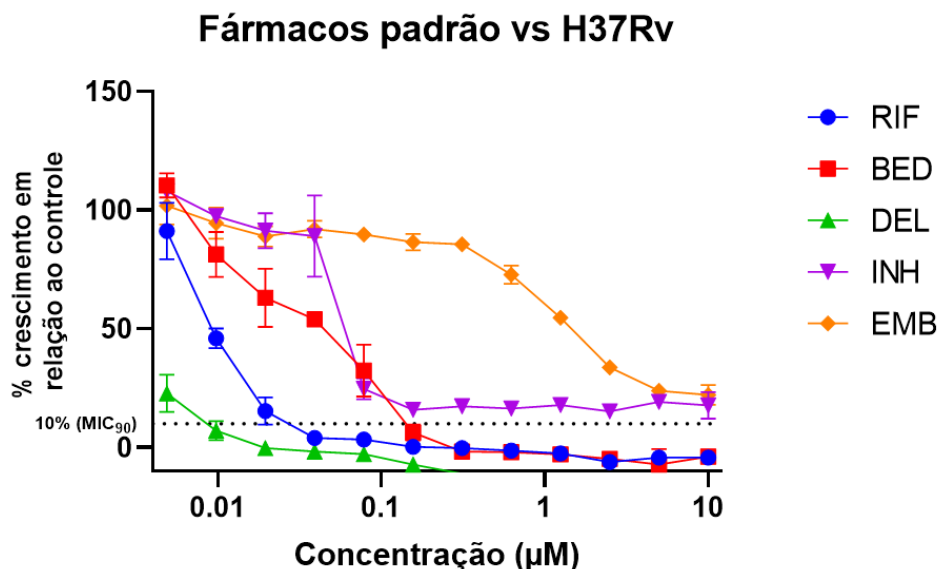


Figura 21. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC₉₀) dos fármacos padrão contra a cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*. Cepa H37Rv na concentração de 10⁶ UFC/mL. As concentrações dos fármacos Rifampicina (RIF), Isoniazida (INH), Etambutol (EMB), Delamanide (DEL) e Bedaquilina (BED) variam entre 10-0,0048µM. Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC₉₀. Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata.

Exceto para o Daclatasvir, foi possível identificar o MIC₉₀ para todos os fármacos testados contra a cepa H37Rv (Figura 22). Por conta disto, o Daclatasvir não foi selecionado para o restante dos ensaios. A varredura *in silico* detectou o fármaco Daclatasvir como possível inibidor de RNA-polimerase, entretanto, mesmo após repetidas tentativas, este não demonstrou atividade inibitória para a cepa de *Mtb* H37Rv, obtendo MIC₉₀ >100µM. A detecção pelo *software* pode ser explicada pelo grande tamanho da molécula (738.9 M), o que muito provavelmente adicionou pontos de interação com a enzima, aumentando o valor de CHEMPLP, fazendo com que este fármaco estivesse presente no *cut-off* de 20% para a seleção inicial.

Como demonstrado na figura abaixo, o Otilônio foi o fármaco com o menor MIC₉₀ para a cepa H37Rv, com valor de 6,25µM. Seguido pelo Orlistate e Carvedilol, ambos com MIC₉₀ de 25µM e, por fim, o Cetoconazol com MIC₉₀ de 50µM.

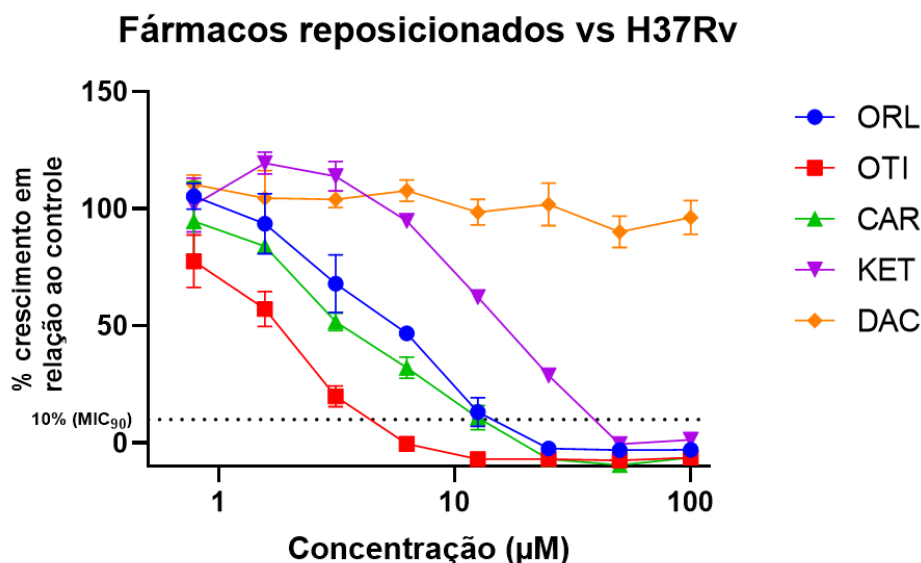


Figura 22. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC₉₀) dos fármacos reposicionados contra a cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*. Cepa H37Rv na concentração de 10⁶ UFC/mL. As concentrações dos fármacos Orlistate (ORL), Otilônio (OTI), Carvedilol (CAR), Cetoconazol (KET) e Daclatasvir (DAC) variam entre 100-0,78µM. Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC₉₀. Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata.

Ao analisar as cepas CDC1551 (Figura 23) e Erdman (Figura 24), viu-se um aumento de 2x para o MIC₉₀ do fármaco Otilônio (25µM). O Orlistate obteve um resultado levemente favorável para a cepa CDC1551 (12,5µM), porém manteve o mesmo resultado para a Erdman (25µM). Já o Carvedilol apresentou-se um pouco menos eficaz para ambas as cepas, com MIC₉₀ de 50µM para CDC1551 e Erdman. A cepa CDC1551 se apresentou moderadamente resistente ao cetoconazol, não sendo possível identificar seu MIC₉₀ mesmo na concentração mais alta usada (100µM). Entretanto, para a cepa Erdman, seu resultado foi semelhante à cepa H37Rv (50µM).

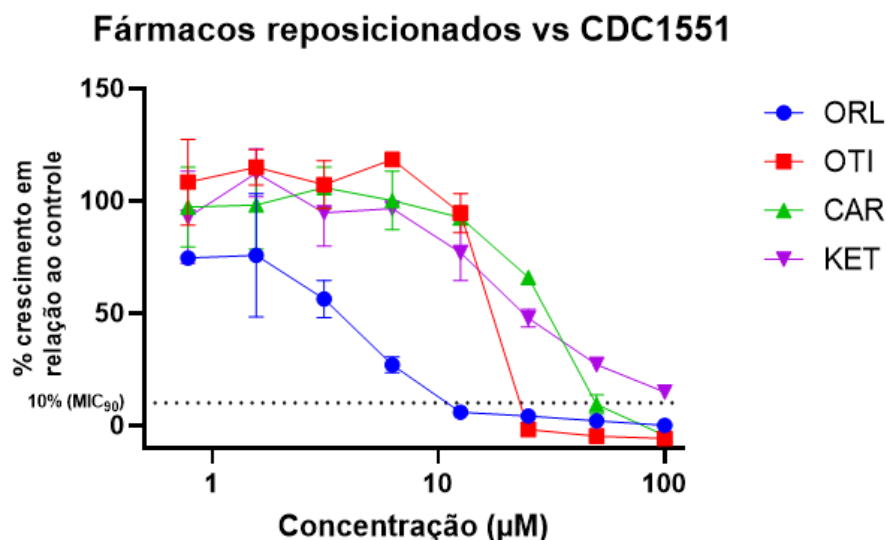


Figura 23. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC₉₀) dos fármacos reposicionado contra a cepa CDC1551 de *Mycobacterium tuberculosis*. Cepa CDC1551 na concentração de 10⁶ UFC/mL. As concentrações dos fármacos Orlistate (ORL), Otilônio (OTI), Carvedilol (CAR) e Cetoconazol (KET) variam entre 100-0,78µM. Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC₉₀. Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata.

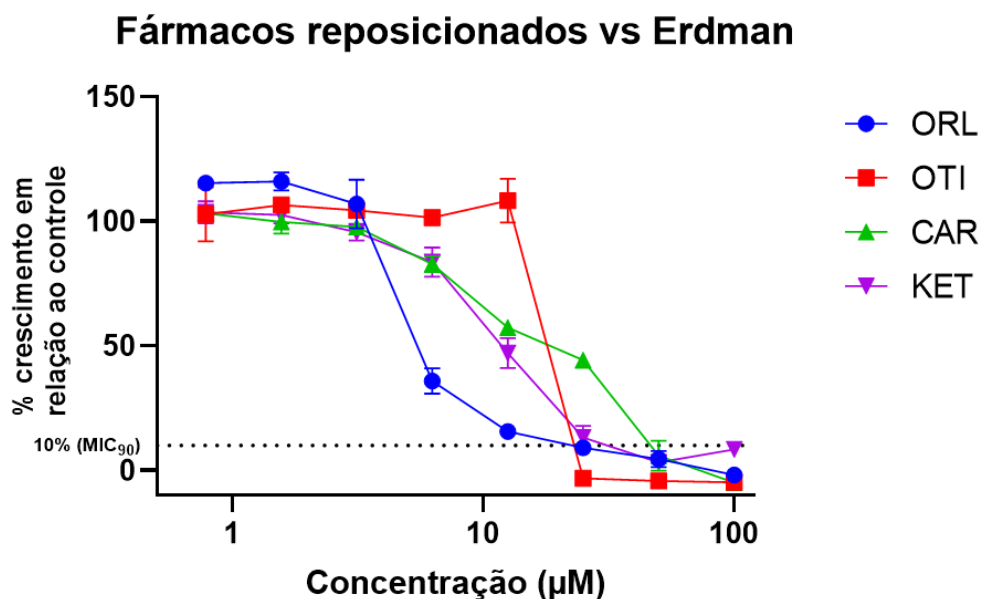


Figura 24. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC₉₀) dos fármacos reposicionados contra a cepa Erdman de *Mycobacterium tuberculosis*. Cepa Erdman na concentração de 10⁶ UFC/mL. As concentrações dos fármacos Orlistate (ORL), Otilônio (OTI), Carvedilol (CAR) e Cetoconazol (KET) variam entre 100-0,78µM. Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC₉₀. Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata.

As maiores diferenças entre a cepa H37Rv e as cepas CDC1551 e Erdman são a capacidade de tempo de duplicação (Dunn; North, 1995) e sequências polimórficas que codificam genes envolvidos em interações hospedeiro-patógeno. A CDC1551 superexpressa, por exemplo, a família de genes PE/PPE, que codifica proteínas ácidas, ricas em glicina, que são expressas na superfície extracelular, levando a uma resposta mais poderosa do hospedeiro (Fleischmann; Alland; Eisen; Carpenter *et al.*, 2002). A cepa Erdman possui nível de virulência semelhante a CDC1551 (Kelley; Collins, 1999), ambas maiores que a H37Rv. Apesar de estarem relacionados, o nível de virulência não significa necessariamente que a micobactéria é mais ou menos suscetível a antibióticos, apenas que ela tem maior potencial agressivo, o que pode causar mais dano no organismo (Beceiro; Tomás; Bou, 2013). Por conta disso, é digno de nota que os fármacos selecionados, especificamente OTI, ORL e CAR, demonstraram atividade inibitória e foi possível identificar seus MIC₉₀ em cepas especialmente virulentas e prejudiciais a saúde, tornando-os interessantes para experimentos futuros.

Buscando investigar os mecanismos de ação dos fármacos passíveis de reposicionamento (ORL, OTI e CAR), também foi selecionada a cepa de *Mtb* XDR (extensivamente resistente) para o ensaio de MIC. De acordo com o CDC (Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos), cepas de *Mtb* XDR são resistentes aos fármacos de primeira linha Isoniazida, Rifampicina, à uma das fluoroquinolonas (como moxifloxacino or ofloxacino), e a pelo menos um dos fármacos de segunda linha injetáveis como Amicacina, Capreomicina e Canamicina (Cdc, 2022). A cepa XDR selecionada possui perfil de resistência à Isoniazida, Rifampicina, Etambutol, Sulfametoxazol, Pirazinamida, Etionamida, Canamicina, Amicacina, Capreomicina e Ofloxacina. Considerando o dado apresentado, o objetivo desta busca foi verificar se o fármaco ORL obteria a mesma resposta de resistência da Isoniazida (INH), visto que a priori, pelas avaliações computacionais, o ORL seria capaz de inibir o mesmo alvo da INH (enoil-ACP-redutase). Assim como verificar o comportamento do OTI e CAR, que têm como mecanismo de ação proposto a inibição da proteína transmembrana MmpL3, alvo que não está previsto como mecanismo de resistência da cepa XDR (Figura 25). Como controle de resistência, o fármaco INH foi selecionado.

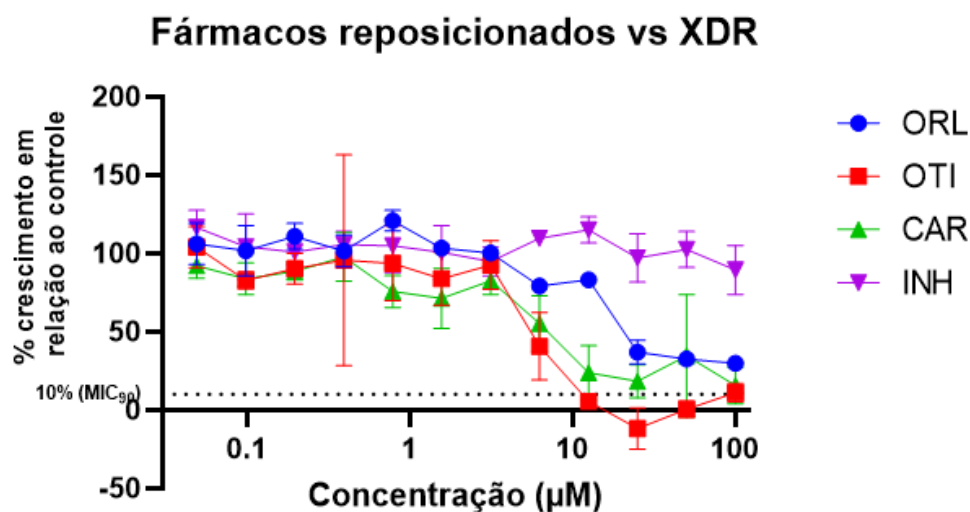


Figura 25. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC90) dos fármacos reposicionados e Isoniazida (INH) contra a cepa XDR de *Mycobacterium tuberculosis*. Cepa Mtb XDR na concentração de 10^6 UFC/mL. As concentrações dos fármacos Orlistate (ORL), Otilônio (OTI), Carvedilol (CAR) e Isoniazida (INH) variam entre 100-0,78µM. Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC₉₀. Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata.

Como esperado, a cepa XDR se mostrou altamente resistente ao fármaco INH, visto que nem mesmo na maior concentração utilizada (100µM) foi possível identificar queda do crescimento bacteriano. Em comparação com a cepa padrão H37Rv, cujo MIC para INH é de 0,078µM, houve um aumento >1000x na concentração do fármaco. O mecanismo de resistência mais prevalente para a INH já está bem descrito na literatura, no qual 94% das cepas resistentes à INH são derivados da mutação S315T no gene *katG*, que expressa a enzima catalase peroxidase KatG (troca de Serina para Treonina na posição 315 do códon) (Vilchèze; Jacobs, 2014). Como explicado anteriormente, essa mutação impede que a INH tenha afinidade e seja ativada pela enzima KatG e, portanto, perde sua atividade antimicrobiana. Apesar disso, o sequenciamento completo do genoma foi realizado previamente e detectado que existem ao menos 23 outras mutações no gene da *katG* que também estão relacionados com o processo de resistência (Torres; Paul; Rodwell; Victor *et al.*, 2015). Entretanto, a mutação S315T parece ser favorecida devido ao potencial de inibir a ativação da INH sem inibir completamente sua atividade de catalase-peroxidase (Hazbón; Brimacombe; Bobadilla Del Valle; Cavatore *et al.*, 2006). Ainda além, existem outros mecanismos conhecidos pelos quais a micobactéria pode desenvolver

resistência à INH, como mutações nos genes que codificam para as enzimas KasA e KasB, ambas presentes na rota de síntese do ácido micólico FASII (Slayden; Barry, 2002), no gene *inhA*, que codifica para a enzima enoil-ACP-redutase, alvo da INH (Huo; Lu; Zong; Jing *et al.*, 2019), no operon *iniBAC*, que é também super-expressado quando a bactéria está em contato com a INH e codifica proteínas necessárias na síntese da parede celular (Ramaswamy; Reich; Dou; Jasperse *et al.*, 2003), dentre outros exemplos (Nagel; Streicher; Klopfer; Warren *et al.*, 2017).

Utilizando esses argumentos, é possível observar que o ORL também demonstrou certo nível de resistência à cepa XDR quando comparado com a sua atividade contra a cepa H37Rv, visto que também não foi possível observar o MIC₉₀ mesmo na concentração mais alta, o que suporta a teoria de que o mecanismo de ação do ORL pode estar envolvido no processo de síntese do ácido micólico, assim como a INH. Entretanto, é notável a diferença de comportamento entre a INH e o ORL, uma vez que, com uso de ORL, houve uma queda considerável na porcentagem de crescimento bacteriano entre as concentrações de 12,5-25µM (de 83% para 36%), o que não ocorreu com a INH (sua porcentagem de inibição de crescimento não ultrapassou 89%). Esta evidência aponta para o fato de que possivelmente o mecanismo de ação do ORL pode estar envolvido no processo de síntese do ácido micólico, porém não pela mesma rota da INH, o que explica a cepa XDR ter um determinado nível de sensibilidade a atividade do ORL.

Observando-se o resultado do CAR, foi possível identificar que, apesar de não ter sido possível determinar seu MIC₉₀, o comportamento de inibição do fármaco em relação a cepa XDR foi semelhante a cepa H37Rv, tendo sido possível identificar o MIC₈₀ deste fármaco na concentração de 25µM (mesma concentração do MIC₉₀ para a cepa de referência), um resultado promissor, considerando que esta cepa é extensivamente resistente a fármacos de primeira e segunda linha. É mais surpreendente ainda o resultado apresentado pelo OTI, cujo MIC₉₀ demonstrado é de 12,5µM, uma mudança de apenas uma diluição quando comparado com o resultado da cepa H37Rv (6,25µM).

Ambos os resultados corroboram com a hipótese de que os mecanismos de ação do CAR e OTI são distintos do ORL e solidifica o potencial uso dos três para o tratamento não só da Tuberculose sensível, mas também de cepas resistentes.

Ademais, foi realizado outro experimento para a busca de MIC₉₀ com a cepa denominada mc²6230. Essa cepa é essencialmente igual a cepa H37Rv, e apenas possui uma deleção do gene que codifica a enzima pantotenato sintetase ($\Delta panCD$). A deleção pontual diminui consideravelmente a virulência da bactéria e possibilita que a mesma seja cultivada em laboratório com nível de biossegurança 2 (NB2), em contraponto com a de referência, que necessita ser trabalhada em laboratório NB3 (Jain; Hsu; Arai; Biermann *et al.*, 2014; Vilchèze; Copeland; Keiser; Weisbrod *et al.*, 2018). O manejo dos experimentos com a cepa mc²6230 seria, portanto, interessante do ponto de vista prático, no momento de indisponibilidade de um laboratório NB3 e houve interesse em verificar se o comportamento dos fármacos de teste seria mantido, caso os experimentos futuros precisassem ser realizados com essa cepa. O resultado apresentado na Figura 26 demonstra que o MIC₉₀ dos fármacos de interesse ORL, OTI e CAR se mantiveram iguais aos da cepa H37Rv (25; 6,25 e 25 μ M, respectivamente), confirmando que estes fármacos poderiam ser testados em eventuais experimentos no contexto de um laboratório NB2 para a cepa mc²6230.

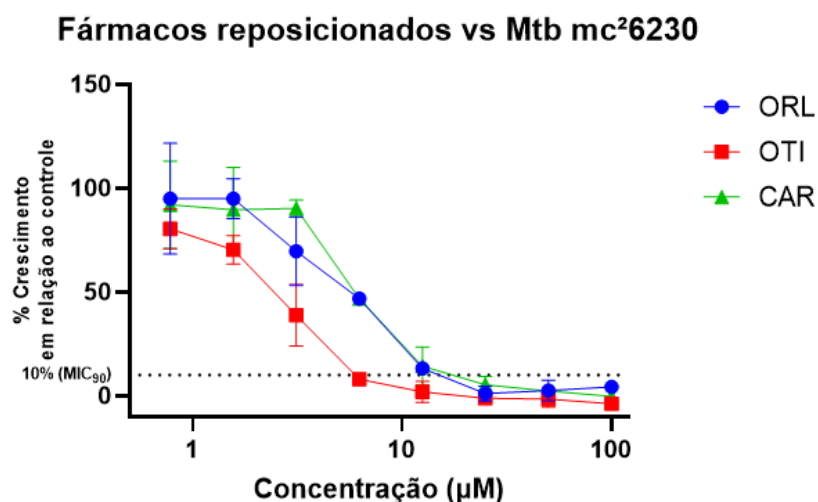


Figura 26. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC₉₀) dos fármacos teste contra a cepa mc²6230 de *Mycobacterium tuberculosis*. Cepa mc²6230 na concentração de 10⁶ UFC/mL. As concentrações dos fármacos Orlistate (ORL), Otilônio (OTI) e Carvedilol (CAR) variam entre 100-0,78 μ M. Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC₉₀. Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata.

Levando em consideração os resultados apresentados pelo experimento de MIC descritos na Tabela 12, foram selecionados os fármacos mais promissores dentre

todas as cinco cepas testadas (H37Rv, CDC1551, Erdman, mc²6230 e XDR), a saber, ORL, OTI e CAR para o experimento Índice da Concentração Inibitória Fracionada, do inglês *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI).

Tabela 12. Valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos fármacos para cada microrganismo.

Fármacos	Microrganismos - MIC (µM)				
	H37Rv	CDC1551	Erdman	mc26230	XDR
ORL	25	12,5	25	25	25 ¹
CAR	25	50	50	25	25 ²
OTI	6,25	25	25	6,25	12,5
KET	50	>100	50	-	-
DAC	>100	-	-	-	-
INH	0,078	-	-	-	>100
RIF	0,039	-	-	-	-
EMB	5	-	-	-	-
BED	0,156	-	-	-	-
DEL	0,001	-	-	-	-

*Legenda: Cepas de *Mtb* H37Rv, CDC1551, Erdman, mc²6230 e XDR na concentração de 10⁶ UFC/mL. Orlistate (ORL), Otilônio (OTI), Carvedilol (CAR), Rifampicina (RIF), Isoniazida (INH), Etambutol (EMB), Delamanide (DEL) e Bedaquilina (BED). Valores representados na tabela correspondem aos respectivos MICs em µM, obtidos através de microdiluição em placas de 96 poços, em meio Middlebrook 7H9 suplementado, reveladas por Resazurina e analisadas em leitor de microplacas TECAN Infinite® 200 PRO. Experimento realizado em triplicata. ¹ MIC₅₀; ² MIC₈₀.

5.3.2 Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI)

O experimento em questão, também chamado de *Checkerboard*, possui como objetivo analisar se dois fármacos possuem sinergismo entre si (Hall; Middleton; Westmacott, 1983). O sinergismo é uma análise importante quando se trata do estudo de fármacos pois pode significar a diminuição da dosagem de um ou de ambos, o que acarretaria a diminuição de seus eventos adversos. Ademais, a análise FICI também determina se os fármacos possuem ação aditiva (Suzuki; Ohashi, 2013), efeito

indiferente (Botelho, 2000), e até mesmo antagônico, o que pode ser utilizado como base para uma possível contraindicação de uso em conjunto.

Como explicado previamente na seção Material e Métodos, o resultado FICI é expresso por um valor numérico gerado por uma equação que analisa a interação entre os fármacos e verifica se houve diminuição ou aumento no MIC dos mesmos utilizados em conjunto quando comparados com seu uso individual. Este resultado pode ser interpretado como:

- $FICI < 0,5$ indica sinergismo
- $0,5 < FICI < 1$ indica efeito aditivo
- $1 < FICI < 2$ indica efeito indiferente
- $FICI > 2$ indica antagonismo

Cada um dos três fármacos testados (CAR, ORL e OTI) foram analisados em associação com o fármaco de primeira linha RIF e dois fármacos de segunda linha (BED e DEL). Os valores dos poços coloridos em azul, laranja e roxo representam as porcentagens de inibição de crescimento em relação ao controle (DMSO) e a delimitação de valor o MIC_{90} , ou seja, o ponto de análise (laranja) se dá no último poço onde a associação dos fármacos está com a porcentagem abaixo de 10% (o que significa que ao menos 90% do crescimento bacteriano foi inibido).

Para o Carvedilol (CAR), pode-se identificar sinergismo entre este e o fármaco de primeira linha RIF (Tabela 13) e de segunda linha BED (Tabela 14) (ambos com $FICI = 0,375$). Infelizmente, não foi possível identificar FICI para a placa CAR/DEL (Tabela 15). Isso se deu por conta da completa inibição de crescimento celular na placa, o que poderia indicar um sinergismo altíssimo desta associação, entretanto, também não foi possível identificar o MIC_{90} para o fármaco DEL individualmente, o que pode ser interpretado como imprecisão no momento da escolha da faixa de diluição do DEL, não abrangendo o seu MIC_{90} individual no momento de preparação da placa. De fato, neste estudo, o MIC_{90} do fármaco Delamanide foi detectado em $\approx 0,01\mu M$, e a faixa de diluição utilizada para o experimento está entre $2,5-0,02\mu M$. Para o experimento em questão, decidiu-se realizar esta faixa de diluição devido a uma padronização prévia do laboratório utilizado, cujo resultado FICI foi possível ser

observado entre as diluições 2,34-0,03 μ M para a associação DEL/3-O-Metil-butilgalato, composto sintetizado pelo laboratório (Rehberg; Omeje; Ebada; Van Geelen *et al.*, 2019). Na literatura, está descrito que o MIC₉₀ de DEL se encontra na faixa de 0,01-0,093 μ M (Szumowski; Lynch, 2015), o que se encontraria no limite inferior da faixa utilizada para o experimento. Posteriormente, para identificar-se atividade sinérgica com outros potenciais fármacos, deve-se utilizar o resultado de MIC₉₀ 0,01 μ M como base para o planejamento de experimentos, não apenas o descrito em literatura, pois existem diversos fatores que podem interferir nos resultados e gerar uma discrepância, incluindo estabilidade do fármaco. Para todos os experimentos, diluições recém preparadas eram utilizadas, portanto, pode-se supor que a atividade do fármaco se encontrava muito preservada, gerando um resultado de MIC₉₀ ainda mais potente do que o descrito pela literatura.

Tabela 13. *Mtb* H37Rv FICI para os fármacos Carvedilol (CAR) e Rifampicina (RIF).

CAR \ RIF	RIF								RIF		CAR	
	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005	0,003				
100	-39,1	-41,6	-43,0	-42,4	-42,3	-39,8	-41,2	-42,1	-34,0	-52,6	-41,0	-41,2
50	-41,8	-43,0	-40,1	-41,6	-40,0	-38,8	-46,5	-38,4	-35,4	-51,8	-42,6	-38,8
25	-36,5	-39,0	-36,5	-36,9	-38,4	-41,5	-38,8	-27,8	-30,9	-51,0	-31,1	-26,5
12,5	-36,6	-35,9	-34,8	-33,6	-33,7	-35,1	-21,7	-0,9	-21,3	-38,1	8,6	8,8
6,25	-36,3	-37,1	-35,3	-35,0	-25,7	-28,2	28,6	30,7	26,9	-14,0	29,5	54,2
3,125	-33,9	-33,8	-32,1	-33,1	-24,4	-6,8	48,4	66,6	102,6	10,9	100,1	97,8
1,5625	-31,2	-33,3	-26,8	-25,9	-22,7	-15,9	63,7	83,7	112,7	23,8	98,0	114,2
0,78125	-29,8	-28,4	-26,0	-27,3	-21,9	7,0	69,0	102,0	DMSO		ESTÉRIL	

*Carvedilol vs Rifampicina. Concentrações dos fármacos em μ M. *M. tuberculosis* H37Rv foi inoculada a 10⁶ UFC/mL. A tabela mostra o crescimento de bactérias como porcentagem dos controles. Crescimento abaixo de 10% em relação aos controles estão marcados em azul, o crescimento superior a 10% está marcado em rosa. Poço relevante para o cálculo do FICI está marcado em amarelo.

Tabela 14. *Mtb* H37Rv FICI para os fármacos Carvedilol (CAR) e Bedaquilina (BED).

CAR \ BED	BED								BED		CAR	
	2,50	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02				
100	-1,7	-5,6	-4,0	-3,7	-3,6	-4,6	-6,7	-5,9	-6,0	-5,6	-5,8	-4,4
50	-4,4	-7,2	-4,9	-5,4	-5,5	-5,5	-6,4	-6,8	-6,3	-5,6	-4,4	-2,6
25	-4,6	-4,8	-4,8	-4,7	-7,6	-5,5	-6,1	-6,0	-4,3	-0,4	5,8	5,5
12,5	-6,1	-7,2	-7,0	-4,7	-5,2	-9,1	-6,5	-1,6	-0,4	-1,7	20,5	43,0
6,25	-5,7	-7,2	-4,8	-6,8	-4,2	-4,8	4,6	16,9	33,4	29,9	61,6	60,9
3,125	-5,5	-7,7	-5,1	-5,1	-5,0	-0,6	34,5	46,4	82,1	67,9	76,8	110,5
1,5625	-4,1	-4,5	-4,7	-3,4	-2,2	7,4	61,9	73,3	102,6	87,1	113,3	97,6
0,78125	-6,6	-4,9	-3,0	-3,6	1,4	24,1	94,5	95,1	DMSO		ESTÉRIL	

*Carvedilol vs Bedaquilina. Concentrações dos fármacos em μM . *M. tuberculosis* H37Rv foi inoculada a 10^6 UFC/mL. A tabela mostra o crescimento de bactérias como porcentagem dos controles. Crescimento abaixo de 10% em relação aos controles estão marcados em azul, o crescimento superior a 10% está marcado em rosa. Poço relevante para o cálculo do FICI está marcado em amarelo.

Tabela 15. *Mtb* H37Rv FICI para os fármacos Carvedilol (CAR) e Delamanide (DEL).

CAR \ DEL	DEL								DEL		CAR	
	2,50	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02				
100	-7,1	-10,5	-8,9	-10,1	-9,6	-8,7	-11,3	-9,0	-11,2	-9,0	-8,7	-7,9
50	-7,6	-10,1	-10,8	-10,8	-11,7	-9,3	-8,7	-8,6	-10,4	-9,8	-7,5	-7,9
25	-7,0	-9,4	-8,9	-12,3	-9,1	-8,3	-6,7	-1,7	-7,1	-7,5	0,6	1,9
12,5	-9,2	-10,3	-11,3	-10,4	-7,1	-5,8	-3,5	1,7	-5,8	-5,3	42,6	2,8
6,25	-8,6	-9,4	-10,8	-8,0	-5,5	-1,8	-1,2	4,1	-0,8	-1,5	76,3	53,8
3,125	-9,4	-8,7	-9,7	-7,1	-4,8	-3,1	1,4	2,2	2,1	1,6	97,6	96,6
1,5625	-9,5	-8,5	-6,7	-5,4	-3,3	1,2	4,2	8,6	6,1	7,2	122,0	117,2
0,78125	-9,8	-10,3	-5,6	-4,7	-4,9	0,7	1,2	7,6	DMSO		ESTÉRIL	

*Carvedilol vs Delamanide. Concentrações dos fármacos em μM . *M. tuberculosis* H37Rv foi inoculada a 10^6 UFC/mL. A tabela mostra o crescimento de bactérias como porcentagem dos controles. Crescimento abaixo de 10% em relação aos controles estão marcados em azul, o crescimento superior a 10% está marcado em rosa.

O resultado do experimento FICI, associado com o MIC₉₀ para potencial reposicionamento do fármaco Carvedilol para o tratamento da Tuberculose é algo inédito na literatura e o fato de os resultados terem se demonstrado promissores é

algo notável. Um estudo recente testou o potencial deste fármaco para um possível reposicionamento para SARS-CoV-2 e, baseado em docagem e dinâmica molecular, identificou-se que o CAR se liga de forma relativamente estável com a RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp), apesar de também ter afinidade com outros alvos virais (Zhang; Liu; Sui; Liu *et al.*, 2023). Outro estudo utilizou métodos computacionais e *in vitro* para verificar e confirmar a interação do fármaco com a protease Mpro do vírus SARS-CoV-2 e seu potencial sinérgico com o antiviral favipiravir (Abdel-Halim; Hajar; Hasouneh; Abdelmalek, 2022). Ainda, Kaneko et al. identificou pela primeira vez que o CAR obteve efeito aditivo com fluconazol (FICI = 0,68) na inibição de cepas *Candida albicans* (Kaneko; Fukazawa; Ohno; Miyazaki, 2013) e outro estudo demonstrou efeito sinérgico com gentamicina (FICI = 0,2813) no combate a *Acinetobacter baumannii* um bacilo oportunista Gram negativo que, assim como a *Mtb*, também pode atacar o sistema respiratório (Ugurel; Turgut-Balik, 2023).

Para além de efeitos diretamente relacionados com microrganismos, devido às suas propriedades antioxidantes, o CAR já demonstrou efeito cardioprotetor para toxicidade causada por azitromicina (El-Shitany; El-Desoky, 2016) e atividade nefroprotetora em eventos tóxicos causados por gentamicina (Ali, 2003; Kumar; Shifow; Naidu; Ratnakar, 2000), apesar de este último argumento ainda ser contraditório na literatura (Félix; Oliveira; Videira; Maciel *et al.*, 2017). Também é sabido que o CAR possui potencial imunomodulatório (Mizuochi; Okajima; Harada; Molor-Erdene *et al.*, 2007; Nishio; Shioi; Sasayama; Matsumori, 2003; Yang; Ho; Cheng; Hsu *et al.*, 2004), estimulando a atividade de macrófagos, o que pode ser útil para aprimorar o combate da Tuberculose. Isto significa que, para além de ter atividade antimicobacteriana verificada pelos experimentos realizados e possuir sinergismo com RIF e BED, o CAR ainda pode estimular o próprio sistema imune a combater a micobactéria. Entretanto, é digno de nota que a RIF, um fármaco notoriamente indutor enzimático (Niemi; Backman; Fromm; Neuvonen *et al.*, 2003), já demonstrou atividade no aumento do *clearance* de CAR (Giessmann; Modess; Hecker; Zschiesche *et al.*, 2004). Esse dado pode auxiliar no momento de selecionar as determinadas dosagens para cada fármaco, porém apenas mais aprofundamento e estudos *in vivo* poderão informar de fato qual a relevância desta interação no que diz respeito ao tratamento da Tuberculose.

Em relação ao Orlistate (ORL), também foi possível observar sinergismo em conjunto com RIF e BED (ambos com FICI = 0,28125) (Tabela 16 e Tabela 17). Para a placa ORL/DEL houve o mesmo contratempo citado anteriormente relacionado à diluição utilizada (Tabela 18). Ainda assim, o resultado apresentado pela associação do ORL com o fármaco de primeira e segunda linha (RIF e BED, respectivamente) se mostraram muito promissores.

Tabela 16. Mtb H37Rv FICI para os fármacos Orlistate (ORL) e Rifampicina (RIF).

ORL \ RIF	RIF								RIF		ORL	
	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005	0,003				
100	-29,1	-28,8	-28,4	-24,8	-22,4	-18,4	-16,9	-18,4	-11,3	-12,4	-15,8	-16,9
50	-28,5	-24,5	-25,7	-25,1	-22,7	-13,1	-17,8	-9,4	-10,3	-20,9	-15,7	-14,9
25	-23,6	-28,6	-24,0	-20,6	-13,3	-17,2	-7,0	-7,6	-8,2	-5,1	-8,2	-21,3
12,5	-17,5	-17,7	-13,6	-10,5	-12,8	-14,0	-9,3	-3,4	-1,7	2,5	-6,8	11,3
6,25	-11,9	-9,0	-8,4	-3,1	-5,0	-5,8	-1,2	4,7	23,1	28,6	41,9	51,9
3,125	-13,0	-10,4	-8,4	-7,3	-5,4	-2,9	13,7	28,5	51,2	58,2	51,3	87,4
1,5625	-9,6	-8,0	-6,6	-6,2	-4,4	4,2	40,3	59,5	84,5	89,0	94,0	98,8
0,78125	-11,1	-13,7	-6,5	-0,4	4,8	37,0	54,0	60,7	DMSO		ESTÉRIL	

Orlistate vs Rifampicina. Concentrações dos fármacos em μM . *M. tuberculosis* H37Rv foi inoculada a 10^6 UFC/mL. A tabela mostra o crescimento de bactérias como porcentagem dos controles. Crescimento abaixo de 10% em relação aos controles estão marcados em azul, o crescimento superior a 10% está marcado em rosa. Poço relevante para o cálculo do FICI está marcado em amarelo.

Tabela 17. Mtb H37Rv FICI para os fármacos Orlistate (ORL) e Bedaquilina (BED).

ORL \ BED	BED								BED		ORL	
	2,50	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02				
100	-9,8	-11,3	-9,1	-12,1	-11,0	-10,7	-10,9	-12,0	-15,2	-15,7	-13,2	-13,1
50	-10,3	-14,6	-17,1	-13,6	-13,4	-12,9	-7,3	-12,7	-8,6	-20,3	-19,8	-11,0
25	-12,1	-5,3	-7,7	-6,9	-6,6	-9,2	-12,8	-18,3	-5,1	-6,7	-4,9	-5,7
12,5	-11,0	-7,5	-6,5	-6,8	-5,8	-5,4	-4,6	5,3	-2,5	0,2	6,3	15,8
6,25	-6,1	-5,9	-5,2	-7,2	-4,3	-3,3	6,5	24,8	25,7	21,8	26,4	52,0
3,125	-5,8	-6,3	-6,0	-4,8	-3,7	4,9	29,3	47,4	71,3	70,1	73,1	69,7
1,5625	-6,8	-4,2	-3,7	-2,1	-0,1	8,8	38,5	69,3	75,9	86,8	86,6	93,6
0,78125	-6,6	-3,8	-4,8	-3,1	-1,4	22,4	61,6	100,5	DMSO		ESTÉRIL	

Orlistate vs Bedaquilina. Concentrações dos fármacos em μM . *M. tuberculosis* H37Rv foi inoculada a 10^6 UFC/mL. A tabela mostra o crescimento de bactérias como porcentagem dos controles. Crescimento abaixo de 10% em relação aos controles estão marcados em azul, o crescimento superior a 10% está marcado em rosa. Poço relevante para o cálculo do FICI está marcado em amarelo.

Tabela 18. Mtb H37Rv FICI para os fármacos Orlistate (ORL) e Delamanide (DEL).

ORL \ DEL	DEL								DEL		ORL	
	2,50	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02				
100	-8,3	-7,8	-9,4	-7,3	-5,8	-5,2	-5,1	-3,0	-8,5	-9,1	-6,8	-3,4
50	-12,0	-14,9	-10,1	-9,2	-8,4	-9,9	-5,7	-8,2	-12,4	-10,6	-2,9	-2,4
25	-8,5	-9,3	-8,7	-7,9	-8,5	-7,6	-6,4	-3,4	-5,9	-6,1	-1,1	0,7
12,5	-8,9	-10,2	-7,9	-8,3	-8,3	-6,9	-4,4	-2,0	-7,6	-7,1	25,8	22,3
6,25	-8,9	-8,3	-8,0	-9,0	-6,7	-8,6	-1,7	0,1	-4,7	-1,6	50,0	52,2
3,125	-9,2	-8,8	-7,4	-8,6	-5,1	-3,7	-0,8	-0,8	-0,3	-0,1	76,2	78,9
1,5625	-5,3	-6,4	-5,8	-5,3	-3,7	-1,5	2,6	1,1	6,6	7,1	96,6	101,2
0,78125	-5,0	-6,5	-4,5	-3,9	-2,1	-2,7	5,0	4,0	DMSO		ESTÉRIL	

Orlistate vs Delamanide. Concentrações dos fármacos em μM . *M. tuberculosis* H37Rv foi inoculada a 10^6 UFC/mL. A tabela mostra o crescimento de bactérias como porcentagem dos controles. Crescimento abaixo de 10% em relação aos controles estão marcados em azul, o crescimento superior a 10% está marcado em rosa.

Orlistat (ORL), ou Tetraidrolipstatina (THL), foi desenvolvido como um inibidor de lipase que apresenta atividade antiobesidade e anti-hipercolesterolêmica em humanos (Hadváry; Sidler; Meister; Vetter *et al.*, 1991). Para além disto, também demonstrou atividade antibacteriana contra *Chromobacterium viscosum* e *Rhizopus oryzae* (Haalck; Spener, 1997), *S. aureus* (Kitadokoro; Tanaka; Hikima; Okuno *et al.*, 2020), e atividade antiprotozoária contra *Giardia duodenalis* (Hahn; Seeber; Kolodziej; Ignatius *et al.*, 2013) e *Naegleria gruberi* (Sarink; Tielens; Verbon; Sutak *et al.*, 2020). Os mecanismos de ação relatados do THL se dão por meio da inibição de uma série de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, provavelmente a partir da formação de um complexo acil-enzima reversível, mas estável, resultante de um ataque nucleofílico do resíduo Ser/Cys do anel β -propiolactona (Cavalier; Spilling; Durand; Camoin *et al.*, 2021).

Quanto à sua atividade reportada contra *Mycobacterium tuberculosis*, também não é diferente. Ao longo dos anos, demonstrou inibir múltiplas enzimas na via de síntese do ácido micólico, como fosfolipases/tioesterases (Parker; Barkley; Rino;

Vasil, 2009), proteínas “*cutinase-like*” (Schué; Maurin; Dhouib; Bakala N'goma *et al.*, 2010), serino-protease ES-31 (Majumdar; Wankhade; Kamble; Harinath, 2011; Wankhade; Hutke; Waghmare; Misra *et al.*, 2012), LipY (Point; Malla; Diomande; Martin *et al.*, 2012; Saxena; Roy; Singh; Vishnoi *et al.*, 2013), LipV (Singh; Arya; Narang; Jadeja *et al.*, 2014), LipN (Jadeja; Dogra; Arya; Singh *et al.*, 2016), Chp1 (Seeliger; Holsclaw; Schelle; Botyanszki *et al.*, 2012) e Chp2 (Touchette; Holsclaw; Previti; Solomon *et al.*, 2015). Ensaio proteômico e de *microarray* (Waddell; Stabler; Laing; Kremer *et al.*, 2004) encontraram múltiplas outras proteínas e genes regulados positivamente por ORL, não apenas em relação à biossíntese lipídica, mas também ao metabolismo celular, síntese e modificação de macromoléculas, dentre muitos outros, totalizando em 208 genes “*up-regulated*” (Waddell; Stabler; Laing; Kremer *et al.*, 2004), apesar de cerca de 37% terem função desconhecida. A partir da literatura, pôde-se verificar que a metodologia *in silico* aplicada por este estudo conseguiu de fato detectar um fármaco com afinidade por mais um possível alvo do ORL, a enzima enoil-ACP-redutase, até o momento não encontrado em literatura. Dessa forma, atingir InhA sem ter que passar pela mesma via que INH (o que poderia levar a um padrão de resistência semelhante) é uma abordagem interessante.

Em outro estudo, foi relatado que o ORL possui sinergismo com a INH, inibindo 73% do crescimento bacteriano em uma cultura axênica de *Mtb* H37Ra com uma concentração de 25 e 200 ng/mL, respectivamente (Wankhade; Hutke; Waghmare; Misra *et al.*, 2012). Além disso, derivados de ORL foram sintetizados e o composto mais potente (1e; R = Etilciclohexano) foi testado com uma variedade de antibacterianos e demonstrou sinergismo (FICI $\leq 0,5$) com claritromicina, ácido fusídico, imipenem, novobiocina, cefotaxima, vancomicina e isoniazida (Khan; Sudasinghe; Landgraf; Ronning *et al.*, 2021). Rens *et al.* testou o efeito de fármacos redutores de colesterolemia e seus efeitos associados a vancomicina, e diferente do resultado apresentado pelo presente estudo, detectou MIC mais alto para ORL, determinado em 100 μ M (Rens; Laval; Daffé; Denis *et al.*, 2016).

No presente estudo, não apenas foi comprovado mais uma vez que ORL possui sinergia com medicamentos da terapia tuberculosa, mas agora também mostrou sinergia com o mais novo tratamento de segunda linha Bedaquilina e, possivelmente, Delamanide. Os mecanismos por trás dessa sinergia podem ser postulados pelo mecanismo relatado anteriormente de ORL. O fármaco inibe mais de

200 esterases lipídicas micobacterianas (Goins; Sudasinghe; Liu; Wang *et al.*, 2018), que podem ser capazes de metabolizar e degradar antibióticos precocemente, agindo, portanto, como um composto protetor, assim como o ácido clavulânico. Além disso, o ORL pode desestabilizar a parede celular micobacteriana inibindo alvos como Chp1 e TesA, necessários para a manutenção do envelope celular (Rens; Laval; Daffé; Denis *et al.*, 2016), inibe síntese de ptiocerol dimicocerosatos (PDIM), um lipídio da membrana externa, dentre muitos outros alvos (Ravindran; Rao; Cheng; Shukla *et al.*, 2014), facilitando assim a difusão de antibióticos que seriam limitados pela camada externa hidrofóbica, como a Vancomicina (Gygli; Borrell; Trauner; Gagneux, 2017).

Há também diversos experimentos utilizando o ORL como passível de reposicionamento, principalmente para o tratamento de câncer. Em câncer do cólon, ORL promove inibição de fatores inflamatórios como NF- κ B e STAT3 (Jin; Kim; Sim; Lee *et al.*, 2021). Em câncer pancreático, o fármaco é capaz de inibir a crescimento e induzir apoptose da linhagem cancerígena PANC-1 através da inibição do gene FASN, responsável pela síntese de ácidos graxos aumentada de células altamente proliferativas (Sokolowska; Presler; Goyke; Milczarek *et al.*, 2017). ORL também promove apoptose em células cancerígenas ovarianas, provavelmente através da inibição da via de sinalização Akt/mTOR/p70S6K, responsável pelo ciclo celular (Peng; Wang; Qi; Wang *et al.*, 2018). Demonstrou atividade contra a linhagem HSC-3 (carcinoma escamoso oral humano) por meio de diminuição na expressão de ciclina E e D1 e aumento na fosforilação de CDK1 (Xiao; Liu; Li, 2017). Ainda além, foi demonstrado que a utilização do ORL nanoencapsulado aumenta sua biodisponibilidade individual e mostra sinergismo com Doxorubicina para tratamento de câncer de mama triplo negativo (TNBC) (Bhargava-Shah; Foygel; Devulapally; Paulmurugan, 2016) e sinergismo com Cabazitaxel para câncer de próstata (Qu; Ren; Shen; Wang *et al.*, 2021). No pulmão, ORL inibiu proliferação e viabilidade de células cancerígenas através da redução na expressão de GPX4, um regulador central de ferroptose (tipo de morte celular programada envolvendo íons de ferro), e induziu peroxidação lipídica (Zhou; Zhang; Yan; Wu *et al.*, 2021).

No que se refere ao fármaco OTI, identificou-se atividade aditiva com RIF (FICI = 0,5625) (Tabela 19) e sinergismo com BED (FICI = 0,3125) (Tabela 20), além do mesmo impedimento com o DEL (Tabela 21). O Brometo de Otilônio, fármaco utilizado para Síndrome do Intestino Irritável (SII) e outras condições associadas a espasmos

musculares do trato gastrointestinal, é uma amônia quaternária e possui atividade antimuscarínica e bloqueadora de canais de cálcio (Evangelista, 2004; Evangelista; Traini; Vannucchi, 2018).

Tabela 19. *Mtb* H37Rv FICI para os fármacos Otilônio (OTI) e Rifampicina (RIF).

OTI \ RIF	RIF								RIF		OTI	
	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005	0,003				
100	-14,9	-13,0	-16,7	-13,0	-13,2	-12,9	-13,0	-13,7	-6,1	-6,3	-14,0	-12,0
50	-16,3	-15,2	-15,4	-16,2	-16,4	-14,9	-15,4	-16,0	-6,1	-7,4	-19,3	-14,4
25	-15,3	-14,4	-15,6	-15,4	-16,0	-13,6	-14,5	-14,1	-4,2	-4,6	-15,3	-12,1
12,5	-13,5	-14,5	-19,0	-14,3	-14,3	-11,8	-14,0	-11,3	6,4	5,4	-14,4	-8,5
6,25	-13,4	-12,6	-13,8	-10,8	-11,4	-7,9	-9,5	-3,7	37,3	35,2	-0,6	-4,0
3,125	-10,4	-10,4	-9,2	-8,0	-7,2	-1,2	9,7	35,8	74,0	73,0	44,8	46,4
1,5625	-7,9	-6,3	-8,2	-6,4	-1,0	11,3	31,7	50,2	101,8	111,4	54,6	62,3
0,78125	-7,4	-3,7	-6,8	-0,6	5,9	32,6	38,5	85,6	DMSO		ESTÉRIL	

*Otilônio vs Rifampicina. Concentrações dos fármacos em mM. *M. tuberculosis* H37Rv foi inoculada a 10^6 UFC/mL. A tabela mostra o crescimento de bactérias como porcentagem dos controles. Crescimento abaixo de 10% em relação aos controles estão marcados em azul, o crescimento superior a 10% está marcado em rosa. Poço relevante para o cálculo do FICI está marcado em amarelo.

Tabela 20. *Mtb* H37Rv FICI para os fármacos Otilônio (OTI) e Bedaquilina (BED).

OTI \ BED	BED								BED		OTI	
	2,50	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02				
100	-7,7	-7,4	-8,6	-7,7	-9,8	-8,7	-8,0	-9,7	-8,5	-8,6	-8,6	-6,4
50	-9,4	-11,4	-9,0	-10,2	-10,5	-10,6	-9,8	-10,2	-8,9	-8,2	-10,1	-7,7
25	-8,5	-9,2	-10,8	-8,3	-9,9	-11,6	-10,4	-10,9	-7,4	-8,4	-10,1	-9,5
12,5	-10,0	-9,2	-9,0	-8,8	-10,3	-9,6	-9,3	-10,9	-9,3	-4,4	-6,5	-4,3
6,25	-10,6	-5,2	-9,6	-12,6	-8,2	-9,8	-8,3	-9,1	6,8	30,8	1,2	2,3
3,125	-9,8	-10,5	-9,4	-8,0	-8,4	-4,8	-0,9	5,5	54,3	79,3	40,5	38,2
1,5625	-8,9	-8,7	-9,8	-9,1	-5,1	3,0	16,0	38,7	81,9	96,0	66,2	77,7
0,78125	-7,6	-6,6	-5,4	-4,3	-2,8	10,7	42,1	42,9	DMSO		ESTÉRIL	

*Otilônio vs Bedaquilina. Concentrações dos fármacos em mM. *M. tuberculosis* H37Rv foi inoculada a 10^6 UFC/mL. A tabela mostra o crescimento de bactérias como porcentagem dos controles. Crescimento abaixo de 10% em relação aos controles estão marcados em azul, o crescimento superior a 10% está marcado em rosa. Poço relevante para o cálculo do FICI está marcado em amarelo.

Tabela 21. *Mtb* H37Rv FICI para os fármacos Otilônio (OTI) e Delamanide (DEL).

OTI \ DEL	DEL								DEL		OTI	
	2,50	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02				
100	-7,1	-10,5	-8,9	-10,1	-9,6	-8,7	-11,3	-9,0	-11,2	-9,0	-2,0	-3,2
50	-7,6	-10,1	-10,8	-10,8	-11,7	-9,3	-8,7	-8,6	-10,4	-9,8	-2,8	-3,0
25	-7,0	-9,4	-8,9	-12,3	-9,1	-8,3	-6,7	-1,7	-7,1	-7,5	1,0	2,6
12,5	-9,2	-10,3	-11,3	-10,4	-7,1	-5,8	-3,5	1,7	-5,8	-5,3	7,4	8,5
6,25	-8,6	-9,4	-10,8	-8,0	-5,5	-1,8	-1,2	4,1	-0,8	-1,5	20,2	27,1
3,125	-9,4	-8,7	-9,7	-7,1	-4,8	-3,1	1,4	2,2	2,1	1,6	83,0	85,1
1,5625	-9,5	-8,5	-6,7	-5,4	-3,3	1,2	4,2	8,6	6,1	7,2	119,3	106,2
0,78125	-9,8	-10,3	-5,6	-4,7	-4,9	0,7	1,2	7,6	DMSO		ESTÉRIL	

*Otilônio vs Delamanide. Concentrações dos fármacos em mM. *M. tuberculosis* H37Rv foi inoculada a 10^6 UFC/mL. A tabela mostra o crescimento de bactérias como porcentagem dos controles. Crescimento abaixo de 10% em relação aos controles estão marcados em azul, o crescimento superior a 10% está marcado em rosa. Poço relevante para o cálculo do FICI está marcado em amarelo.

Compostos com amônia quaternária são conhecidamente utilizados como desinfetantes de superfícies e tem ampla atividade contra bactérias Gram positivas, negativas e fungos. No que diz respeito a atividade farmacológica para humanos, entretanto, foram realizados alguns estudos na busca de um possível reposicionamento para o Otilônio. O fármaco demonstrou boa atividade contra a bactéria Gram negativa *Vibrio vulnificus*, com concentração bactericida mínima de 16 $\mu\text{g/mL}$ e sinergismo com Eritromicina (FICI = 0,1875) (Gong; Kim, 2023). Um estudo utilizou uma série de bactérias para determinar o perfil antimicrobiano do OTI e identificou MIC para as Gram negativas na faixa entre 1 e 64 $\mu\text{g/mL}$ e para Gram positivas entre 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$ (Zhou; She; Tan; Li *et al.*, 2020). O estudo ainda realizou o experimento de *kill-kinetics* contra *S. aureus* e *E. coli* e identificou que o potencial do fármaco de induzir resistência espontânea é baixo quando comparado com o fármaco Rifamixina. É sabido que fármacos que agem diretamente na parede celular possuem menor potencial de causar resistência e, de fato, este dado suporta o mecanismo de ação geral de amônias quaternárias, onde sua porção positivamente carregada interage com componentes da parede celular bacteriana, perturbando a estabilidade desta, causando morte celular (Gilbert; Moore, 2005). Entretanto, diversos estudos já sugerem que amônias quaternárias podem também possuir atividade intracelular (Bore; Hébraud; Chafsey; Chambon *et al.*, 2007; Caldwell; Cox; D'arcy; Rowe, 1961; Gilbert; Moore, 2005; Inácio Â; Domingues; Nunes; Martins *et al.*,

2016). A pesquisa de Zhou et al. foi além e determinou também a atividade do OTI *in vivo* em modelo induzido de peritonite em ratos infectados com MRSA. O estudo encontrou que, após administração intraperitoneal de 40 mg/kg, o fármaco aumentou a taxa de sobrevivência dos ratos em 80% e foi capaz de combater crescimento bacteriano no fígado de forma semelhante à vancomicina (50 mg/kg), sem gerar efeitos adversos observáveis e com baixa toxicidade (Zhou; She; Tan; Li *et al.*, 2020).

É importante citar que o fármaco OTI administrado por via oral possui um *clearance* relativamente rápido no organismo, visto que sua atividade no intestino deve ser local (Evangelista, 1999). No entanto, existem diversas formas de aprimorar seu perfil farmacocinético, dentre elas está a utilização de nanopartículas carreadoras e/ou modificações na sua estrutura química (Pham; Loupias; Dassonville-Klimpt; Sonnet, 2019), que podem melhorar sua biodisponibilidade e aumentar atividade, assim como foi visto para o ORL em relação aos cânceres de mama e próstata (Bhargava-Shah; Foygel; Devulapally; Paulmurugan, 2016; Qu; Ren; Shen; Wang *et al.*, 2021)

O Otilônio, portanto, mostra-se extremamente promissor, visto que possui atividade *in vitro* e *in vivo* contra diversas bactérias e agora, de forma inédita, não apenas demonstra atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*, mas também sinergismo com fármacos de tratamento de primeira e segunda linha.

Para sintetizar os resultados do experimento, considerando o cálculo para análise FICI:

$$FICI = \frac{MIC_{\text{combinado}}}{MIC_{\text{individual}}} + \frac{MIC_{\text{bcombinado}}}{MIC_{\text{bindividual}}}$$

E sua interpretação:

- FICI < 0,5 indica sinergismo
- 0,5 < FICI < 1 indica efeito aditivo
- 1 < FICI < 2 indica efeito indiferente
- FICI > 2 indica antagonismo

Na tabela abaixo (Tabela 22), estão compilados todos os resultados obtidos pelo experimento Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI).

Tabela 22. Resultados de Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI).

ÍNDICE DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA FRACIONADA (FICI)					
ASSOCIAÇÃO	MIC individual	MIC associação	Redução (-fold)	Valor FICI	Resultado
ORL/RIF	25/0,039	<0,78/0,0097	>5/2	0,281	Sinérgico
ORL/BED	25/0,3125	<0,78/0,078	>5/2	0,281	Sinérgico
CAR/RIF	12,5/0,039	1,56/0,0097	3/2	0,375	Sinérgico
CAR/BED	25/0,3125	3,125/0,078	3/2	0,375	Sinérgico
OTI/RIF	6,25/0,039	3,125/<0,0024	1/>4	0,565	Aditivo
OTI/BED	6,25/0,3125	1,56/<0,019	2/>4	0,312	Sinérgico

Cepas de *Mtb* H37Rv na concentração de 10^6 UFC/mL. Orlistate (ORL), Otilônio (OTI), Carvedilol (CAR), Rifampicina (RIF), e Bedaquilina (BED). Valores de MIC em μ M, obtidos através de microdiluição em placas de 96 poços utilizando o método “checkerboard”, em meio Middlebrook 7H9 suplementado, reveladas por Resazurina e analisadas em leitor de microplacas TECAN Infinite® 200 PRO. Experimento realizado em triplicata. Valores que possuem indicadores “<” (menor que) e “>” (maior que) correspondem a valores além do limite de concentração da placa. Nesse contexto, os valores empregados para o cálculo FICI são aqueles correspondentes aos limites detectados. Redução em “-fold” corresponde a quantidade de diluições reduzidas.

Considerando os valores obtidos pelo experimento de Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI), foram selecionadas as combinações que obtiveram resultado sinérgico para o ensaio de cinética Kill-kinetics.

5.3.3 Ensaio Kill-kinetics

Após a determinação das concentrações individuais e em sinergismo de ORL, CAR e OTI, foi realizado o experimento *kill-kinetics* com o objetivo de determinar o potencial bactericida ou bacteriostático dos fármacos, tal como o tempo no qual os fármacos testados são capazes de inibir crescimento bacteriano. O experimento,

como citado previamente, possui duração de trinta dias e, durante este período, também é possível verificar se os fármacos são capazes de gerar desenvolvimento de mutação espontânea, significando que, após um determinado tempo de tratamento, há novamente crescimento de cepas nas placas. Este crescimento pode estar relacionado com dois fatores principais, sendo estes o esgotamento do fármaco do meio ou então o desenvolvimento de mutações que podem gerar resistência ao fármaco. Para verificar estas hipóteses, colônias randômicas que cresceram após determinado tempo de tratamento foram coletadas e um novo experimento de MIC foi realizado. O objetivo do experimento é checar se houve um aumento ou não do MIC originalmente obtido e, no caso deste fato ter ocorrido, pode-se inferir que houve alguma mutação bacteriana que está gerando o aumento da concentração mínima utilizada para inibir o crescimento bacteriano.

Os três fármacos teste, ORL, CAR e OTI foram testados de forma individual, utilizando DMSO como controle de crescimento, assim como associações com os fármacos Isoniazida, Rifampicina e Bedaquilina. Como pôde ser observado na Figura 27, todos os fármacos testados apresentaram um comportamento relativamente bacteriostático até 16º dia de tratamento quando comparado com o controle de crescimento, momento no qual foi possível identificar o aumento no crescimento das colônias até o 30º dia. De fato, este é um dos motivos pelos quais a terapia da Tuberculose requer a utilização conjunta de ao menos 4 fármacos (INH, RIF, ETH e PIR) durante no mínimo 6 meses para controlar efetivamente a doença. Para burlar os vários mecanismos de resistência que a bactéria desenvolve, é necessário o uso de fármacos com mecanismos de ação diferentes, para que se obtenha resultado satisfatório no seu controle.

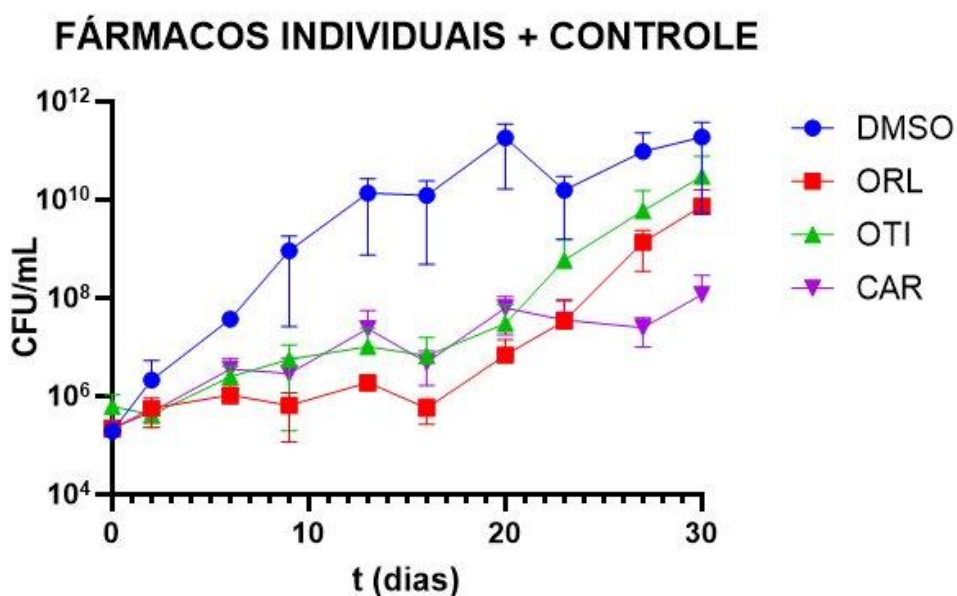


Figura 27. Avaliação de kill-kinetics para os fármacos teste. Orlistate 125 μ M (quadrado vermelho), Otilônio 31,25 μ M (triângulo verde), Carvedilol 125 μ M (triângulo roxo) e controle de crescimento DMSO 125 μ M (círculo azul).

Entretanto, o resultado quando na associação de alguns fármacos foi expressiva. Para a INH (Figura 28), a inibição de crescimento bacteriano se mostrou de forma bactericida e completamente esterilizou as placas em conjunto com ORL no 16^o dia, sem apresentar crescimento de cepas resistentes até o final do experimento. A associação com CAR eliminou crescimento a partir do 14^o dia, porém cepas novas foram identificadas partir do 23^o dia em diante. Já a associação com OTI mostrou-se bacteriostática, com comportamento estável até o 30^o dia.

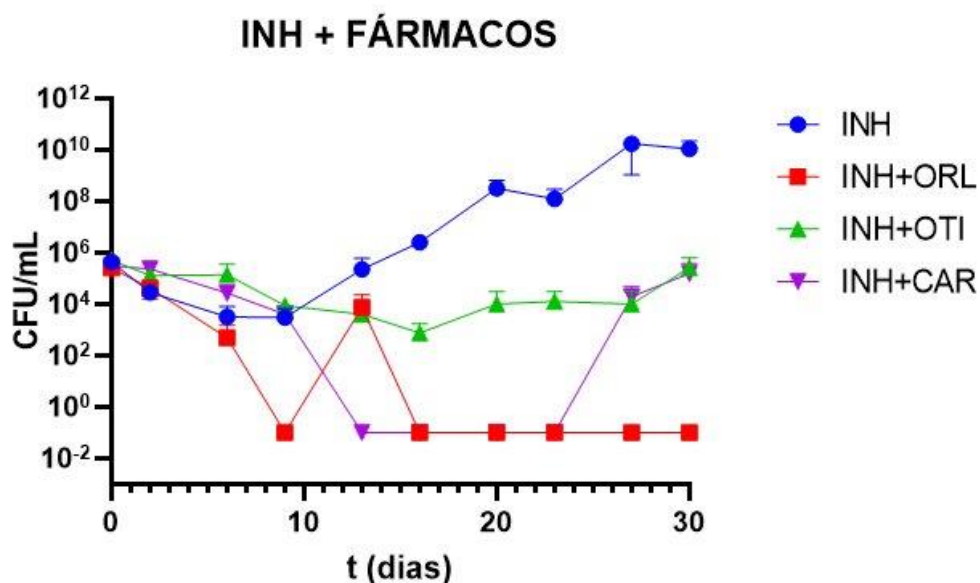


Figura 28. Avaliação de kill-kinetics para a associação dos fármacos teste com Isoniazida (INH). Associação de Isoniazida+Orlistate 10/125 μ M (quadrado vermelho), Isoniazida+Otilônio 10/31,25 μ M (triângulo verde), Isoniazida+Carvedilol 10/125 μ M (triângulo roxo) e Isoniazida individualmente 10 μ M (círculo azul).

A associação da RIF (Figura 29) com ORL demonstrou, assim como com INH, atividade bactericida no 14^o dia de tratamento, sem apresentar crescimento de cepas mutantes. Em contrapartida, o conjunto RIF+CAR não demonstrou atividade estatisticamente diferente do uso individual de RIF. Apesar disso, quando comparadas as concentrações bacterianas das placas no 30^o (último dia de experimento), o uso individual de CAR (10^{10} UFC/mL) e sua associação com RIF (10^6 UFC/mL), mostrou-se que uso conjunto de ambos os fármacos foi capaz de controlar o crescimento na ordem de 10^4 . Entretanto, essa atividade pode ser devido ao efeito individual de RIF, o que não desencoraja o uso do CAR, visto que ele demonstrou ação com os outros fármacos da terapia padrão.

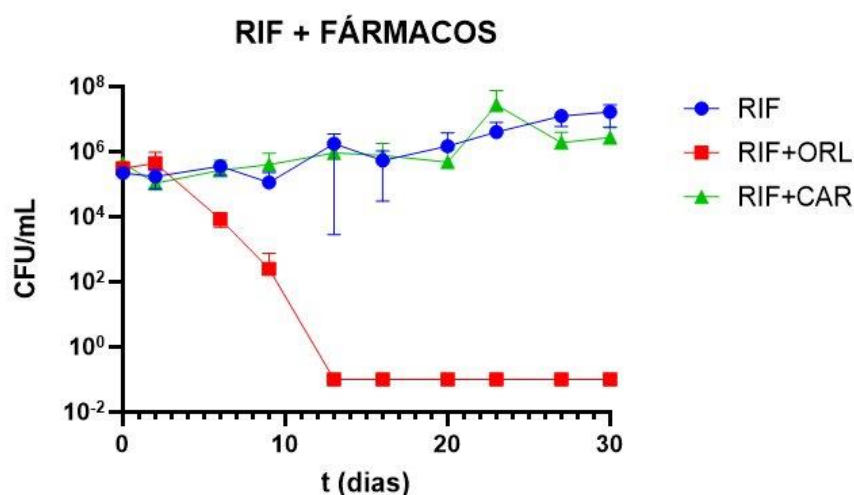


Figura 29. Avaliação de kill-kinetics para a associação dos fármacos teste com Rifampicina (RIF). Associação de Rifampicina+Orlistate 1/125 μ M (quadrado vermelho), Rifampicina+Carvedilol 1/125 μ M (triângulo verde) e Rifampicina individualmente 1 μ M (círculo azul).

No uso conjunto de BED (Figura 30), tanto com ORL quanto com CAR, constatou-se atividade bactericida, respectivamente nos dias 14 e 20, sem o desenvolvimento de cepas resistentes. Já na associação com OTI foi vista atividade bacteriostática, entretanto, diferente da associação RIF+CAR, o resultado para esta comprovou-se muito mais benéfica do que o uso de ambos os fármacos (BED e OTI) individualmente.

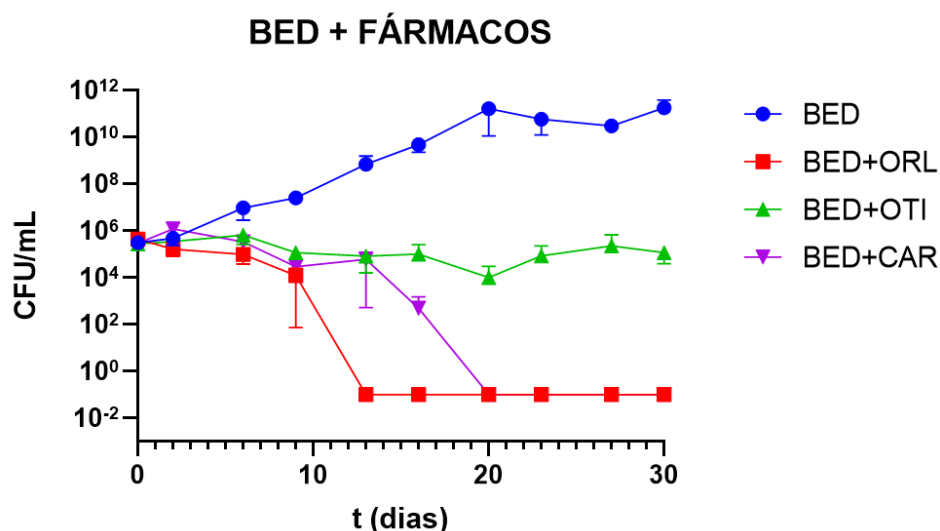


Figura 30. Avaliação de kill-kinetics para a associação dos fármacos teste com Bedaquilina (BED). Bedaquilina+Orlistate 0,5/125 μ M (quadrado vermelho), Bedaquilina+Otilônio 05/31,25 μ M (triângulo verde), Bedaquilina+Carvedilol 0,5/125 μ M (triângulo roxo) e Bedaquilina individualmente 0,5 μ M (círculo azul).

Estes resultados atestam para um potencial, até onde conseguimos buscar, nunca antes descritos na literatura científica de atividade sinérgica bacteriostática e bactericida no que diz respeito ao reposicionamento de Orlistate, Carvedilol e Otilônio para o tratamento da Tuberculose.

Para verificar se o crescimento de colônias durante o experimento *kill-kinetics* foi devido ao desenvolvimento de resistência ou apenas degradação/esgotamento de composto no meio, um novo experimento de MIC₉₀ foi realizado ao fim dos 30 dias. Foram selecionadas de forma randômica 3 colônias para cada um dos fármacos teste (CAR, ORL, OTI) e 3 colônias para cada um dos fármacos padronizados para uso (INH, RIF, BED). Essas colônias foram novamente crescidas em meio Middlebrook 7H9 suplementado e plaqueadas em placas de 96 poços, e incubadas da mesma maneira previamente descrita.

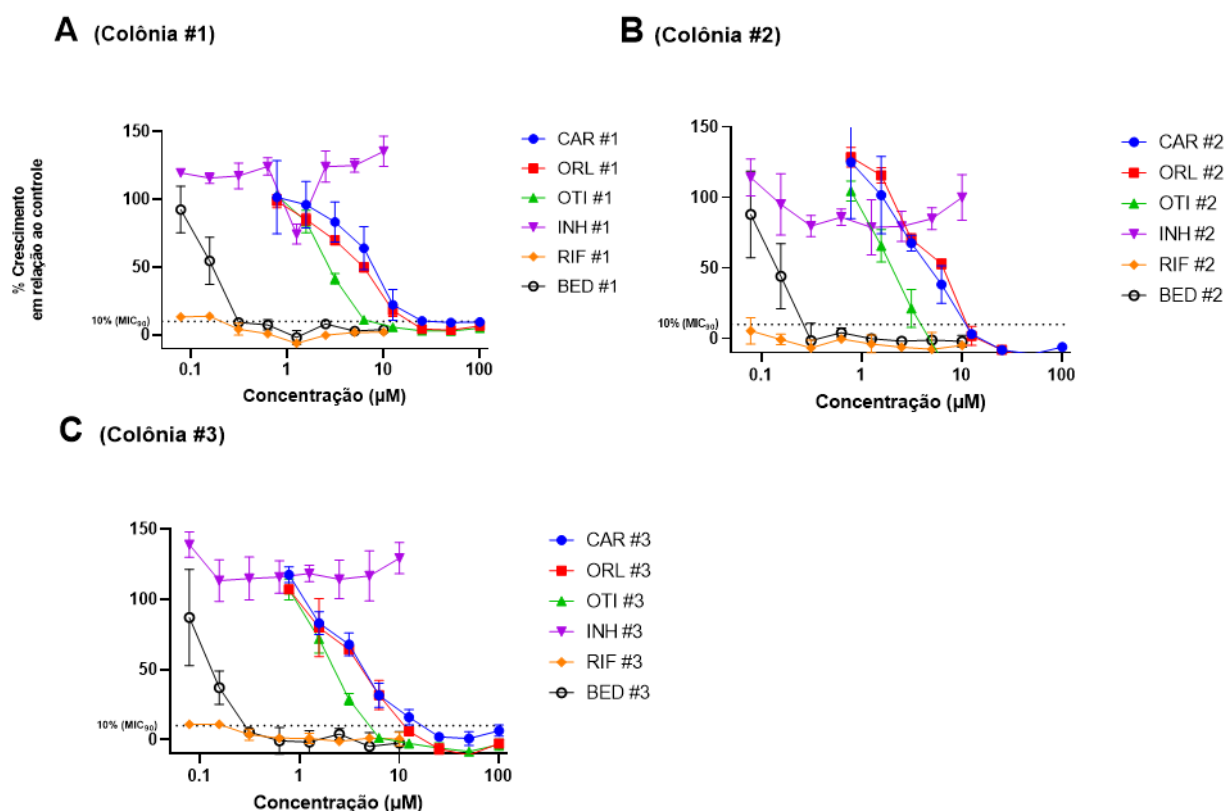


Figura 31. Avaliação de MIC₉₀ após finalização do ensaio kill-kinetics. Cepa H37Rv na concentração de 10⁵ UFC/mL. A concentração dos fármacos teste Carvedilol (CAR), Orlistate (ORL) e Otilônio (OTI) variam entre 100-0,78µM. Para os fármacos Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), e Bedaquilina (BED) variam entre 10-0,078µM. Medição foi realizada como porcentagem do controle de crescimento DMSO (2%). A linha pontilhada corresponde ao MIC₉₀. Todos os pontos correspondem a valores da média em triplicata.

A partir do resultado demonstrado na Figura 31 (A, B e C), pode-se verificar que não houve mudança no MIC₉₀ para nenhum dos fármacos além da INH, o que significa que as colônias que proliferaram ao final do experimento não cresceram devido ao desenvolvimento de resistência, mas muito provavelmente por conta de esgotamento do fármaco. Para INH, não foi possível observar nenhuma inibição, mesmo na concentração mais alta de 10µM. Este é um comportamento esperado para o fármaco, no qual há uma atividade bactericida rápida e inicial, entretanto a micobactéria logo desenvolve resistência e volta a crescer com colônias resistentes (De Steenwinkel; De Knecht; Ten Kate; Van Belkum *et al.*, 2010). RIF e BED mantiveram suas respectivas sensibilidades ao MIC₉₀ original, fato que não explica por que ambos os medicamentos tiveram um comportamento individual inesperado no experimento de cinética. Idealmente, as concentrações usadas deveriam produzir efeito antimicobacteriano para os fármacos individualmente. Embora seja relatado que, quando o experimento de cinética utiliza exatamente o valor de MIC₉₀ para o *kill-kinetics*, é possível que não se identifique inibição, visto que os valores de MIC podem apresentar uma variação de duas a três vezes (Early; Alling, 2015), as concentrações usadas no experimento estavam além do limite para demonstrar atividade (RIF 1µM e BED 0,5µM). Como seus MICs após o experimento de cinética não foram alterados, o fato de ambos não terem apresentado comportamento esperado durante o *kill-kinetics* não é explicado pelo desenvolvimento de resistência. No entanto, quando ambos os medicamentos foram associados à dose fixa de 125µM ORL, foi demonstrado forte efeito bactericida, o que deve ser resultado do efeito sinérgico, visto que os medicamentos sozinhos (ORL, RIF e BED) não forneceram esse resultado.

5.3.4 Extração de metil ésteres de ácido micólico (MAME) e análise por CCD

Para investigar o potencial mecanismo de ação dos fármacos CAR, OTI e ORL, foi realizada uma análise de metil ésteres de ácido micólico. Sabe-se que a INH inibe a confecção dos três ácidos micólicos principais: Ceto-MAME, Metoxi-MAME e α-MAME, obstruindo assim a montagem da parede celular micobacteriana. Portanto,

este foi utilizado como controle positivo e DMSO foi selecionado como controle negativo. A análise de cromatografia em camada delgada (CCD) demonstrada na Figura 32 permite observar de forma qualitativa que os fármacos ORL e CAR aparentam ter o mesmo comportamento de inibição de todos os três MAMEs analisados quando comparados com INH, enquanto o OTI aparenta inibir apenas Keto-MAME.

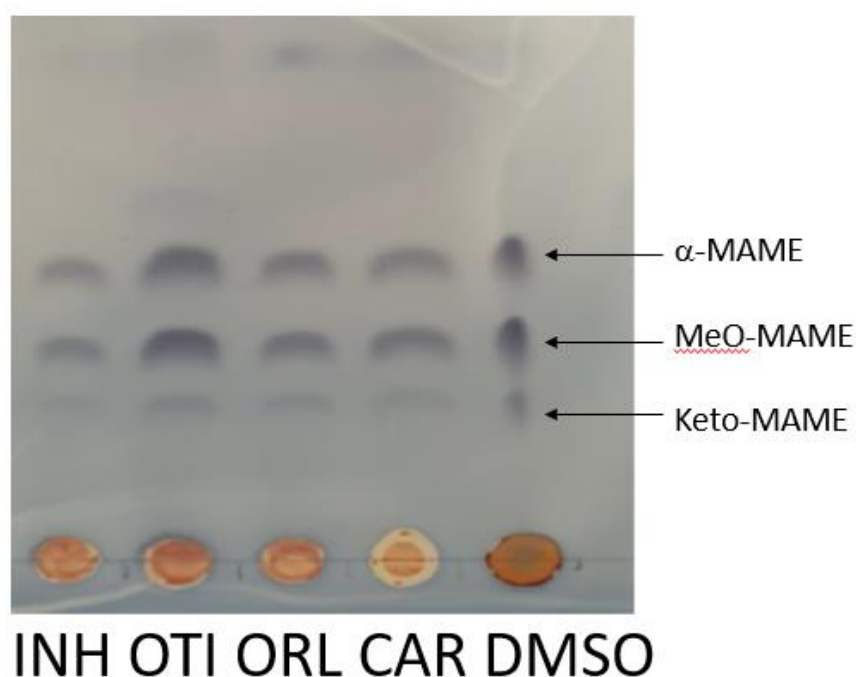


Figura 32. Placa de cromatografia em camada delgada demonstrando eluição dos metil ésteres de ácido micólico (MAME). Fármacos teste Otilônio (OTI), Orlistate (ORL) e Carvedilol (CAR). Isoniazida (INH) e dimetilsulfóxido (DMSO) foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

A título de obter um resultado quantitativo, a placa foi escaneada e convertida em arquivo para análise de escala de cinza (processo descrito em Material e Métodos 4.2.4) e, posteriormente, os valores obtidos de área foram então exportados para o software GraphPad Prism 9.0.0 e as médias dos grupos teste foram comparadas com o controle INH através do teste de Dunnett (Dunnett, 1955). A partir do resultado quantitativo (Figura 33), foi possível verificar que a atividade inibitória de OTI, ORL e CAR para Keto-MAME (representado por triângulo) se assemelha a INH.

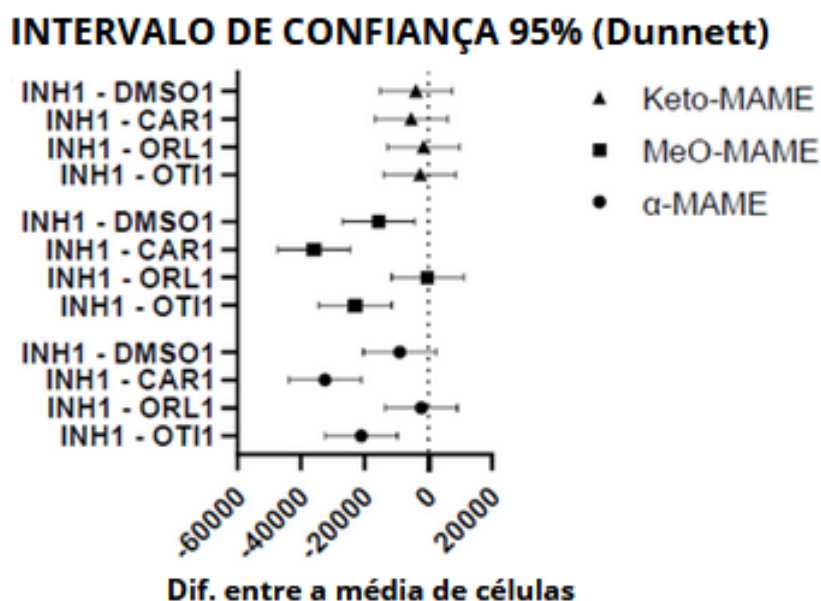


Figura 33. Resultado da análise estatística Dunnett para comparar inibição de MAME entre o grupo controle (INH) e os fármacos teste. Keto-MAME (triângulo), Meo-MAME (quadrado), α-MAME (círculo).

Considerando o mecanismo de ação proposto pelo método *in silico* para OTI e CAR (bloqueio da proteína transmembrana MmpL3), o resultado de inibição da formação de Keto-MAME é compreendido, porém não completo. Isso porque a proteína MmpL3 age como transportadora de trehalose monomicolatos (TMM) do meio intracelular para a parede celular externa, onde vão ser formados os trehalose dimicolatos (TDM), ou ácidos micólicos “completos”. O bloqueio da MmpL3 pelo seu inibidor mais conhecido SQ109 (Figura 34), causa o acúmulo de TMMs no meio intracelular, e a consequente inibição de formação dos ácidos micólicos (Sacksteder; Protopopova; Barry; Andries *et al.*, 2012). Portanto, o resultado esperado para OTI e CAR, considerando-se a varredura *in silico* para inibição de MmpL3, era a não formação de todos os três ácidos micólicos analisados. Existe, entretanto, uma explicação plausível para este comportamento: a “promiscuidade” farmacológica. Este termo diz respeito à afinidade que um mesmo fármaco possui para se ligar a diferentes alvos (Vandongen, 2023). Viu-se que ambos OTI e CAR foram capazes de inibir crescimento bacteriano tanto de forma individual, quanto em sinergismo com outros compostos. Dessa maneira, é muito possível que os fármacos possuam afinidades com outros alvos moleculares mais específicos da micobactéria, para além da MmpL3,

causando a inibição da formação de Ceto-MAME. Contudo, mais estudos são necessários, visto que a investigação de reposicionamento dos fármacos OTI e CAR para o tratamento de tuberculose ainda é um tópico recente.

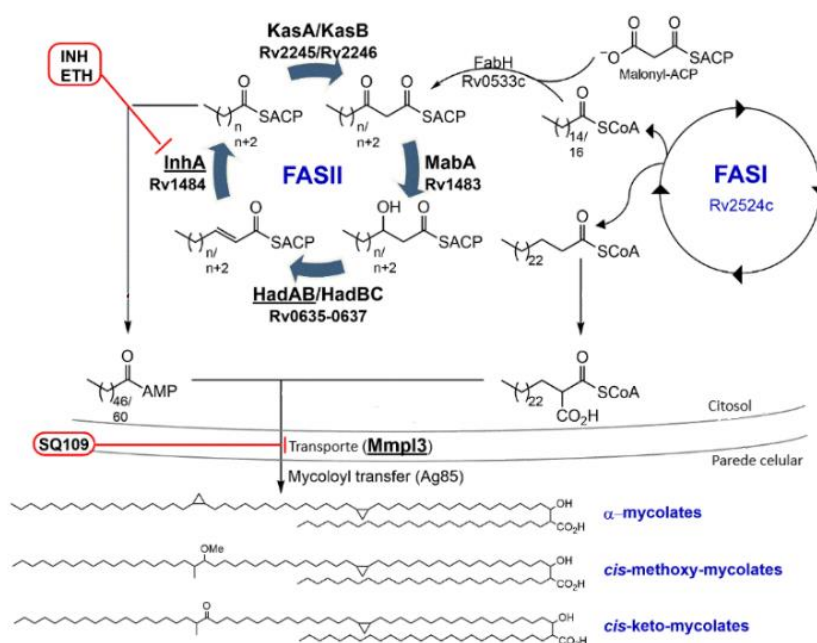


Figura 34. Biossíntese do ácido micólico. Apenas a configuração cis do grupo ciclopropano dos ácidos metoxi (MeO-MAME) e ceto (Keto-MAME) é mostrada, mas *M. tuberculosis* também produz os ácidos trans-MeO-MAME e trans-Keto-MAME. Os inibidores do ácido micólico em uso clínico são Isoniazida (INH) e Etonamida (ETH) para inibição de enoil-ACP-redutase (InhA) e em ensaios clínicos para Mmp13 representado pelo composto SQ109. Fonte: (Vilchèze, 2020).

Apenas o ORL foi capaz de inibir a formação de MeO-MAME (representado por quadrado) e α-MAME (representado por esfera), além de Ceto-MAME (representado por triângulo). Este é um resultado coerente e esperado para o ORL, visto que o fármaco foi identificado pela varredura *in silico* como possível ligante da enzima enoil-ACP-redutase (InhA), assim como INH e, portanto, devem demonstrar atividades inibitórias semelhantes. Este resultado contribui para uma melhor compreensão de um dos mecanismos por trás de uma das atividades do fármaco ORL.

5.3.5 Avaliação da expressão gênica de InhA e iniB

Devido à identificação de o fármaco ORL aparentar um perfil de inibição similar a INH, investigou-se mais a fundo se o mecanismo por trás da inibição de ácido micólicos ocorria através da mesma via. Em resposta ao tratamento com Isoniazida, o *Mtb* aumenta a expressão de um operon denominado *iniBAC*, que é composto pelos genes *iniB*, *iniA* e *iniC* (Alland; Steyn; Weisbrod; Aldrich *et al.*, 2000). O mesmo ocorre com o Etambutol, devido a ambos os medicamentos atuarem na mesma via de inibição da biossíntese do ácido micólico (Boot; Sparrus; Jim; Commandeur *et al.*, 2016). É também bem conhecido que a micobactéria aumenta a expressão de enzima alvo enoil-ACP-redutase (InhA), em resposta ao tratamento com INH. Portanto, exploramos o potencial do ORL em elevar a expressão do gene *iniB* e da enzima InhA. Contudo, contrário ao esperado, ORL não induziu a expressão de InhA (Figura 35), demonstrando apenas um ligeiro aumento, embora não significativo, na expressão de *iniB* (Figura 36).

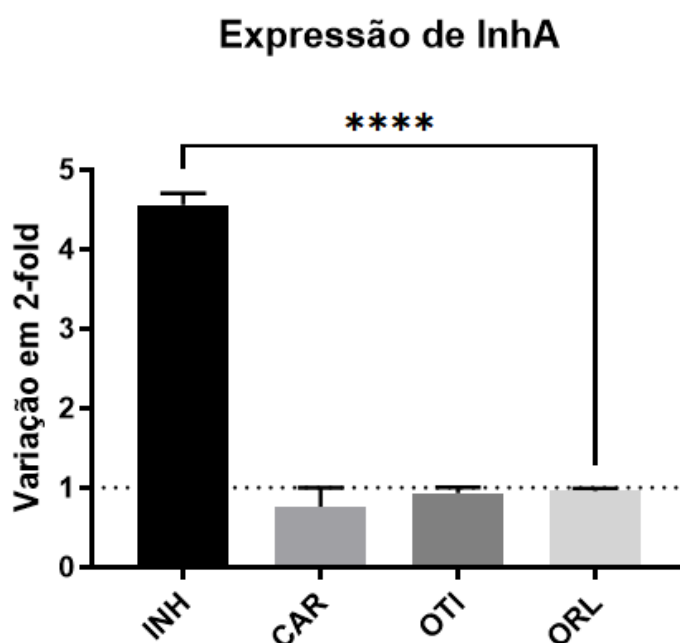


Figura 35. RT-qPCR para enzima Enoil-ACP-redutase (InhA). Expressão de Enoil-ACP-redutase (InhA) induzida pelos compostos Isoniazida (INH), Carvedilol (CAR), Otilônio (OTI) e Orlistate (ORL). Variação em “2-fold” corresponde ao aumento da expressão de 2x em relação ao controle. **** = $p < 0,0001$.

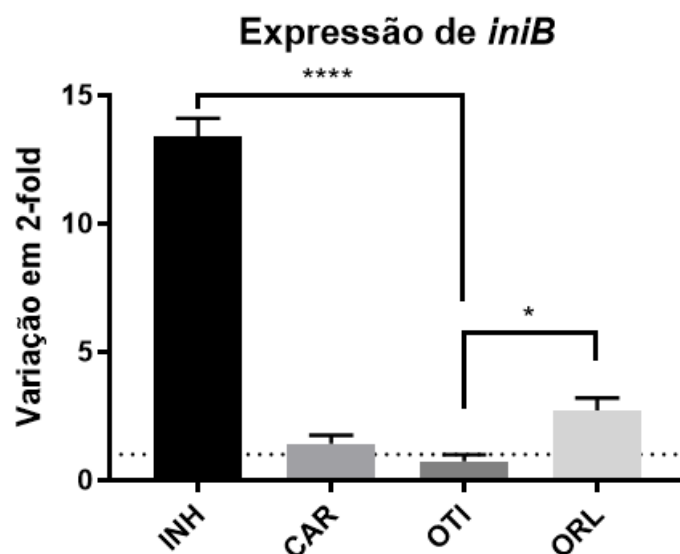


Figura 36. RT-qPCR para expressão de *iniB*. Expressão do gene *iniB* induzido pelos compostos Isoniazida (INH), Carvedilol (CAR), Otilônio (OTI) e Orlistate (ORL). Variação em “2-fold” corresponde ao aumento da expressão de 2x em relação ao controle. * = $p < 0,05$; **** = $p < 0,0001$.

Associando os resultados deste e dos experimentos MAME, pode-se teorizar que, embora tenha sido comprovado (a partir da literatura e experimentos realizados pela pesquisa) que o ORL de fato atua na biossíntese de ácido micólico, é mais provável que não use a mesma via de inibição da Isoniazida. Mais recentemente, um estudo *in silico* demonstrou que o ORL interage covalentemente com o complexo Ag85s, resultante de um ataque nucleofílico ao anel β -propiolactona do ORL (Goins; Dajnowicz; Smith; Parks *et al.*, 2018) pelo sítio catalítico da enzima, comprometendo sua atividade. O complexo Ag85 é codificado pelos genes *fbp* (*fbpA*, *fbpB* e *fbpC*) e compreende Ag85A, Ag85B e Ag85C, três enzimas transesterases homólogas secretadas (Belisle; Vissa; Sievert; Takayama *et al.*, 1997). Estas enzimas, presentes na parede celular micobacteriana, catalisam a produção de trealose dimicolato (TDM) e micolil-arabinogalactano (mAG) a partir de trealose monomicolato (TMM). Esse processo ocorre através de ataque nucleofílico utilizando uma tríade catalítica da Ag85C composta por uma serina nucleofílica (Ser¹²⁴), uma base de histidina (His²⁶⁰) e um ácido glutâmico (Glu²²⁸). Por conta da similaridade estrutural que o fármaco ORL possui em relação ao substrato da Ag85C (TMM) (devido à sua cauda carbônica apolar e cabeça polar), quando em contato com o fármaco, ocorre o sequestro da atividade enzimática. O ataque nucleofílico da enzima ocorre no carbono carbonílico

do anel β -propiolactona do fármaco, levando a um complexo inibidor-enzima covalente (Goins; Sudasinghe; Liu; Wang *et al.*, 2018). Goins et al. co-cristalizaram a Ag85C com o ORL (PDB: 5VNS), resultando em uma estrutura de resolução de 1,45Å e demonstraram que essa interação ocorre em minutos (Goins; Dajnowicz; Smith; Parks *et al.*, 2018), o que significa que esta atividade ocorre de forma relativamente rápida e muito estável. A interação resultou em mudanças estruturais na Ag85C, especificamente na histidina catalítica, His²⁶⁰, sendo esta fisicamente deslocada pela cadeia peptídica lateral, ficando a uma distância de ligação de hidrogênio da Ser¹⁴⁸ vizinha.

Considerando evidências de que o fármaco ORL já demonstrou inibição de ao menos 261 lipases em *M. bovis* (Goins; Sudasinghe; Liu; Wang *et al.*, 2018), a inibição covalente com Ag85C foi encontrada como estereoespecífica, evidência suportada por um número de derivados do ORL com outros substituintes estruturais diminuindo sua afinidade com Ag85C (e Ag85A) (Khan; Sudasinghe; Landgraf; Ronning *et al.*, 2021). De fato, foi encontrado que os dois centros estereogênicos do braço peptídico do fármaco podem afetar a especificidade enzimática e a estabilidade da ligação com o Ag85C, enquanto a hidrólise catalítica do anel β -propiolactona do ORL é importante para a reatividade cruzada do fármaco (Figura 37) (Goins; Sudasinghe; Liu; Wang *et al.*, 2018).

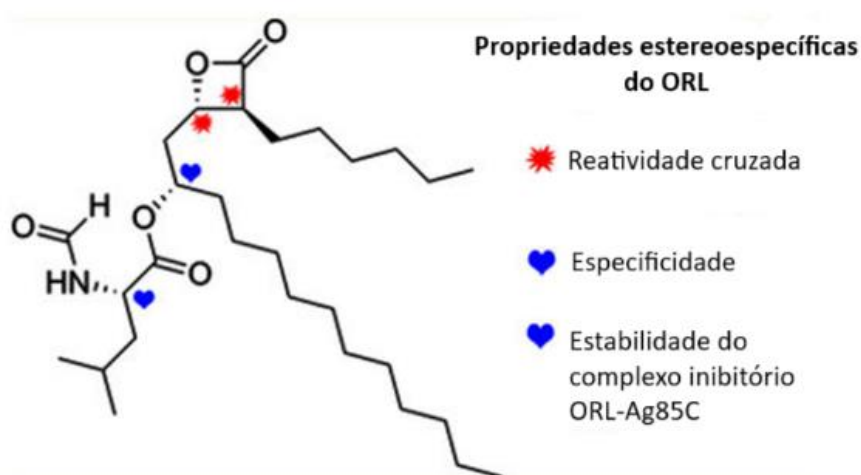


Figura 37. Estrutura molecular do fármaco Orlistate (ORL) e seus grupos farmacofóricos. Asterisco vermelho corresponde a região onde ocorre a hidrólise catalítica do anel β -lactona do ORL. Corações em azul correspondem as regiões da cadeia peptídica responsáveis pela especificidade e estabilidade da ligação ORL-Ag85C. Fonte: (Goins; Sudasinghe; Liu; Wang *et al.*, 2018).

Todas as evidências apresentadas suportam a explicação do porquê o fármaco bloqueia a produção de ácidos micólicos, porém não aparentam induzir expressão de *InhA* e induz levemente *iniB*, pois apesar de se ligar com diversos alvos de *Mtb*, a afinidade maior do composto muito provavelmente está em alvos de uma etapa mais avançada da biossíntese do ácido micólico.

5.3.6 Inibição intracelular com macrófagos THP-1

Um dos principais obstáculos ao desenvolver e/ou reposicionar um novo medicamento para tuberculose é a capacidade que o fármaco deve possuir, de inibir bactérias dormentes intracelulares. Como explicado anteriormente, a *Mtb* possui diversos mecanismos de evasão ao sistema imune e sua eliminação no organismo, persistindo dentro de macrófagos em situação dormente por anos (Silva Miranda; Breiman; Allain; Deknuydt *et al.*, 2012). Assim, também foram testados o ORL e o CAR para investigar a capacidade dos fármacos de eliminar carga bacteriana intracelular, utilizando a linhagem THP-1 (acrônimo de Tohoku Hospital Pediatrics-1, local onde essa linhagem celular monocítica foi obtida, a partir de um paciente com leucemia aguda monocítica). Rifampicina (3 μ M), Estreptomicina (20 μ M) e controle estéril. As substâncias-teste (ORL e CAR) foram aplicadas em uma concentração 4xMIC (100 μ M).

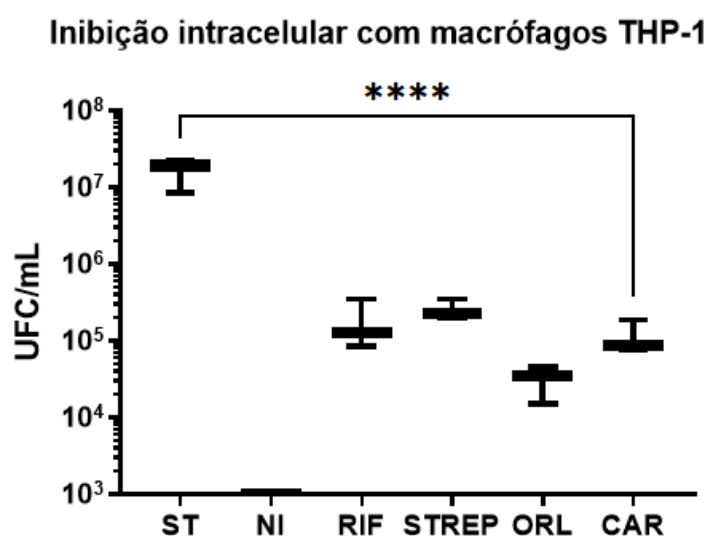


Figura 38. Ensaio de invasão de *Mtb* em THP-1 e efeito do tratamento com os fármacos ORL, CAR, RIF e STREP. ST – sem tratamento; NI – não infectado; RIF – Rifampicina (3 μ M); STREP – Estreptomicina (20 μ M); ORL – Orlistate (100 μ M); CAR – Carvedilol (100 μ M); **** = $p < 0,0001$. UFC/mL – unidades formadoras de colônia por mL.

Foi demonstrado que tanto o ORL quanto o CAR possuem um perfil semelhante aos controles Rifampicina (RIF) e Estreptomicina (STREP), sendo todos diferentes, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), do controle “sem tratamento” (ST). O fármaco ORL ainda apresentou um resultado ligeiramente melhor no que diz respeito à carga bacteriana (UFC/mL), porém não estatisticamente relevante, quando comparado aos fármacos controles. Os resultados deste ensaio demonstram que os fármacos testados não apenas são capazes de eliminar micobactérias extracelulares, mas também podem inibir o *Mtb* que foi fagocitado intracelularmente.

Recentemente, Sturm et al. realizaram um modelo de depleção de carbono para induzir cepas *Mtb* dormentes e descobriram que inibir o metabolismo lipídico por meio do inibidor de lipase ORL também foi capaz eliminar bactérias não replicantes (Sturm; Sun; Avila-Pacheco; Clatworthy *et al.*, 2024). Este é um resultado promissor que pode ser usado para avançar na busca por novas terapias para superar os problemas existentes no desenvolvimento de medicamentos, uma vez que bactérias intracelulares replicantes e não replicantes são consideravelmente menos sensíveis aos antibióticos existentes.

Outra preocupação em relação ao reposicionamento do ORL é o fato de o fármaco possuir baixa absorção sistêmica por via oral – seu mecanismo farmacológico envolve a inibição das lipases gástrica e pancreática na luz do trato gastrintestinal (Zhi; Melia; Eggers; Joly *et al.*, 1995; Zhi; Melia; Funk; Viger-Chougnnet *et al.*, 1996). Devido à baixa biodisponibilidade deste medicamento, um estudo recente foi conduzido para testar a segurança e tolerabilidade do ORL sozinho e em combinação com Vancomicina via administração pulmonar (Ravon; Menchi; Lambot; Al Kattar *et al.*, 2023). O ensaio *in vitro* detectou um efeito dose-dependente na viabilidade celular tanto para ORL sozinho quanto em combinação com VAN, com um IC₅₀ de aproximadamente 115 e 97 μ M, respectivamente, devido a um efeito citostático reversível. Mesmo assim, o fármaco e sua associação não induziram inflamação ou outras alterações histológicas *in vivo*, em pulmão de camundongo, durante a exposição subaguda (Ravon; Menchi; Lambot; Al Kattar *et al.*, 2023).

Este estudo expôs a possibilidade do uso de uma administração pulmonar de medicamentos pouco absorvidos para o tratamento de TB, como é o caso do ORL e OTI, e suas associações, como ORL/INH, ORL/RIF, ORL/BED, OTI/INH e OTI/BED encontradas neste estudo. Abre também, a oportunidade de se testar de novas formulações, como as nanoencapsuladas, na qual já foi verificada estabilidade da formulação e atividade para câncer de mama para o ORL (Bhargava-Shah; Foygel; Devulapally; Paulmurugan, 2016).

5.3.7 Indução de mutação espontânea

Para investigar a capacidade dos fármacos ORL e CAR de gerar resistência, foram estimulados mutantes resistentes espontâneos usando $5 \times \text{MIC}_{90}$ ($125 \mu\text{M}$ para ambos) para a cepa *M. tuberculosis* mc²6230. Após 4 e 6 semanas de incubação a 37°C , 10 colônias independentes foram selecionadas para uma nova análise de MIC com o objetivo verificar uma mudança (*shift*) na concentração (Figura 39).

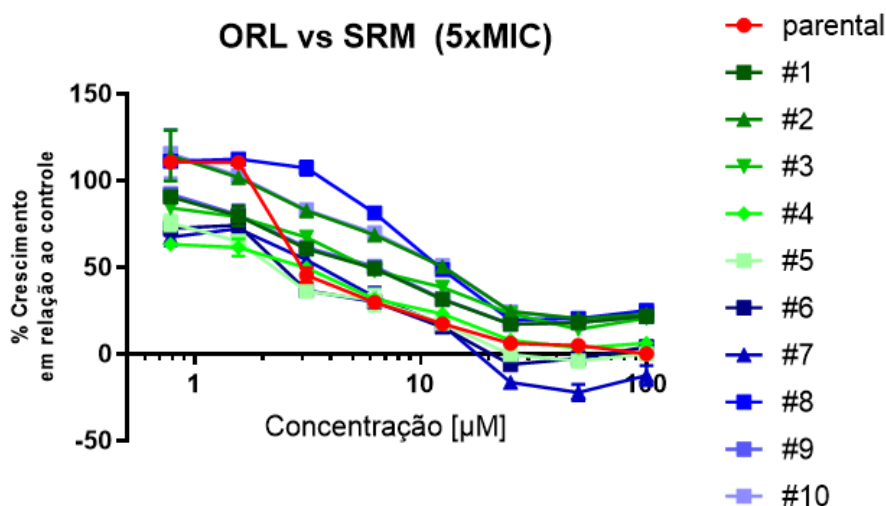


Figura 39. Reavaliação de concentração inibitória mínima (MIC₉₀) em cepas mutantes espontâneas *M. tuberculosis* mc²6230 para o fármaco Orlistate (ORL). Cepas mutantes espontâneas (SRM) (Cepas #1-10) geradas a partir do tratamento com $5 \times \text{MIC}_{90}$ ($125 \mu\text{M}$) previamente determinado e representado pela cepa parental em vermelho.

O resultado demonstrou que os mutantes gerados parecem não ser altamente resistentes ao ORL quando comparados à cepa parental (em vermelho), obtendo a mesma curva de comportamento e um aumento de apenas 16,7% em relação ao MIC₉₀ da cepa parenteral (25µM), sendo possível observar o MIC₇₅ para a cepa mais resistente #10 na concentração de 25µM.

Para o CAR, o resultado se demonstrou ainda mais promissor, não sendo capaz de isolar nenhuma colônia em meio sólido na concentração de 125µM, o que significa que a probabilidade do fármaco de gerar resistência é extremamente baixa. Este fato corrobora o argumento de que o CAR pode estar agindo como inibidor da proteína transmembrana MmpL3. Isto se deve ao raciocínio de que fármacos que agem em proteínas estruturais da micobactéria geram menos resistência, por conta da probabilidade de perda da função proteica em resposta a uma mudança de aminoácidos, o que é prejudicial para a sobrevivência da bactéria, associado com o argumento de que fármacos com atividade em estruturas de membrana também são interessantes pois não necessitam adentrar a célula (Payne; Gwynn; Holmes; Pompliano, 2007).

6 CONCLUSÃO

Aqui, a busca por reposicionamento de compostos a partir do uso de tecnologia computacional, sem qualquer viés prévio de busca na literatura, foi capaz de desenvolver um algoritmo determinado como X-Tox, para análise de toxicidade comparativa e encontrar ao menos três fármacos que demonstraram atividade *in vitro* satisfatória a respeito de atividade antimicobacteriana: ORL, CAR e OTI.

O fármaco ORL havia sido inicialmente triado para sua interação com o alvo da INH, enoil-ACP-redutase, no qual havia demonstrado maior afinidade *in silico* do que o próprio alvo original da enzima (verificada pelo *score* CHEMPLP). A partir desse dado, a busca *in vitro* foi iniciada e o fármaco de fato demonstrou atividade antimicobacteriana direta e intracelular em macrófagos, além de sinergismo com INH, RIF e BED e, também, inibição de três ácidos micólicos (Ceto-MAME, Metoxi-MAME e α -MAME), de forma similar à INH. Entretanto, analisando a superexpressão dos alvos *InhA* e *iniB*, não foi observado o mesmo comportamento de INH. Isso demonstra que é provável que o mecanismo de ação do ORL não seja pelo mesmo mecanismo previsto pelo *software*. Na literatura, foi descrito que ORL reage com mais de 200 alvos da *Mtb*, o que pode explicar o fato da varredura *in silico* ter identificado este composto como um possível ligante de *InhA*, apesar de não necessariamente ser o mecanismo de ação mais prevalente.

Para o alvo da proteína MmpL3, a varredura foi capaz de coletar 2 fármacos com atividade contra *Mtb*, os compostos Carvedilol e Otilônio. Ambos Carvedilol e Otilônio foram capazes de inibir crescimento bacteriano para as cinco cepas testadas H37Rv, CDC1551, Erdman, mc²6230 e XDR. No experimento de sinergismo, as associações CAR/RIF e CAR/BED obtiveram FICI = 0,375, o que determina atividade sinérgica. A associação OTI/BED obteve FICI = 0,3125 (sinérgico) e OTI/RIF obteve FICI = 0,5625 (aditivo). Ainda, no experimento de cinética, a associação CAR/INH e CAR/BED demonstrou atividade bactericida e, ainda que tenha havido crescimento de colônias ao final da placa CAR/INH, quando retestados, as colônias demonstraram resistência apenas a INH, não sendo observada resistência ao CAR. Este resultado também foi suportado pelo experimento de indução de mutantes espontâneos, onde também não foi capaz de observar crescimento de colônias resistentes ao CAR. Ainda

além, CAR conseguiu inibir crescimento bacteriano intracelular com resultado semelhante aos fármacos de referência RIF e STREP. Associados, esses resultados inéditos para o Carvedilol demonstram que o fármaco possui atividade em baixa concentração, sinergismo com fármacos da terapia atual e baixa capacidade de gerar resistência, podendo ser considerado para estudos futuros a respeito de seu mecanismo de ação e atividade *in vivo*. Em relação ao OTI, um dado relevante obtido pelo experimento de cinética foi a sua atividade bacteriostática em associação com INH e BED, sem demonstrar resistência ao final dos 30 dias de experimento. Este resultado pode salientar um mecanismo de ação diferente do Carvedilol, cuja associação demonstrou atividade bactericida. Ainda assim, os resultados do presente estudo abrem possibilidades para aprofundamento a respeito das atividades do OTI em relação à *Mtb*.

Assim sendo, a presente tese evidencia que a utilização de métodos computacionais para a triagem inicial de fármacos é de fato uma técnica capaz de detectar compostos passíveis de interação para seguimento de estudos *in vitro*. Ainda que haja necessidade de aprimoramento, a tese salienta que o uso de tecnologias pode ser aplicado também para análise toxicológica. A partir do desenvolvimento de um sistema de pontuações, foi gerado o algoritmo denominado X-Tox, utilizando dados toxicológicos de bases de dados com o objetivo de tornar a tomada de decisão de escolha farmacológica menos qualitativa e mais quantitativa. Empregando ambas as tecnologias, a pesquisa foi capaz de identificar com eficácia três fármacos que demonstraram atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*: Orlistate, Carvedilol e Otilônio, que demonstraram atividade antimicobacteriana em doses reduzidas, sinergismo com fármacos de primeira e segunda linha, atividade bactericida (ORL e CAR) e bacteriostática (OTI), baixa (ORL) ou nenhuma (CAR) capacidade de gerar resistência. Ainda, foi detectada atividade inibitória intracelular com macrófagos THP-1 para ORL e CAR, atividade esta que ainda é um desafio para o desenvolvimento de novos fármacos. Por fim, a tese salienta a importância da busca dos mecanismos de ação para os fármacos citados, e estimula que a busca para um tratamento mais eficiente para a doença secular que é a Tuberculose siga sempre sendo aprimorada.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HALIM, H.; HAJAR, M.; HASOUNEH, L.; ABDELMALEK, S. M. A. Identification of Drug Combination Therapies for SARS-CoV-2: A Molecular Dynamics Simulations Approach. **Drug Des Devel Ther**, 16, p. 2995-3013, 2022.

AL SHARIF, M.; VITCHEVA, V.; SIMEONOVA, R.; KRASTEVA, I. *et al.* In silico and in vivo studies of Astragalus glycyphylloides saponin(s) with relevance to metabolic syndrome modulation. **Food Chem Toxicol**, 130, p. 317-325, Aug 2019.

ALI, B. H. Agents ameliorating or augmenting experimental gentamicin nephrotoxicity: some recent research. **Food Chem Toxicol**, 41, n. 11, p. 1447-1452, Nov 2003.

ALLAND, D.; STEYN, A. J.; WEISBROD, T.; ALDRICH, K. *et al.* Characterization of the Mycobacterium tuberculosis iniBAC promoter, a promoter that responds to cell wall biosynthesis inhibition. **J Bacteriol**, 182, n. 7, p. 1802-1811, Apr 2000.

ALSAYED, S. S. R.; BEH, C. C.; FOSTER, N. R.; PAYNE, A. D. *et al.* Kinase Targets for Mycolic Acid Biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. **Curr Mol Pharmacol**, 12, n. 1, p. 27-49, 2019.

ARONOV, A. M. Predictive in silico modeling for hERG channel blockers. **Drug Discov Today**, 10, n. 2, p. 149-155, Jan 15 2005.

BANERJEE, P.; ECKERT, A. O.; SCHREY, A. K.; PREISSNER, R. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Res**, 46, n. W1, p. W257-w263, Jul 2 2018.

BARKAN, D.; HEDHLI, D.; YAN, H. G.; HUYGEN, K. *et al.* Mycobacterium tuberculosis lacking all mycolic acid cyclopropanation is viable but highly attenuated and hyperinflammatory in mice. **Infect Immun**, 80, n. 6, p. 1958-1968, Jun 2012.

BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? **Clin Microbiol Rev**, 26, n. 2, p. 185-230, Apr 2013.

BELISLE, J. T.; VISSA, V. D.; SIEVERT, T.; TAKAYAMA, K. *et al.* Role of the Major Antigen of Mycobacterium tuberculosis in Cell Wall Biogenesis. **Science**, 276, n. 5317, p. 1420-1422, 1997.

BEMER-MELCHIOR, P.; BRYSKIER, A.; DRUGEON, H. B. Comparison of the in vitro activities of rifapentine and rifampicin against Mycobacterium tuberculosis complex. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 46, n. 4, p. 571-576, 2000.

BERBERICH, A. J.; HEGELE, R. A. Lomitapide for the treatment of hypercholesterolemia. **Expert Opin Pharmacother**, 18, n. 12, p. 1261-1268, Aug 2017.

BHARGAVA-SHAH, A.; FOYGEL, K.; DEVULAPALLY, R.; PAULMURUGAN, R. Orlistat and antisense-miRNA-loaded PLGA-PEG nanoparticles for enhanced triple negative breast cancer therapy. **Nanomedicine (Lond)**, 11, n. 3, p. 235-247, Feb 2016.

BHATIA, V.; ARORA, P.; KAUR, G.; KAUL, U. Saroglitazar: A New Drug to Treat Diabetic Hypertriglyceridemia. **Heart Research - Open Journal**, 4, n. 1, p. 12-17, 2016.

BMRC, B. M. R. C. Controlled clinical trial of short-course (6-month) regimens of chemotherapy for treatment of pulmonary tuberculosis. **Lancet**, 1, n. 7760, p. 1079-1085, May 20 1972.

BOLLA, J. R. Targeting MmpL3 for anti-tuberculosis drug development. **Biochem Soc Trans**, 48, n. 4, p. 1463-1472, Aug 28 2020.

BOOT, M.; SPARRIUS, M.; JIM, K. K.; COMMANDEUR, S. *et al.* iniBAC induction Is Vitamin B12- and MutAB-dependent in Mycobacterium marinum. **J Biol Chem**, 291, n. 38, p. 19800-19812, Sep 16 2016.

BORE, E.; HÉBRAUD, M.; CHAFSEY, I.; CHAMBON, C. *et al.* Adapted tolerance to benzalkonium chloride in Escherichia coli K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. **Microbiology (Reading)**, 153, n. Pt 4, p. 935-946, Apr 2007.

BOTELHO, M. G. Fractional inhibitory concentration index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms. **J Dent**, 28, n. 8, p. 565-570, Nov 2000.

BUCHANAN, W. W.; RAINSFORD, K. D.; KEAN, C. A.; KEAN, W. F. The illness of William Soutar (1898-1943). **Inflammopharmacology**, Sep 7 2023.

BYRNE, S. T.; DENKIN, S. M.; GU, P.; NUERMBERGER, E. *et al.* Activity of ketoconazole against Mycobacterium tuberculosis in vitro and in the mouse model. **J Med Microbiol**, 56, n. Pt 8, p. 1047-1051, Aug 2007.

CALDWELL, D.; COX, W. A.; D'ARCY, P. F.; ROWE, L. R. The antibacterial activity of new derivatives of 4-aminoquinoline and 4-aminoquinoline. **J Pharm Pharmacol**, 13, p. 554-564, Sep 1961.

CAMBAU, E.; DRANCOURT, M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. **Clin Microbiol Infect**, 20, n. 3, p. 196-201, Mar 2014.

CAMPBELL, E. A.; KORZHEVA, N.; MUSTAEV, A.; MURAKAMI, K. *et al.* Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. **Cell**, 104, n. 6, p. 901-912, Mar 23 2001.

CARIELLO, N. F.; WILSON, J. D.; BRITT, B. H.; WEDD, D. J. *et al.* Comparison of the computer programs DEREK and TOPKAT to predict bacterial mutagenicity. Deductive Estimate of Risk from Existing Knowledge. Toxicity Prediction by Komputer Assisted Technology. **Mutagenesis**, 17, n. 4, p. 321-329, Jul 2002.

CAVALIER, J. F.; SPILLING, C. D.; DURAND, T.; CAMOIN, L. *et al.* Lipolytic enzymes inhibitors: A new way for antibacterial drugs discovery. **Eur J Med Chem**, 209, p. 112908, Jan 1 2021.

CDC, C. f. D. C. Surveillance Definitions for Extensively Drug Resistant (XDR) and Pre-XDR Tuberculosis. <<https://www.cdc.gov/tb/php/dear-colleague-letters/2022-xdr-surveillance-definitions.html>>, 2022.

CHAKRAVARTI, S. K.; SAIKHOV, R. D.; KLOPMAN, G. Optimizing predictive performance of CASE Ultra expert system models using the applicability domains of individual toxicity alerts. **J Chem Inf Model**, 52, n. 10, p. 2609-2618, Oct 22 2012.

CHANDRA, P.; GRIGSBY, S. J.; PHILIPS, J. A. Immune evasion and provocation by Mycobacterium tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, 20, n. 12, p. 750-766, 2022/12/01 2022.

CHAUDHURI, A. D. Recent changes in guidelines on programmatic management of drug resistant tuberculosis in India 2019: a paradigm shift in tuberculosis control. **The Journal of Association of Chest Physicians**, 8, n. 2, p. 53-63, 2020.

CHENG, F.; LI, W.; ZHOU, Y.; SHEN, J. *et al.* admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. **J Chem Inf Model**, 52, n. 11, p. 3099-3105, Nov 26 2012.

COLLETTE, G.; BOURHABA, M.; MOUTSCHEN, M. [Should the BCG vaccine still be recommended?]. **Rev Med Liege**, 61, n. 5-6, p. 430-432, May-Jun 2006.

COMRIE, J. D. **Early Knowledge Regarding Phthisis**. *Edinb Med J*. 1910 Jul;5(1):19-37., 1910. 0367-1038 (Print).

CRONAN, M. R. In the Thick of It: Formation of the Tuberculous Granuloma and Its Effects on Host and Therapeutic Responses. **Front Immunol**, 13, p. 820134, 2022.

DA SILVA ROCHA, S. F. L.; OLANDA, C. G.; FOKOUE, H. H.; SANT'ANNA, C. M. R. Virtual Screening Techniques in Drug Discovery: Review and Recent Applications. **Curr Top Med Chem**, 19, n. 19, p. 1751-1767, 2019.

DE STEENWINKEL, J. E. M.; DE KNEGT, G. J.; TEN KATE, M. T.; VAN BELKUM, A. *et al.* Time–kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in

relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 65, n. 12, p. 2582-2589, 2010.

DIUKENDJIEVA, A.; AL SHARIF, M.; ALOV, P.; PENICHEVA, T. *et al.* ADME/Tox Properties and Biochemical Interactions of Silybin Congeners: In silico Study. **Nat Prod Commun**, 12, n. 2, p. 175-178, Feb 2017.

DONOGHUE, H. D. Paleomicrobiology of Human Tuberculosis. **Microbiol Spectr**, 4, n. 4, Aug 2016.

DUBOS, R. J.; DUBOS, J. **The white plague: tuberculosis, man, and society**. Rutgers University Press, 1987. 0813512247.

DUNN, P. L.; NORTH, R. J. Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. **Infect Immun**, 63, n. 9, p. 3428-3437, Sep 1995.

DUNNETT, C. W. A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. **Journal of the American Statistical Association**, 50, n. 272, p. 1096-1121, 1955/12/01 1955.

EARLY, J.; ALLING, T. Determination of compound kill kinetics against *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods Mol Biol**, 1285, p. 269-279, 2015.

EL-SHITANY, N. A.; EL-DESOKY, K. Protective Effects of Carvedilol and Vitamin C against Azithromycin-Induced Cardiotoxicity in Rats via Decreasing ROS, IL1- β , and TNF- α Production and Inhibiting NF- κ B and Caspase-3 Expression. **Oxid Med Cell Longev**, 2016, p. 1874762, 2016.

ERRICK, J. K.; HEEL, R. C. Nalbuphine. **Drugs**, 26, n. 3, p. 191-211, 1983/09/01 1983.

EVANGELISTA, S. Otilonium bromide: a selective spasmolytic for the gastrointestinal tract. **J Int Med Res**, 27, n. 5, p. 207-222, Sep-Oct 1999.

EVANGELISTA, S. Quaternary ammonium derivatives as spasmolytics for irritable bowel syndrome. **Curr Pharm Des**, 10, n. 28, p. 3561-3568, 2004.

EVANGELISTA, S.; TRAINI, C.; VANNUCCHI, M. G. Otilonium Bromide: A Drug with a Complex Mechanism of Action. **Curr Pharm Des**, 24, n. 16, p. 1772-1779, 2018.

FDA. Original NDA and Original BLA Approvals - Desferal. 1968.

FDA. Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Reviews - Ravicti. p. 89, 2012.

FDA. Letter from FDA CDER to Lonza America, Inc., American Cleaning Institute and Henkel North America regarding Review of Benzethonium Chloride. **Food and Drug Administration**, p. 7, 2016.

FDA. VYZULTA (latanoprostene bunod ophthalmic solution) 0.024%, for topical ophthalmic use. p. 8, 2017.

FELDMAN, W.; HINSHAW, H., 1944, **Effects of streptomycin on experimental tuberculosis in guinea pigs: a preliminary report.** 593-599.

FELDMAN, W. H.; HINSHAW, H. C.; MANN, F. C. Streptomycin in experimental tuberculosis. **American Review of Tuberculosis**, 52, n. 4, p. 269-298, 1945.

FÉLIX, L.; OLIVEIRA, M. M.; VIDEIRA, R.; MACIEL, E. *et al.* Carvedilol exacerbate gentamicin-induced kidney mitochondrial alterations in adult rat. **Exp Toxicol Pathol**, 69, n. 2, p. 83-92, Feb 2017.

FLEISCHMANN, R. D.; ALLAND, D.; EISEN, J. A.; CARPENTER, L. *et al.* Whole-genome comparison of Mycobacterium tuberculosis clinical and laboratory strains. **J Bacteriol**, 184, n. 19, p. 5479-5490, Oct 2002.

GETAHUN, H.; MATTEELLI, A.; ABUBAKAR, I.; AZIZ, M. A. *et al.* Management of latent Mycobacterium tuberculosis infection: WHO guidelines for low tuberculosis burden countries. **Eur Respir J**, 46, n. 6, p. 1563-1576, Dec 2015.

GIESSMANN, T.; MODESS, C.; HECKER, U.; ZSCHIESCHE, M. *et al.* CYP2D6 genotype and induction of intestinal drug transporters by rifampin predict presystemic clearance of carvedilol in healthy subjects. **Clin Pharmacol Ther**, 75, n. 3, p. 213-222, Mar 2004.

GILBERT, P.; MOORE, L. E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. **J Appl Microbiol**, 99, n. 4, p. 703-715, 2005.

GNS, H. S.; GR, S.; MURAHARI, M.; KRISHNAMURTHY, M. An update on Drug Repurposing: Re-written saga of the drug's fate. **Biomed Pharmacother**, 110, p. 700-716, Feb 2019.

GOINS, C. M.; DAJNOWICZ, S.; SMITH, M. D.; PARKS, J. M. *et al.* Mycolyltransferase from Mycobacterium tuberculosis in covalent complex with tetrahydrolipstatin provides insights into antigen 85 catalysis. **J Biol Chem**, 293, n. 10, p. 3651-3662, Mar 9 2018.

GOINS, C. M.; SUDASINGHE, T. D.; LIU, X.; WANG, Y. *et al.* Characterization of Tetrahydrolipstatin and Stereoderivatives on the Inhibition of Essential Mycobacterium tuberculosis Lipid Esterases. **Biochemistry**, 57, n. 16, p. 2383-2393, Apr 24 2018.

GOLDEN, M. P.; VIKRAM, H. R. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. **Am Fam Physician**, 72, n. 9, p. 1761-1768, Nov 1 2005.

GOLDSTEIN, B. P. Resistance to rifampicin: a review. **J Antibiot (Tokyo)**, 67, n. 9, p. 625-630, Sep 2014.

GONG, Y.; KIM, Y. R. Therapeutic potential of otilonium bromide against *Vibrio vulnificus*. **Res Microbiol**, 174, n. 1-2, p. 103992, Jan-Feb 2023.

GOOSSENS, S. N.; SAMPSON, S. L.; VAN RIE, A. Mechanisms of Drug-Induced Tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Microbiol Rev**, 34, n. 1, Dec 16 2020.

GREENE, N.; JUDSON, P. N.; LANGOWSKI, J. J.; MARCHANT, C. A. Knowledge-based expert systems for toxicity and metabolism prediction: DEREK, StAR and METEOR. **SAR QSAR Environ Res**, 10, n. 2-3, p. 299-314, 1999.

GRUMBACH, F. [Activity of rifampicin on experimental tuberculosis in mice. The development of resistance to rifampicin. Therapeutic effects of combinations of different drugs with rifampicin]. **Antibiot Chemother**, 16, p. 392-405, 1970.

GUNASINGAM, N. *Mycobacterium smegmatis*: Exploring its Similarities with *Mycobacterium tuberculosis*. **Mycobacterial Diseases**, 13, n. 4, p. 345, 2023.

GYGLI, S. M.; BORRELL, S.; TRAUNER, A.; GAGNEUX, S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. **FEMS Microbiol Rev**, 41, n. 3, p. 354-373, May 1 2017.

HAALCK, L.; SPENER, F. On the inhibition of microbial lipases by tetrahydrolipstatin. **Methods Enzymol**, 286, p. 252-263, 1997.

HADVÁRY, P.; SIDLER, W.; MEISTER, W.; VETTER, W. *et al.* The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase. **J Biol Chem**, 266, n. 4, p. 2021-2027, Feb 5 1991.

HAHN, J.; SEEBER, F.; KOLODZIEJ, H.; IGNATIUS, R. *et al.* High sensitivity of *Giardia duodenalis* to tetrahydrolipstatin (orlistat) in vitro. **PLoS One**, 8, n. 8, p. e71597, 2013.

HALL, M. J.; MIDDLETON, R. F.; WESTMACOTT, D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 11, n. 5, p. 427-433, 1983.

HAMZA, A.; WAGNER, J. M.; EVANS, T. J.; FRASINYUK, M. S. *et al.* Novel mycosin protease MycP₁ inhibitors identified by virtual screening and 4D fingerprints. **J Chem Inf Model**, 54, n. 4, p. 1166-1173, Apr 28 2014.

HAZBÓN, M. H.; BRIMACOMBE, M.; BOBADILLA DEL VALLE, M.; CAVATORE, M. *et al.* Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, 50, n. 8, p. 2640-2649, Aug 2006.

HINSHAW, H. C.; FELDMAN, W. H.; PFUETZE, K. H. Treatment of tuberculosis with streptomycin; a summary of observations on one hundred cases. **J Am Med Assoc**, 132, n. 13, p. 778-782, Nov 30 1946.

HONMA, M. An assessment of mutagenicity of chemical substances by (quantitative) structure-activity relationship. **Genes Environ**, 42, p. 23, 2020.

HOTHA, K. K.; DASARI, V. B.; SHAIK, A. N.; SYED, M. *et al.* Species difference in the in vitro and in vivo metabolism of amtolmetin guacil. **Arzneimittelforschung**, 60, n. 11, p. 667-674, 2010.

HUO, F.; LU, J.; ZONG, Z.; JING, W. *et al.* Change in prevalence and molecular characteristics of isoniazid-resistant tuberculosis over a 10-year period in China. **BMC Infect Dis**, 19, n. 1, p. 689, Aug 5 2019.

INÁCIO Â, S.; DOMINGUES, N. S.; NUNES, A.; MARTINS, P. T. *et al.* Quaternary ammonium surfactant structure determines selective toxicity towards bacteria: mechanisms of action and clinical implications in antibacterial prophylaxis. **J Antimicrob Chemother**, 71, n. 3, p. 641-654, Mar 2016.

JACKSON, M. The mycobacterial cell envelope-lipids. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 4, n. 10, Aug 7 2014.

JADAUN, G. P. S.; AGARWAL, C.; SHARMA, H.; AHMED, Z. *et al.* Determination of ethambutol MICs for Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium isolates by resazurin microtitre assay. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 60, n. 1, p. 152-155, 2007.

JADEJA, D.; DOGRA, N.; ARYA, S.; SINGH, G. *et al.* Characterization of LipN (Rv2970c) of Mycobacterium Tuberculosis H37Rv and its Probable Role in Xenobiotic Degradation. **J Cell Biochem**, 117, n. 2, p. 390-401, Feb 2016.

JAIN, P.; HSU, T.; ARAI, M.; BIERMANN, K. *et al.* Specialized transduction designed for precise high-throughput unmarked deletions in Mycobacterium tuberculosis. **mBio**, 5, n. 3, p. e01245-01214, Jun 3 2014.

JANKUTE, M.; COX, J. A.; HARRISON, J.; BESRA, G. S. Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. **Annu Rev Microbiol**, 69, p. 405-423, 2015.

JEANKUMAR, V. U.; RENUKA, J.; KOTAGIRI, S.; SAXENA, S. *et al.* Gyrase ATPase domain as an antitubercular drug discovery platform: structure-based design and lead optimization of nitrothiazolyl carboxamide analogues. **ChemMedChem**, 9, n. 8, p. 1850-1859, Aug 2014.

JIN, B. R.; KIM, H. J.; SIM, S. A.; LEE, M. *et al.* Anti-Obesity Drug Orlistat Alleviates Western-Diet-Driven Colitis-Associated Colon Cancer via Inhibition of STAT3 and NF- κ B-Mediated Signaling. **Cells**, 10, n. 8, Aug 11 2021.

JINDANI, A.; NUNN, A. J.; ENARSON, D. A. Two 8-month regimens of chemotherapy for treatment of newly diagnosed pulmonary tuberculosis: international multicentre randomised trial. **Lancet**, 364, n. 9441, p. 1244-1251, Oct 2-8 2004.

KANEKO, Y.; FUKAZAWA, H.; OHNO, H.; MIYAZAKI, Y. Combinatory effect of fluconazole and FDA-approved drugs against Candida albicans. **J Infect Chemother**, 19, n. 6, p. 1141-1145, Dec 2013.

KELLEY, C. L.; COLLINS, F. M. Growth of a highly virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* in mice of differing susceptibility to tuberculous challenge. **Tuber Lung Dis**, 79, n. 6, p. 367-370, 1999.

KHAN, S. S.; SUDASINGHE, T. D.; LANDGRAF, A. D.; RONNING, D. R. *et al.* Total Synthesis of Tetrahydrolipstatin, Its Derivatives, and Evaluation of Their Ability to Potentiate Multiple Antibiotic Classes against *Mycobacterium* Species. **ACS Infect Dis**, 7, n. 10, p. 2876-2888, Oct 8 2021.

KING, M. J.; PARK, W. H. Effect of Calmette's BCG Vaccine on Experimental Animals. **Am J Public Health Nations Health**, 19, n. 2, p. 179-192, Feb 1929.

KITADOKORO, K.; TANAKA, M.; HIKIMA, T.; OKUNO, Y. *et al.* Crystal structure of pathogenic *Staphylococcus aureus* lipase complex with the anti-obesity drug orlistat. **Scientific Reports**, 10, n. 1, p. 5469, 2020/03/25 2020.

KNOX, R.; KING, M. B.; WOODROFFE, R. C. In-vitro action of isoniazid on *Mycobacterium tuberculosis*. **Lancet**, 2, n. 6740, p. 854-858, Nov 1 1952.

KOCH, R. A Further Communication on a Remedy for Tuberculosis. **Ind Med Gaz**, 26, n. 3, p. 85-87, Mar 1891.

KORTUEM, K. M.; STEWART, A. K. Carfilzomib. **Blood**, 121, n. 6, p. 893-897, 2013/02/07/ 2013.

KÖSTER, S.; UPADHYAY, S.; CHANDRA, P.; PAPAVINASASUNDARAM, K. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* is protected from NADPH oxidase and LC3-associated phagocytosis by the LCP protein CpsA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 114, n. 41, p. E8711-e8720, Oct 10 2017.

KRISHNASAMY, S. K.; NAMASIVAYAM, V.; MATHEW, S.; EAKAMBARAM, R. S. *et al.* Design, Synthesis, and Characterization of Some Hybridized Pyrazolone Pharmacophore Analogs against *Mycobacterium tuberculosis*. **Arch Pharm (Weinheim)**, 349, n. 5, p. 383-397, May 2016.

KUMAR, K. V.; SHIFOW, A. A.; NAIDU, M. U.; RATNAKAR, K. S. Carvedilol: a beta blocker with antioxidant property protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Life Sci**, 66, n. 26, p. 2603-2611, May 19 2000.

LANDRY, C.; KIM, M. T.; KRUHLAK, N. L.; CROSS, K. P. *et al.* Transitioning to composite bacterial mutagenicity models in ICH M7 (Q)SAR analyses. **Regul Toxicol Pharmacol**, 109, p. 104488, Dec 2019.

LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein J Org Chem**, 12, p. 2694-2718, 2016.

LEHMANN, J. Para-aminosalicylic acid in the treatment of tuberculosis. **Lancet**, 1, n. 6384, p. 15, Jan 5 1946.

LOPEZ, B.; SIQUEIRA DE OLIVEIRA, R.; PINHATA, J. M. W.; CHIMARA, E. *et al.* Bedaquiline and linezolid MIC distributions and epidemiological cut-off values for *Mycobacterium tuberculosis* in the Latin American region. **J Antimicrob Chemother**, 74, n. 2, p. 373-379, Feb 1 2019.

MAGANTI, L.; GRANDHI, P.; GHOSHAL, N. Integration of ligand and structure based approaches for identification of novel MbtI inhibitors in *Mycobacterium tuberculosis* and molecular dynamics simulation studies. **J Mol Graph Model**, 70, p. 14-22, Nov 2016.

MAIA, E. H. B.; ASSIS, L. C.; DE OLIVEIRA, T. A.; DA SILVA, A. M. *et al.* Structure-Based Virtual Screening: From Classical to Artificial Intelligence. **Front Chem**, 8, p. 343, 2020.

MAJUMDAR, A.; WANKHADE, G.; KAMBLE, P. D.; HARINATH, B. C. Effect of HIV protease inhibitors and Orlistat on mycobacterial ES-31 serine protease, a potential drug target in *Mycobacterium tuberculosis*. **Indian J Tuberc**, 58, n. 1, p. 4-10, Jan 2011.

MALHOTRA, S.; VEDITHI, S. C.; BLUNDELL, T. L. Decoding the similarities and differences among mycobacterial species. **PLoS Negl Trop Dis**, 11, n. 8, p. e0005883, Aug 2017.

MARCHANT, C. A.; BRIGGS, K. A.; LONG, A. In silico tools for sharing data and knowledge on toxicity and metabolism: derek for windows, meteor, and vitic. **Toxicol Mech Methods**, 18, n. 2-3, p. 177-187, 2008.

MARSHALL, G. STREPTOMYCIN treatment of pulmonary tuberculosis. **Br Med J**, 2, n. 4582, p. 769-782, Oct 30 1948.

MAUNZ, A.; GÜTLEIN, M.; RAUTENBERG, M.; VORGRIMMLER, D. *et al.* lazar: a modular predictive toxicology framework. **Front Pharmacol**, 4, p. 38, 2013.

MCCUNE, R. M., Jr.; MCDERMOTT, W.; TOMPSETT, R. The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculous infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug. **J Exp Med**, 104, n. 5, p. 763-802, Nov 1 1956.

MCCUNE , R. M., Jr.; TOMPSETT , R.; MCDERMOTT , W. THE FATE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN MOUSE TISSUES AS DETERMINED BY THE MICROBIAL ENUMERATION TECHNIQUE : II. THE CONVERSION OF TUBERCULOUS INFECTION TO THE LATENT STATE BY THE ADMINISTRATION OF PYRAZINAMIDE AND A COMPANION DRUG. **Journal of Experimental Medicine**, 104, n. 5, p. 763-802, 1956.

MCNEIL, M.; DAFFE, M.; BRENNAN, P. J. Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. **J Biol Chem**, 265, n. 30, p. 18200-18206, Oct 25 1990.

MCNEIL, M.; WALLNER, S. J.; HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. Demonstration that the galactosyl and arabinosyl residues in the cell-wall arabinogalactan of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* are furanoid. **Carbohydr Res**, 166, n. 2, p. 299-308, Sep 1 1987.

MELO, S. R.; HOMEM-DE-MELLO, M.; SILVEIRA, D.; SIMEONI, L. A. Advice on Degradation Products in Pharmaceuticals: A Toxicological Evaluation. **PDA J Pharm Sci Technol**, 68, n. 3, p. 221-238, 5/6 2014.

MERCK. History and the Discovery and Development of Crixivan. p. 5, 1996.

MIDDLETON, A. M.; CHADWICK, M. V.; NICHOLSON, A. G.; DEWAR, A. *et al.* Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with human respiratory mucosa. **Tuberculosis (Edinb)**, 82, n. 2-3, p. 69-78, 2002.

MIGLIORI, G. B.; LODDENKEMPER, R.; BLASI, F.; RAVIGLIONE, M. C. 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: the new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic? **Eur Respir J**, 29, n. 3, p. 423-427, Mar 2007.

MILBURN, H. J. Primary tuberculosis. **Curr Opin Pulm Med**, 7, n. 3, p. 133-141, May 2001.

MITCHESON, J. S.; CHEN, J.; LIN, M.; CULBERSON, C. *et al.* A structural basis for drug-induced long QT syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97, n. 22, p. 12329-12333, Oct 24 2000.

MITCHISON, D.; DAVIES, G. The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future. **Int J Tuberc Lung Dis**, 16, n. 6, p. 724-732, Jun 2012.

MIZUOCHI, Y.; OKAJIMA, K.; HARADA, N.; MOLOR-ERDENE, P. *et al.* Carvedilol, a nonselective beta-blocker, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocytes in vitro. **Transl Res**, 149, n. 4, p. 223-230, Apr 2007.

MONGIA, A.; SAHA, S. K.; CHOUZENOUX, E.; MAJUMDAR, A. A computational approach to aid clinicians in selecting anti-viral drugs for COVID-19 trials. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 9047, Apr 27 2021.

MORLOCK, G. P.; METCHOCK, B.; SIKES, D.; CRAWFORD, J. T. *et al.* *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, 47, n. 12, p. 3799-3805, Dec 2003.

NAGEL, S.; STREICHER, E. M.; KLOPPER, M.; WARREN, R. M. *et al.* Isoniazid Resistance and Dosage as Treatment for Patients with Tuberculosis. **Curr Drug Metab**, 18, n. 11, p. 1030-1039, 2017.

NAKAZAWA, T.; KURODA, T.; ARAI, I.; NAKAHARA, Y. *et al.* Metabolic fate of tocoretinate (1). Absorption and excretion of ¹⁴C-tocoretinate in rats and dogs. 43, p. 205-210, 01/01 1992.

NATARAJAN, A.; BEENA, P. M.; DEVNIKAR, A. V.; MALI, S. A systemic review on tuberculosis. **Indian J Tuberc**, 67, n. 3, p. 295-311, Jul 2020.

NG, V. H.; COX, J. S.; SOUSA, A. O.; MACMICKING, J. D. *et al.* Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. **Mol Microbiol**, 52, n. 5, p. 1291-1302, Jun 2004.

NIEMI, M.; BACKMAN, J. T.; FROMM, M. F.; NEUVONEN, P. J. *et al.* Pharmacokinetic interactions with rifampicin : clinical relevance. **Clin Pharmacokinet**, 42, n. 9, p. 819-850, 2003.

NISHIO, R.; SHIOI, T.; SASAYAMA, S.; MATSUMORI, A. Carvedilol increases the production of interleukin-12 and interferon-gamma and improves the survival of mice infected with the encephalomyocarditis virus. **J Am Coll Cardiol**, 41, n. 2, p. 340-345, Jan 15 2003.

O'GARRA, A.; REDFORD, P. S.; MCNAB, F. W.; BLOOM, C. I. *et al.* The immune response in tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, 31, p. 475-527, 2013.

OMS. Global Tuberculosis Report. p. 75, 2023.

PARKER, S. K.; BARKLEY, R. M.; RINO, J. G.; VASIL, M. L. Mycobacterium tuberculosis Rv3802c encodes a phospholipase/thioesterase and is inhibited by the antimycobacterial agent tetrahydropiperazine. **PLoS One**, 4, n. 1, p. e4281, 2009.

PATEL, M. R.; KANSAGRA, K. A.; PARIKH, D. P.; PARMAR, D. V. *et al.* Effect of Food on the Pharmacokinetics of Saroglitazar Magnesium, a Novel Dual PPAR α Agonist, in Healthy Adult Subjects. **Clinical Drug Investigation**, 38, n. 1, p. 57-65, 2018/01/01 2018.

PAYNE, D. J.; GWYNN, M. N.; HOLMES, D. J.; POMPLIANO, D. L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, 6, n. 1, p. 29-40, 2007/01/01 2007.

PENG, H.; WANG, Q.; QI, X.; WANG, X. *et al.* Orlistat induces apoptosis and protective autophagy in ovarian cancer cells: involvement of Akt-mTOR-mediated signaling pathway. **Arch Gynecol Obstet**, 298, n. 3, p. 597-605, Sep 2018.

PEZZELLA, A. T. History of Pulmonary Tuberculosis. **Thorac Surg Clin**, 29, n. 1, p. 1-17, Feb 2019.

PHAM, T. N.; LOUPIAS, P.; DASSONVILLE-KLIMPT, A.; SONNET, P. Drug delivery systems designed to overcome antimicrobial resistance. **Med Res Rev**, 39, n. 6, p. 2343-2396, Nov 2019.

PITARQUE, S.; LARROUY-MAUMUS, G.; PAYRÉ, B.; JACKSON, M. *et al.* The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface. **Tuberculosis (Edinb)**, 88, n. 6, p. 560-565, Nov 2008.

POINT, V.; MALLA, R. K.; DIOMANDE, S.; MARTIN, B. P. *et al.* Synthesis and kinetic evaluation of cyclophostin and cyclipostins phosphonate analogs as selective and potent inhibitors of microbial lipases. **J Med Chem**, 55, n. 22, p. 10204-10219, Nov 26 2012.

PONTING, D. J.; BURNS, M. J.; FOSTER, R. S.; HEMINGWAY, R. *et al.* Use of Lhasa Limited Products for the In Silico Prediction of Drug Toxicity. **Methods Mol Biol**, 2425, p. 435-478, 2022.

PORTER, J. B. Deferoxamine pharmacokinetics. **Seminars in Hematology**, 38, p. 63-68, 2001/01/01/ 2001.

PORTO, A. [The entire life that might have been but was not: the story of a poet with pulmonary phthisis]. **Hist Cienc Saude Manguinhos**, 6, n. 3, p. 523-550, Nov-2000 Feb 1999.

PRICE, J. F. BCG vaccination. **Arch Dis Child**, 57, n. 7, p. 485-486, Jul 1982.

PUSHPAKOM, S.; IORIO, F.; EYERS, P. A.; ESCOTT, K. J. *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nat Rev Drug Discov**, 18, n. 1, p. 41-58, Jan 2019.

QU, Z.; REN, Y.; SHEN, H.; WANG, H. *et al.* Combination Therapy of Metastatic Castration-Recurrent Prostate Cancer: Hyaluronic Acid Decorated, Cabazitaxel-Prodrug and Orlistat Co-Loaded Nano-System. **Drug Des Devel Ther**, 15, p. 3605-3616, 2021.

RAHLWES, K. C.; DIAS, B. R. S.; CAMPOS, P. C.; ALVAREZ-ARGUEDAS, S. *et al.* Pathogenicity and virulence of Mycobacterium tuberculosis. **Virulence**, 14, n. 1, p. 2150449, Dec 2023.

RAJARAM, M. V. S.; ARNETT, E.; AZAD, A. K.; GUIRADO, E. *et al.* Initiated Human Mannose Receptor Signaling Regulates Macrophage Recognition and Vesicle Trafficking by FcR β -Chain, Grb2, and SHP-1. **Cell Reports**, 21, n. 1, p. 126-140, 2017.

RAMASWAMY, S. V.; REICH, R.; DOU, S.-J.; JASPERSE, L. *et al.* Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47, n. 4, p. 1241-1250, 2003.

RAVINDRAN, M. S.; RAO, S. P.; CHENG, X.; SHUKLA, A. *et al.* Targeting lipid esterases in mycobacteria grown under different physiological conditions using activity-based profiling with tetrahydrolipstatin (THL). **Mol Cell Proteomics**, 13, n. 2, p. 435-448, Feb 2014.

RAVON, F.; MENCHI, E.; LAMBOT, C.; AL KATTAR, S. *et al.* In vitro and in vivo local tolerability of a synergistic anti-tuberculosis drug combination intended for pulmonary delivery. **J Appl Toxicol**, 43, n. 2, p. 298-311, Feb 2023.

RAYASAM, G. V. MmpL3 a potential new target for development of novel anti-tuberculosis drugs. **Expert Opin Ther Targets**, 18, n. 3, p. 247-256, Mar 2014.

REHBERG, N.; OMEJE, E.; EBADA, S. S.; VAN GEELEN, L. *et al.* 3-O-Methyl-Alkylgallates Inhibit Fatty Acid Desaturation in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, 63, n. 9, Sep 2019.

RENS, C.; LAVAL, F.; DAFFÉ, M.; DENIS, O. *et al.* Effects of Lipid-Lowering Drugs on Vancomycin Susceptibility of Mycobacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, 60, n. 10, p. 6193-6199, Oct 2016.

RODRIGUEZ-TAKEUCHI, S. Y.; RENJIFO, M. E.; MEDINA, F. J. Extrapulmonary Tuberculosis: Pathophysiology and Imaging Findings. **Radiographics**, 39, n. 7, p. 2023-2037, Nov-Dec 2019.

ROGERS, D. J.; TANIMOTO, T. T. A Computer Program for Classifying Plants. **Science**, 132, n. 3434, p. 1115-1118, Oct 21 1960.

ROSENBLATT, M. B. Pulmonary tuberculosis: evolution of modern therapy. **Bull N Y Acad Med**, 49, n. 3, p. 163-196, Mar 1973.

RUBIN, S. A. Tuberculosis. Captain of all these men of death. **Radiol Clin North Am**, 33, n. 4, p. 619-639, Jul 1995.

RYBACKA, A.; RUDÉN, C.; ANDERSSON, P. L. On the use of in silico tools for prioritising toxicity testing of the low-volume industrial chemicals in REACH. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 115, n. 1, p. 77-87, Jul 2014.

SACKSTEDER, K. A.; PROTOPOPOVA, M.; BARRY, C. E., 3rd; ANDRIES, K. *et al.* Discovery and development of SQ109: a new antitubercular drug with a novel mechanism of action. **Future Microbiol**, 7, n. 7, p. 823-837, Jul 2012.

SAHARAN, V. D.; MAHAJAN, S. S. Development of gallic acid formazans as novel enoyl acyl carrier protein reductase inhibitors for the treatment of tuberculosis. **Bioorg Med Chem Lett**, 27, n. 4, p. 808-815, Feb 15 2017.

SANCHO-VAELLO, E.; ALBESA-JOVÉ, D.; RODRIGO-UNZUETA, A.; GUERIN, M. E. Structural basis of phosphatidyl-myo-inositol mannosides biosynthesis in mycobacteria. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids**, 1862, n. 11, p. 1355-1367, Nov 2017.

SANTHA, T.; NAZARETH, O.; KRISHNAMURTHY, M. S.; BALASUBRAMANIAN, R. *et al.* Treatment of pulmonary tuberculosis with short course chemotherapy in south India--5-year follow up. **Tubercle**, 70, n. 4, p. 229-234, Dec 1989.

SARINK, M. J.; TIELENS, A. G. M.; VERBON, A.; SUTAK, R. *et al.* Inhibition of Fatty Acid Oxidation as a New Target To Treat Primary Amoebic Meningoencephalitis. **Antimicrob Agents Chemother**, 64, n. 8, Jul 22 2020.

SAÚDE, M. d. Manual de Recomendações e Controle da Tuberculose no Brasil. **Ministério da saúde, secretaria de Vigilância em saúde, departamento de Vigilância das doenças transmissíveis**, n. 2 edição, p. 364, 2019.

SAÚDE, M. d. Boletim epidemiológico da Tuberculose 2023. **Secretaria de Vigilância em saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2023/boletim-epidemiologico-de-tuberculose-numero--especial-mar.2023>**. , 2023a, n. Brasília, DF., 2023.

SAXENA, A. K.; ROY, K. K.; SINGH, S.; VISHNOI, S. P. *et al.* Identification and characterisation of small-molecule inhibitors of Rv3097c-encoded lipase (LipY) of Mycobacterium tuberculosis that selectively inhibit growth of bacilli in hypoxia. **Int J Antimicrob Agents**, 42, n. 1, p. 27-35, Jul 2013.

SCHLEIFER, K. H.; KANDLER, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. **Bacteriol Rev**, 36, n. 4, p. 407-477, Dec 1972.

SCHUÉ, M.; MAURIN, D.; DHOUIB, R.; BAKALA N'GOMA, J. C. *et al.* Two cutinase-like proteins secreted by Mycobacterium tuberculosis show very different lipolytic activities reflecting their physiological function. **Faseb j**, 24, n. 6, p. 1893-1903, Jun 2010.

SEELIGER, J. C.; HOLSCLAW, C. M.; SCHELLE, M. W.; BOTYANSZKI, Z. *et al.* Elucidation and chemical modulation of sulfolipid-1 biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. **J Biol Chem**, 287, n. 11, p. 7990-8000, Mar 9 2012.

SEIFERT, M.; CATANZARO, D.; CATANZARO, A.; RODWELL, T. C. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. **PLoS One**, 10, n. 3, p. e0119628, 2015.

SHARMA, D.; DHURIYA, Y. K.; DEO, N.; BISHT, D. Repurposing and Revival of the Drugs: A New Approach to Combat the Drug Resistant Tuberculosis. **Front Microbiol**, 8, p. 2452, 2017.

SHARMA, S.; MOHAN, A. Extrapulmonary tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, 120, n. 4, p. 316, 2004.

SHARMA, S. K.; MOHAN, A. Multidrug-resistant tuberculosis. **Indian J Med Res**, 120, n. 4, p. 354-376, Oct 2004.

SHARMA, S. K.; MOHAN, A. Tuberculosis: From an incurable scourge to a curable disease - journey over a millennium. **Indian J Med Res**, 137, n. 3, p. 455-493, Mar 2013.

SHIN, B. S.; KIM, J. J.; KIM, J.; HU, S. K. *et al.* Oral bioavailability and enterohepatic recirculation of otilonium bromide in rats. **Archives of Pharmacal Research**, 31, n. 1, p. 117-124, 2008/01/01 2008.

SILVA, D. R.; DALCOLMO, M.; TIBERI, S.; ARBEX, M. A. *et al.* New and repurposed drugs to treat multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis. **J Bras Pneumol**, 44, n. 2, p. 153-160, Apr 2018.

SILVA MIRANDA, M.; BREIMAN, A.; ALLAIN, S.; DEKNUYDT, F. *et al.* The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? **Clin Dev Immunol**, 2012, p. 139127, 2012.

SINGH, G.; ARYA, S.; NARANG, D.; JADEJA, D. *et al.* Characterization of an acid inducible lipase Rv3203 from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. **Mol Biol Rep**, 41, n. 1, p. 285-296, Jan 2014.

SLAYDEN, R. A.; BARRY, C. E., 3rd. The role of KasA and KasB in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, 82, n. 4-5, p. 149-160, 2002.

SMITH, H. John Keats: poet, patient, physician. **Rev Infect Dis**, 6, n. 3, p. 390-404, May-Jun 1984.

SOKOLOWSKA, E.; PRESLER, M.; GOYKE, E.; MILCZAREK, R. *et al.* Orlistat Reduces Proliferation and Enhances Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells (PANC-1). **Anticancer Res**, 37, n. 11, p. 6321-6327, Nov 2017.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Prog Med Chem**, 60, p. 273-343, 2021.

STURM, A.; SUN, P.; AVILA-PACHECO, J.; CLATWORTHY, A. E. *et al.* Genetic factors affecting storage and utilization of lipids during dormancy in Mycobacterium tuberculosis. **mBio**, 15, n. 2, p. e0320823, Feb 14 2024.

SUN, H.; XIA, M.; AUSTIN, C. P.; HUANG, R. Paradigm shift in toxicity testing and modeling. **Aaps j**, 14, n. 3, p. 473-480, Sep 2012.

SUN, Z.; ZHANG, Y. Antituberculosis activity of certain antifungal and antihelmintic drugs. **Tubercle and Lung Disease**, 79, n. 5, p. 319-320, 1999/09/01/ 1999.

SUZUKI, T.; OHASHI, Y. Combination effect of antibiotics against bacteria isolated from keratitis using fractional inhibitory concentration index. **Cornea**, 32, n. 7, p. e156-160, Jul 2013.

SWAIN, S. S.; PAIDSETTY, S. K.; PADHY, R. N. Development of antibacterial conjugates using sulfamethoxazole with monocyclic terpenes: A systematic medicinal chemistry based computational approach. **Comput Methods Programs Biomed**, 140, p. 185-194, Mar 2017.

SZUMOWSKI, J. D.; LYNCH, J. B. Profile of delamanid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. **Drug Des Devel Ther**, 9, p. 677-682, 2015.

TANIMOTO, T. T. An elementary mathematical theory of classification and prediction. New York: International Business Machines Corporation 1958.

TE BRAKE, L. H. M.; DE KNEGT, G. J.; DE STEENWINKEL, J. E.; VAN DAM, T. J. P. *et al.* The Role of Efflux Pumps in Tuberculosis Treatment and Their Promise as a Target in Drug Development: Unraveling the Black Box. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 58, p. 271-291, Jan 6 2018.

TIMMINS, G. S.; DERETIC, V. Mechanisms of action of isoniazid. **Mol Microbiol**, 62, n. 5, p. 1220-1227, Dec 2006.

TIMO, G. O.; REIS, R.; MELO, A. F.; COSTA, T. V. L. *et al.* Predictive Power of In Silico Approach to Evaluate Chemicals against M. tuberculosis: A Systematic Review. **Pharmaceuticals (Basel)**, 12, n. 3, Sep 16 2019.

TORRES, J. N.; PAUL, L. V.; RODWELL, T. C.; VICTOR, T. C. *et al.* Novel katG mutations causing isoniazid resistance in clinical M. tuberculosis isolates. **Emerg Microbes Infect**, 4, n. 7, p. e42, Jul 2015.

TOUCHETTE, M. H.; HOLSCLAW, C. M.; PREVITI, M. L.; SOLOMON, V. C. *et al.* The rv1184c locus encodes Chp2, an acyltransferase in Mycobacterium tuberculosis polyacyltrehalose lipid biosynthesis. **J Bacteriol**, 197, n. 1, p. 201-210, Jan 1 2015.

TYRKKÖ, E.; PELANDER, A.; KETOLA, R. A.; OJANPERÄ, I. In silico and in vitro metabolism studies support identification of designer drugs in human urine by liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, 405, n. 21, p. 6697-6709, Aug 2013.

UGUREL, E.; TURGUT-BALIK, D. Synergistic combination of carvedilol, amlodipine, amitriptyline, and antibiotics as an alternative treatment approach for the susceptible and multidrug-resistant A. baumannii infections via drug repurposing. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 42, n. 9, p. 1063-1072, Sep 2023.

UN, U. N. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. 4, p. 568, 2011.

UNISSA, A. N.; SUBBIAN, S.; HANNA, L. E.; SELVAKUMAR, N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution**, 45, p. 474-492, 2016/11/01/ 2016.

VAN DEUN, A.; HOSSAIN, M. A.; GUMUSBOGA, M.; RIEDER, H. L. Ziehl-Neelsen staining: theory and practice. **Int J Tuberc Lung Dis**, 12, n. 1, p. 108-110, Jan 2008.

VAN TYLE, J. H. Ketoconazole. Mechanism of action, spectrum of activity, pharmacokinetics, drug interactions, adverse reactions and therapeutic use. **Pharmacotherapy**, 4, n. 6, p. 343-373, Nov-Dec 1984.

VANDER BEKEN, S.; AL DULAYYMI, J. R.; NAESSENS, T.; KOZA, G. *et al.* Molecular structure of the Mycobacterium tuberculosis virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern. **Eur J Immunol**, 41, n. 2, p. 450-460, Feb 2011.

VANDONGEN, A. M. Drug promiscuity: problems and promises. **bioRxiv**, p. 2023.2012.2029.573633, 2023.

VEDANI, A.; DOBLER, M.; HU, Z.; SMIEŠKO, M. OpenVirtualToxLab--a platform for generating and exchanging in silico toxicity data. **Toxicol Lett**, 232, n. 2, p. 519-532, Jan 22 2015.

VELAYATI, A. A.; FARNIA, P.; MASJEDI, M. R.; IBRAHIM, T. A. *et al.* Totally drug-resistant tuberculosis strains: evidence of adaptation at the cellular level. **European Respiratory Journal**, 34, n. 5, p. 1202-1203, 2009.

VELAYATI, A. A.; MASJEDI, M. R.; FARNIA, P.; TABARSI, P. *et al.* Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. **Chest**, 136, n. 2, p. 420-425, Aug 2009.

VERSCHOOR, J. A.; BAIRD, M. S.; GROOTEN, J. Towards understanding the functional diversity of cell wall mycolic acids of Mycobacterium tuberculosis. **Prog Lipid Res**, 51, n. 4, p. 325-339, Oct 2012.

VILCHÈZE, C. Mycobacterial Cell Wall: A Source of Successful Targets for Old and New Drugs. **Applied Sciences**, 10, n. 7, p. 2278, 2020.

VILCHÈZE, C.; COPELAND, J.; KEISER, T. L.; WEISBROD, T. *et al.* Rational Design of Biosafety Level 2-Approved, Multidrug-Resistant Strains of Mycobacterium tuberculosis through Nutrient Auxotrophy. **mBio**, 9, n. 3, May 29 2018.

VILCHÈZE, C.; JACOBS, W. R., Jr. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium tuberculosis: Genes, Mutations, and Causalities. **Microbiol Spectr**, 2, n. 4, p. Mgm2-0014-2013, Aug 2014.

WADDELL, S. J.; STABLER, R. A.; LAING, K.; KREMER, L. *et al.* The use of microarray analysis to determine the gene expression profiles of Mycobacterium tuberculosis in response to anti-bacterial compounds. **Tuberculosis (Edinb)**, 84, n. 3-4, p. 263-274, 2004.

WANG, D.; ZHU, X.; CUI, C.; DONG, M. *et al.* Discovery of novel acetohydroxyacid synthase inhibitors as active agents against Mycobacterium tuberculosis by virtual screening and bioassay. **J Chem Inf Model**, 53, n. 2, p. 343-353, Feb 25 2013.

WANG, F.; LANGLEY, R.; GULTEN, G.; DOVER, L. G. *et al.* Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. **J Exp Med**, 204, n. 1, p. 73-78, Jan 22 2007.

WANKHADE, G.; HUTKE, V.; WAGHMARE, P. J.; MISRA, A. K. *et al.* Inhibitory effect of isoniazid and orlistat combination on mycobacterial ES-31 serine protease in vitro and on the growth of M.tb bacilli in axenic culture. **Indian J Tuberc**, 59, n. 3, p. 156-161, Jul 2012.

WEI, Y.; TROGER, A.; SPAHIU, V.; PEREKHVATOVA, N. *et al.* The Role of SKQ1 (Visomitin) in Inflammation and Wound Healing of the Ocular Surface. **Ophthalmology and Therapy**, 8, n. 1, p. 63-73, 2019/03/01 2019.

WHO. WHO Report on the TB Epidemic. **WHO TB/94**, 177, 1994.

WHO. Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendations for prevention and control. **Wkly Epidemiol Rec**, 81, n. 45, p. 430-432, Nov 10 2006.

WILLIAMS, J. T.; ABRAMOVITCH, R. B. Molecular Mechanisms of MmpL3 Function and Inhibition. **Microb Drug Resist**, 29, n. 5, p. 190-212, May 2023.

XIAO, X.; LIU, H.; LI, X. Orlistat treatment induces apoptosis and arrests cell cycle in HSC-3 oral cancer cells. **Microb Pathog**, 112, p. 15-19, Nov 2017.

YAMADA, H.; YAMAGUCHI, M.; CHIKAMATSU, K.; AONO, A. *et al.* Structome analysis of virulent Mycobacterium tuberculosis, which survives with only 700 ribosomes per 0.1 fl of cytoplasm. **PLoS One**, 10, n. 1, p. e0117109, 2015.

YANG, S. P.; HO, L. J.; CHENG, S. M.; HSU, Y. L. *et al.* Carvedilol differentially regulates cytokine production from activated human peripheral blood mononuclear cells. **Cardiovasc Drugs Ther**, 18, n. 3, p. 183-188, May 2004.

ZHANG, C.; LIU, J.; SUI, Y.; LIU, S. *et al.* In silico drug repurposing carvedilol and its metabolites against SARS-CoV-2 infection using molecular docking and molecular dynamic simulation approaches. **Sci Rep**, 13, n. 1, p. 21404, Dec 4 2023.

ZHANG, H. Trisodium-[(2-(R)-[(4,4-diphenylcyclohexyl)phosphono-oxymethyl]-diethylenetriaminepentaacetato)(aquo)gadolinium(III): Gadofosveset. *In: Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2004.

ZHI, J.; MELIA, A. T.; EGGERS, H.; JOLY, R. *et al.* Review of limited systemic absorption of orlistat, a lipase inhibitor, in healthy human volunteers. **J Clin Pharmacol**, 35, n. 11, p. 1103-1108, Nov 1995.

ZHI, J.; MELIA, A. T.; FUNK, C.; VIGER-CHOUGNET, A. *et al.* Metabolic profiles of minimally absorbed orlistat in obese/overweight volunteers. **J Clin Pharmacol**, 36, n. 11, p. 1006-1011, Nov 1996.

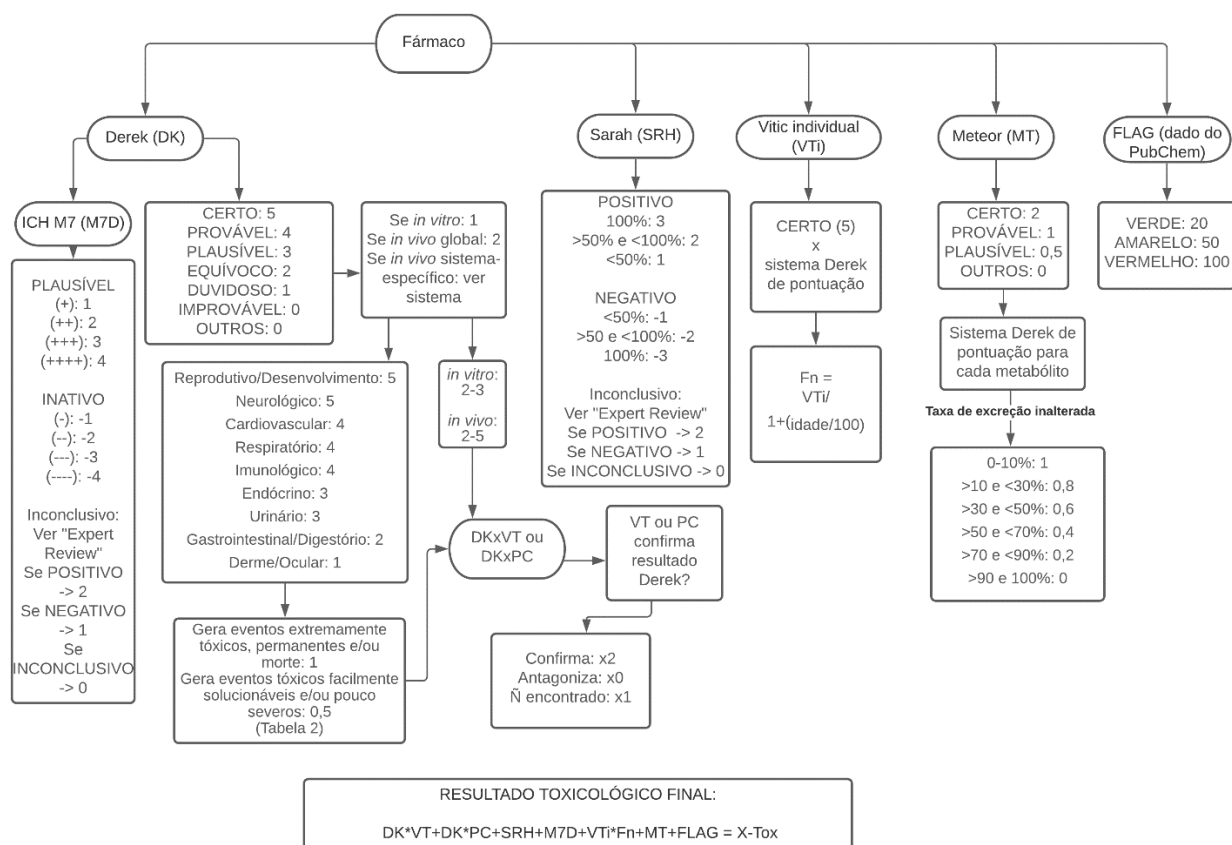
ZHOU, L.; SHE, P.; TAN, F.; LI, S. *et al.* Repurposing Antispasmodic Agent Otilonium Bromide for Treatment of Staphylococcus aureus Infections. **Front Microbiol**, 11, p. 1720, 2020.

ZHOU, W.; ZHANG, J.; YAN, M.; WU, J. *et al.* Orlistat induces ferroptosis-like cell death of lung cancer cells. **Front Med**, 15, n. 6, p. 922-932, Dec 2021.

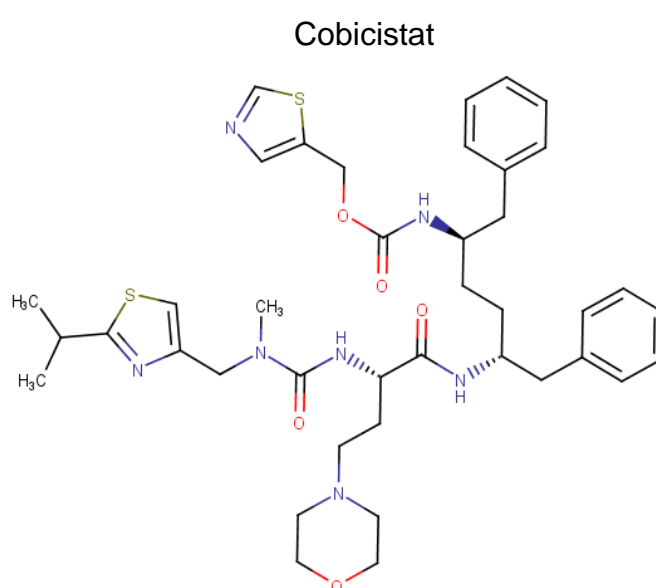
ZIETZ, B. P.; DUNKELBERG, H. The history of the plague and the research on the causative agent *Yersinia pestis*. **Int J Hyg Environ Health**, 207, n. 2, p. 165-178, Feb 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Fluxograma do algoritmo desenvolvido para análise X-Tox.

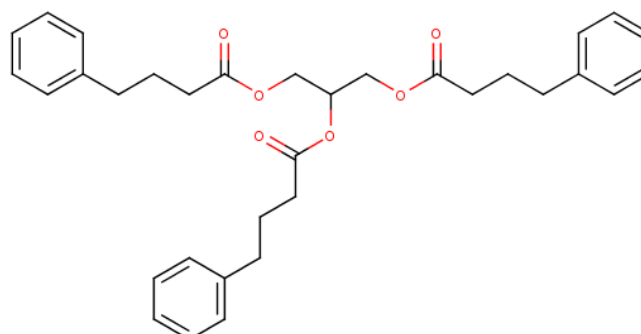


hepatotoxicidade e inibição de canal HERG. O Vitic não apresentou resultado para estes desfechos, já o PubChem apresentou evento toxicológico relacionado à função hepática (icterícia), portanto o *endpoint* de hepatotoxicidade foi multiplicado por 2, mas não encontrou dados sobre inibição de canal HERG (x1). Sarah resultou em negativo com 50% de similaridade (1), M7D inativo (---) (1) e o resultado da predição de metabolismo foi de 7.4, multiplicada por 0, considerando que mais de 90% do fármaco é excretado de forma inalterada (PubChem).



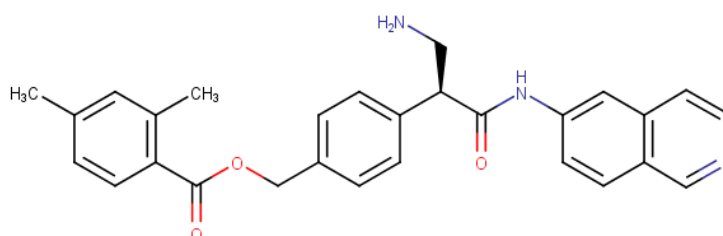
O fenilbutirato de glicerol se trata de um fármaco quelante de nitrogênio, sua estrutura química é um triglicerídeo onde três moléculas de fenilbutirato estão ligadas por um *backbone* de glicerol. Ele é utilizado para o tratamento de distúrbios do ciclo da ureia que não podem ser controlados por dietas com restrição de proteína. O Derek não encontrou nenhum *endpoint* e o Vitic não encontrou nenhuma molécula com 100% de similaridade. Já o PubChem apenas apresentou dados de eventos adversos leves (diarreia, flatulência e cefaleia), portanto, estes foram contabilizados como uma *FLAG* verde (eventos adversos leves que não necessitam de acompanhamento), adicionando-se 20 pontos. A Sarah identificou como negativo com 58% de similaridade (1) e o M7D como (---) (1). O resultado de metabolismo Meteor foi de 1,1, que foi multiplicado por 1, visto que é extensivamente metabolizado e eliminado principalmente como o metabólito PAGN (Fda, 2012).

Fenilbutirato de glicerol



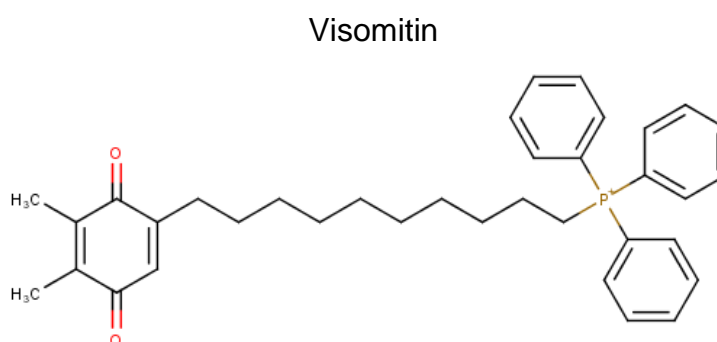
O netarsudil é um fármaco aprovado para o tratamento de glaucoma de ângulo aberto e hipertensão ocular cujo mecanismo de ação é através da inibição de Rho-quinase e de transportadores de norepinefrina, perturbando o fluxo convencional de humor aquoso. O Derek encontrou 1 *endpoint* plausível (inibição de canal HERG) e 1 equívoco (sensitização da pele). O Vitic não identificou nenhuma molécula com 100% de similaridade, e o PubChem não encontrou *endpoints* relacionados ao Derek, portanto, ambos foram mantidos (x1). Em relação à TENDAS (toxicidades evidentes não descritas anteriormente pelo *software*), identificou-se no PubChem toxicidade relacionada a irritação ocular (hiperemia ocular, eritema, lacrimação, visão borrada), classificando-a como uma *FLAG* verde (+20). O resultado Sarah foi negativo com apenas 17% de similaridade (2), M7D inativo (---) (1) e 5 na predição de metabolismo do Meteor, que foi multiplicado por zero, visto que sua absorção sistêmica é insignificante (PubChem).

Netarsudil



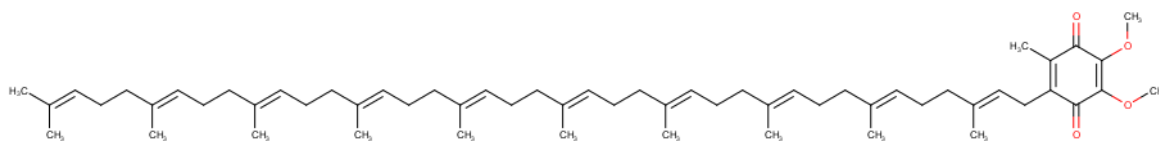
O visomitin é um novo fármaco com atividade antioxidante desenvolvido para o tratamento da síndrome do olho seco e ferimentos oculares, exibindo ação anti-

inflamatória e de cicatrização (Wei; Troger; Spahiu; Perekhvatova *et al.*, 2019). O Derek acionou 5 *endpoints*, 2 plausíveis (dano cromossomal *in vitro* e sensibilização de pele) e 3 equívocos (dano cromossomal *in vivo*, hepatotoxicidade e disfunção mitocondrial). O Vitic não encontrou nenhuma molécula com 100% de similaridade e o PubChem não apresentou dados de toxicidade, portanto, todos os *endpoints* foram mantidos (x1). O *software* Sarah gerou resultado negativo com apenas 37% de similaridade (2), M7D inativo (---) (1) e Meteor resultou em 1,8, entretanto não foram encontrados estudos sobre sua cinética, logo, o resultado Meteor foi mantido.



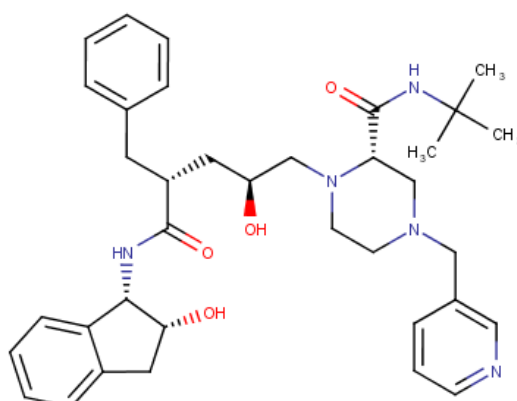
A coenzima Q10 é uma molécula produzida naturalmente pelo nosso organismo e age como um importante transportador de elétrons na membrana mitocondrial envolvido na fosforilação oxidativa, sendo um potente antioxidante. Ela pode ser utilizada tanto como suplementação oral quanto por via tópica na derme. O Derek identificou 4 *endpoints*, 1 plausível (dano cromossomal *in vitro*) e 3 equívocos (dano cromossomal *in vivo*, disfunção mitocondrial e sensibilização de pele). É interessante notar que os *endpoints* gerados pelo Derek estão correlacionados com seu mecanismo de ação antioxidante. O Vitic concluiu apenas que a coenzima Q10 era negativa para toxicidade genética *in vitro* (anulando o *endpoint* plausível). Já o PubChem não encontrou nenhuma informação sobre os outros desfechos, que foram mantidos (x1), mas mostrou que seu uso oral pode gerar desconforto gastrointestinal, recebendo uma *FLAG* verde (+20). A Sarah gerou resultado negativo com 100% de similaridade (0), M7D inativo (---) (1) e Meteor 6,92, que foi multiplicado por 0,4 (>60% é excretado de forma inalterada; PubChem), gerando resultado 2,8.

Coenzima Q10



O indinavir é um antirretroviral inibidor de protease. A inativação desta enzima impede a estruturação das partículas virais e, conseqüentemente, a maturação do vírus. O Derek resultou em 2 *endpoints* plausíveis (agonista de receptor glicocorticoide e inibição de canal HERG) e 3 equívocos (nefrotoxicidade, teratogenicidade e urolitíase). O Vitic não acionou nenhum resultado para esses *endpoints*. Já o PubChem foi capaz de confirmar apenas que a overdose de indinavir pode causar infarto do miocárdio e angina, o que pode estar relacionado com uma potencial inibição do canal HERG (x2). Como nenhuma das bases confirmou nem anulou os outros *endpoints*, estes foram mantidos (x1). Entretanto, tanto a pesquisa do Vitic quanto a do PubChem trouxeram uma nova e mesma informação, que está relacionada à hepatotoxicidade do indinavir. Portanto, o resultado individual Vitic (VTi), calculado conforme item 1.1.1.4 Vitic (item 4), resultou na pontuação 5 que, assim como descrito anteriormente, foi corrigido pelo fator de normalização (Fn) de idade (equação abaixo), considerando que o indinavir foi aprovado pela primeira vez pelo FDA há 25 anos (Merck, 1996). O resultado do PubChem foi inserido na forma de *FLAG* e, como citado anteriormente, a hepatotoxicidade entra como *FLAG* amarela (+50). O resultado Sarah foi negativo com 100% de similaridade (0), M7D inativo (---) (1) e Meteor 5,5, multiplicado por 0,8 (menos de 20% é excretado de forma inalterada; PubChem), resultando em 4,4 pontos.

Indinavir



O carfilzomib se trata de um fármaco antineoplásico utilizado no tratamento de mieloma múltiplo refratário, quando já foram utilizadas outras terapias sem sucesso. A molécula inibe irreversivelmente o proteassoma, um complexo proteico que degrada proteínas e está envolvido com divisão e estresse celular. Como consequência, diminui incidência de metástase e vascularização tecidual e aumenta apoptose de células tumorais. Como esperado para um fármaco antineoplásico, o Derek apresentou 10 *endpoints*, todos classificados como plausíveis (carcinogenicidade, dano cromossomal *in vitro* e *in vivo*, toxicidade de desenvolvimento, mutagenicidade *in vitro* e *in vivo*, inibição de canal HERG, irritação ocular e irritação e sensibilização de pele), e todos, exceto inibição de canal HERG, foram acionados pelo alerta epóxido (um éter cíclico formando anel de três átomos). Contudo, o Vitic apresentou resultado negativo para toxicidade genética *in vitro* (cancelando o *endpoint* de dano cromossomal *in vitro* e mutagenicidade *in vitro*). Já o PubChem não confirmou nem anulou *endpoints* Derek, logo, todos os outros foram mantidos (x1). No entanto, apresentou dados sobre eventos adversos severos como trombocitopenia, neutropenia febril, anemia e potencial hepatotóxico, que necessitam de monitoramento constante, recebendo uma *FLAG* amarela e adicional de 50 pontos. A Sarah trouxe resultado negativo com 100% de similaridade (0), M7D plausível (+++) (3) e os metabólitos Meteor pontuaram 45,44, multiplicados por 1, visto que menos de 1% é excretado inalterado, sendo extensivamente metabolizado (Kortuem; Stewart, 2013).

Carfilzomib

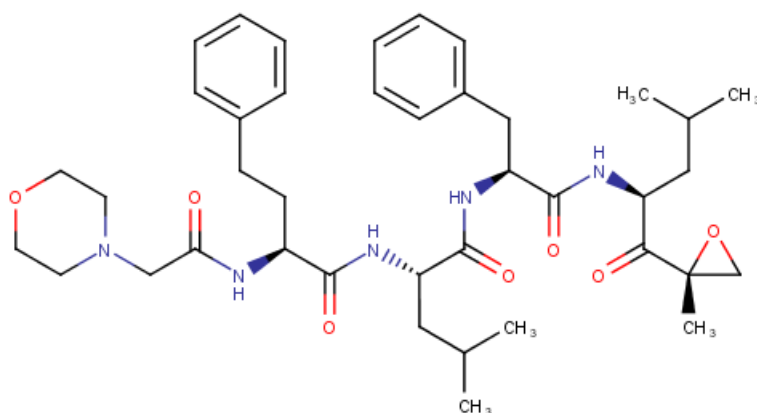


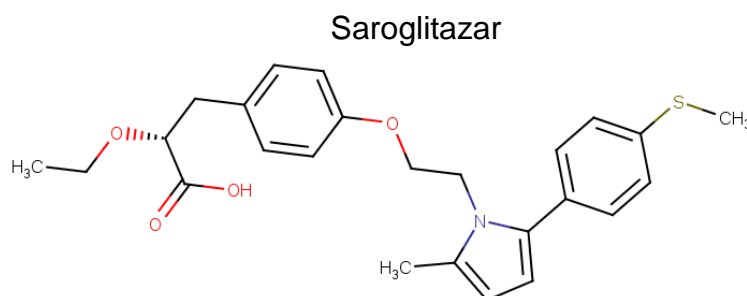
Tabela S1. Aplicação do algoritmo X-Tox para alvo Enoil-ACP-redutase.

Enoil-ACP-redutase							
Fármacos (CHEMPLP score)	DKxVT	SRH	M7D	VTi	MT	FLAG	X-Tox
	+ DKxPC						
Fenilbutirato de glicerol (122,62)	-	1	1	-	1,1	20	23,1 (3 ^o)
Coenzima Q10 (119,36)	26	0	1	0	2,8	20	49,8 (6 ^o)
Netarsudil (111,79)	10	2	1	-	0	20	33 (4 ^o)
Cobicistat (111,38)	15	1	1	0	0	-	17 (2 ^o)
Visomitin (111,13)	36,5	2	1	-	1,8	-	41,3 (5 ^o)
Indinavir (108,57)	38,5	0	1	4	4,4	50	97,9 (7 ^o)
Orlistat (106,98)	10,5	0	3	0	0	-	13,5 (1 ^o)
Carfilzomib (97,37)	117,5	0	3	0	45,4	50	215,9 (8 ^o)

*Legenda: DKxVT – Derek dependente do Vitic; DKxPC – Derek dependente do PubChem; SRH - Sarah; M7D: ICH M7 Derek; VTi - Vitic individual; MT – Meteor; FLAG – avisos vermelhos, amarelos ou verdes. Resultado 0 no VTi significa negativo para os *endpoints* individuais dessa funcionalidade. Resultado (-) no VTi significa que o programa não conseguiu identificar resultado com 100% de similaridade no sistema.

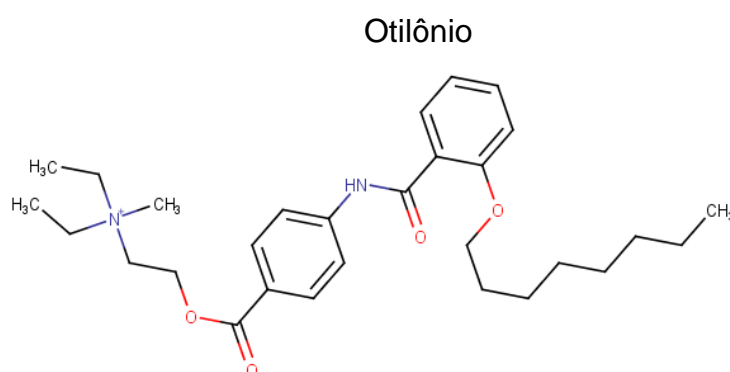
APÊNDICE C – Descrição detalhada da aplicação do algoritmo desenvolvido para fármacos triados para alvo MmpL3.

O saroglitazar é um fármaco que foi inicialmente aprovado por agências regulatórias da Índia em 2013 para tratamento de hipertrigliceridemia e dislipidemia diabética em pacientes diabéticos tipo 2 não controlados por estatinas. No momento, está em processo de investigação pelo FDA nos EUA para tratamento também de hipertrigliceridemia severa, esteatose hepática não alcoólica e colangite biliar primária. Seu mecanismo de ação é a ativação de PPAR α , que diminui níveis plasmáticos de triglicerídeos (TG), estimula lipólise de VLDL e aumenta HDL, e também a ativação de PPAR γ , que aumenta a sensibilidade à insulina e melhora o quadro de resistência insulínica (Patel; Kansagra; Parikh; Parmar *et al.*, 2018). O saroglitazar até o momento não apresentou nenhum *endpoint* no Derek (0), por ser um fármaco relativamente novo, também não foi encontrado pelo Vitic (-) nem obteve resultado de toxicidade inserido no PubChem. Obteve resultado negativo com apenas 34% de similaridade no Sarah (2), resultado inativo (---) no ICH M7 Derek (1) e sofreu metabolismo do Meteor obtendo um resultado de 10.23, porém sua taxa de eliminação inalterada é maior que 90% (Bhatia; Arora; Kaur; Kaul, 2016), tendo este resultado multiplicado por zero.

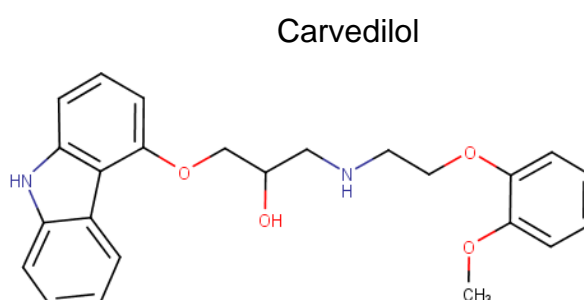


O otilônio é um antiespasmódico derivado de amônia quaternária indicado para tratamento de síndrome do intestino irritável. Ele age por meio do bloqueio de canais dependentes de Ca²⁺ que controlam contração da musculatura lisa do intestino, e também como antagonista de receptor muscarínico M3. Este fármaco acionou 5 *endpoints*, dos quais 3 se tratavam de alerta para sal de amônio quaternário (sensitização – equívoco - e irritação da pele e irritação ocular - plausível), 1 para inibição de canal HERG (plausível) e 1 “em aberto” (*open*) para carcinogenicidade. De acordo com o sistema de pontuação (ver 3.1.1.1 Derek item 3), a probabilidade “em

aberto” não é considerada uma predição positiva, portanto, recebeu pontuação 0. O Vitic não identificou uma molécula com 100% de similaridade (-) e o PubChem não identificou nenhum dos *endpoints* Derek, logo, todos foram multiplicados por 1. A Sarah identificou o composto como negativo com apenas 48% de similaridade (2), M7D inativo (---) (1) e Meteor obteve resultado 6.81, que multiplicado por 0.8 (15% é excretado inalterado na urina (Shin; Kim; Kim; Hu *et al.*, 2008)), gera um score final de 5,4.

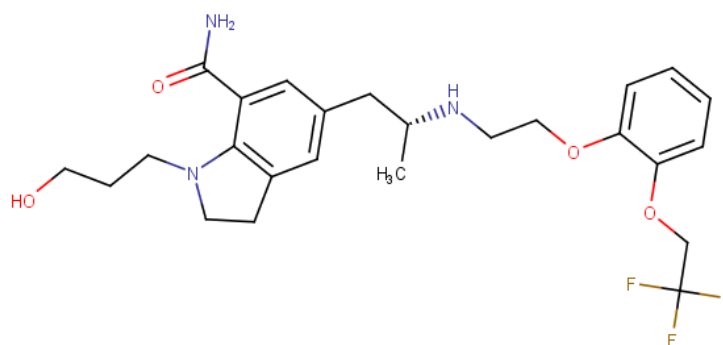


O carvedilol, um antagonista adrenérgico não-seletivo α -1 e β -1 utilizado como anti-hipertensivo, provocou o aparecimento de 5 *endpoints*, 2 plausíveis (carcinogenicidade e inibição de canal HERG) e 3 equívocos (distúrbios da bexiga, urolitíase e bradicardia). O resultado Vitic anulou o *endpoint* de carcinogenicidade (x0) e os resultados do PubChem confirmaram os endpoints de inibição de canal HERG (x2), bradicardia (x2), porém não foram identificados resultados para distúrbios da bexiga, nem urolitíase (x1). A Sarah identificou como negativo para mutagenicidade com 100% de similaridade (0), o M7D como inativo (---) (1) e o Meteor de 7,7 (multiplicado por 1, visto que menos de 2% é excretado inalterado na urina). Entretanto, vale a pena comentar que ambos os *endpoints* de inibição de canal HERG e bradicardia devem ter sido acionados por conta do próprio mecanismo de ação e função do fármaco, e não simplesmente por conta de eventos adversos não esperados.



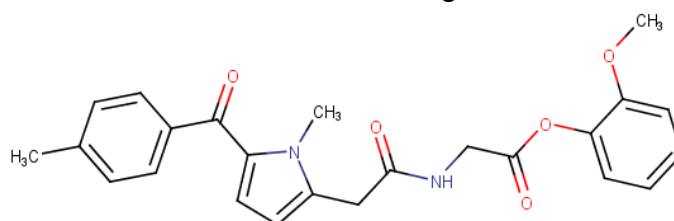
A silodosina, um antagonista adrenérgico α -1, é indicado para o tratamento de sintomas da hiperplasia prostática benigna, pois a inibição deste receptor causa o relaxamento da musculatura lisa, diminui pressão intrauretral e resulta na melhora do fluxo urinário. No Derek, a silodosina originou 2 alertas plausíveis (hepatotoxicidade e inibição de canal HERG) e 1 equívoco (disfunção mitocondrial *in vivo*). No Vitic, não foram geradas informações relacionadas a esses *endpoints* (0), porém no PubChem foi confirmado seu potencial hepatotóxico (x2) e de inibição de canal HERG (x2). Em relação à disfunção mitocondrial não foi encontrado (x1). O resultado Sarah foi negativo com 100% de similaridade (0), M7D inativo (---) (1) e score Meteor de 3.7 (multiplica-se por 1 por ser extensivamente metabolizado pelo fígado; PubChem).

Silodosina



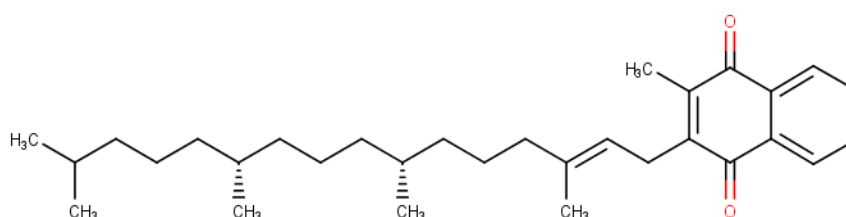
A amtolmetina guacila é um anti-inflamatório não esteroidal, com ações analgésicas, antipiréticas e antiplaquetárias. Ela age bloqueando a síntese de prostaglandinas através da inibição da ciclooxygenase. No Derek, o fármaco acionou 3 *endpoints* plausíveis, carcinogenicidade, fotoalergenicidade e sensibilização da pele. O Vitic não encontrou nenhuma molécula com 100% de similaridade e no PubChem não havia informações sobre os *endpoints*, logo, todos foram mantidos (x1). Sarah identificou o composto como negativo com apenas 27% de similaridade (2), M7D inativo (---) (1) e o metabolismo Meteor gerou pontuação de 20.5, que foi multiplicado por 1 visto que é um fármaco extensivamente metabolizado (Hotha; Dasari; Shaik; Syed *et al.*, 2010).

Amtolmetina guacila



A filoquinona, comumente chamada de vitamina K1, age como um cofator na ativação de fatores de coagulação, sendo importante na homeostase da coagulação sanguínea e é indicada para tratamento de distúrbios da coagulação causada por cumarina, hipotrombinemia secundária à uso de antibióticos, salicilatos, etc. Este fármaco obteve 4 *endpoints* no Derek, sendo 2 plausíveis (dano cromossomal *in vitro* e mutagenicidade *in vitro*) e 2 equívocos (dano cromossomal *in vivo* e disfunção mitocondrial *in vivo*). O Vitic, porém, identificou que a filoquinona é negativa para toxicidade genética *in vitro*, anulando ambas as predições *in vitro* (x0) e a pesquisa do PubChem trouxe o resultado positivo para dano cromossomal *in vivo* (x2), mas nenhuma das bases encontrou informações sobre disfunção mitocondrial (x1). Seguindo, a Sarah gerou resultado negativo para mutagenicidade com 100% de similaridade (0), em contrapartida, o M7D gerou resultado plausível (+++) (3). Por fim, o score Meteor foi de 10,8 que multiplicado por 0,8 (20% excretado de forma inalterada; PubChem), produz a predição de 8,6 pontos.

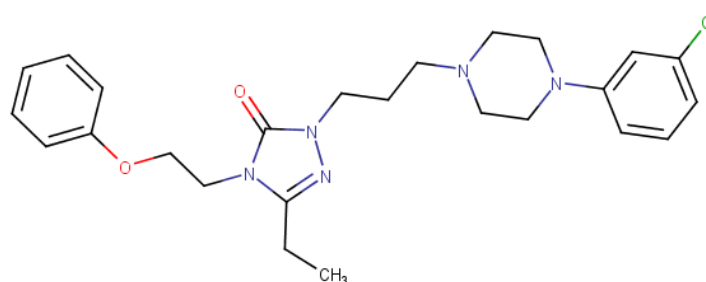
Filoquinona



A nefazodona, um antidepressivo utilizado na terapia da depressão, comportamentos agressivos e ataques de pânico obteve 5 *endpoints* no Derek: 2 plausíveis (modulação de receptor androgênico e inibição de canal HERG) e 3 equívocos (nefrotoxicidade, distúrbios da bexiga e sensibilização da pele). O Vitic não

encontrou nenhum *endpoint* relacionado ao Derek, logo, foi realizada a pesquisa no PubChem. Na base de dados não foi encontrada nenhuma informação sobre as predições Derek, portanto foram todas mantidas (x1). Porém, foi identificada uma toxicidade evidente não determinada anteriormente pelo *software* (TENDA) sobre hepatotoxicidade, que está bem descrita em literatura (PubChem). Conseqüentemente, este fármaco recebeu uma *FLAG* amarela, que diz respeito à eventos adversos de gravidade mediana e precisam de acompanhamento laboratorial e ganhou um adicional de 50 pontos. A Sarah identificou como negativo para mutagenicidade com 100% de similaridade (0), M7D inativo (---) (1), e Meteor 5.6, que foi multiplicado por 1, já que menos de 1% é excretado de forma inalterada na urina, sendo extensivamente metabolizado (PubChem).

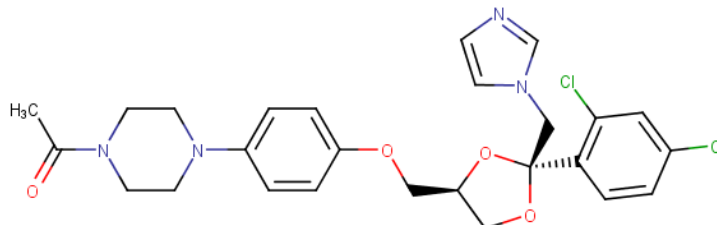
Nefazodona



O cetoconazol é um antifúngico de amplo espectro, capaz de inibir a síntese de ergosterol, componente essencial da parede celular de fungos. O Derek apresentou 6 *endpoints* diferentes, 4 plausíveis (carcinogenicidade, hepatotoxicidade, inibição de canal HERG e fosfolipidose) e 2 equívocos (toxicidade de glândula adrenal e disfunção mitocondrial). O Vitic foi capaz de anular a predição de carcinogenicidade (x0), porém não apresentou outras informações. O PubChem confirmou com dados sobre hepatotoxicidade (x2) e toxicidade de glândula adrenal (x2), porém não apresentou dados sobre os outros *endpoints* (x1). O cetoconazol ainda apresentou uma TENDA sobre oligospermia (baixa na quantidade e qualidade dos espermatozoides), diminuição de libido e impotência, que não são graves, mas dignas de nota, sendo classificadas como *FLAG* verde (+20 pontos). O resultado Sarah como negativo para mutagenicidade com 100% de similaridade (0), M7D (---) (1) e

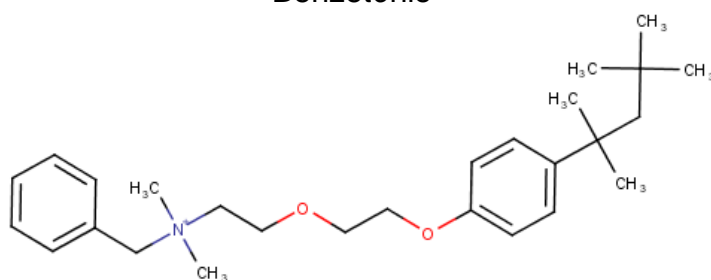
metabolismo Meteor 28.5, multiplicado por 1, considerando que menos de 4% é excretado de forma inalterada na urina (Van Tyle, 1984).

Cetoconazol



O benzetônio é um sal de amônio quaternário com propriedades surfactantes, antissépticas e antimicrobianas. Por conta disto, ele é utilizado como antisséptico em pequenos cortes/arranhões e também em enxaguatórios bucais em concentrações máximas de 0.1-0,2% (Fda, 2016). O Derek identificou 6 *endpoints* para o fármaco, dos quais 3 se tratavam de alerta para sal de amônio quaternário (sensitização – equívoco - e irritação da pele e irritação ocular - plausíveis), que foram confirmados pelo Vitic (x2). O Derek também alertou para carcinogenicidade, que foi anulado pelo Vitic (x0), estrogenicidade e inibição de canal HERG, não encontrados pelo Vitic, nem em literatura (x1). Sarah identificou como negativo para mutagenicidade com 100% de similaridade (0), M7D inativo (---) (1), e Meteor 18.7, porém a absorção percutânea do benzetônio é insignificante e, portanto, estudos farmacocinéticos não foram realizados (multiplica-se por 0; PubChem). Entretanto, um dado de toxicidade obtido pela busca do PubChem foi extremamente importante para a eliminação do benzetônio da lista de fármacos: o benzetônio é tóxico e fatal se ingerido via oral (PubChem), recebendo uma *FLAG* vermelha como impedidor por via de administração, sendo adicionado mais 100 pontos ao *score*, visto que o objetivo do trabalho é o reposicionamento para tratamento de tuberculose. Considerando este fator, o benzetônio foi excluído da lista final de fármacos.

Benzetônio



O salmeterol, um agonista adrenérgico de longa ação e altamente seletivo para receptores β -2, possui ação broncodilatadora e é indicado para asma e doença obstrutiva pulmonar crônica. Ele estimula a conversão de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), e este aumento causa relaxamento da musculatura lisa broncoalveolar e, conseqüentemente, broncodilatação. O Derek acionou dois *endpoints*, um plausível (carcinogenicidade) e um equívoco (sensitização da pele). Tanto o Vitic quanto o PubChem apresentaram dados que comprovassem o *endpoint* de carcinogenicidade (x2), porém não houve informação sobre sensitização da pele (x1). Dentro do PubChem houve também uma TENDA a respeito de eventos cardíacos (angina, taquicardia, arritmia), classicamente produzidos por agonistas β -adrenérgicos, portanto, recebeu uma *FLAG* amarela (+50 pontos), objetivando a monitoração de exames cardíacos. A Sarah identificou como negativo com 100% de similaridade (0), M7D como inativo (---) (1) e os metabólitos do Meteor pontuaram 11,7, que foi multiplicado por 1, visto que menos de 5% é excretado inalterado na urina (PubChem).

Salmeterol

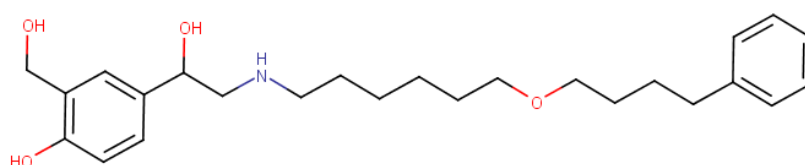


Tabela S2. Aplicação do algoritmo X-Tox para alvo MmpL3.

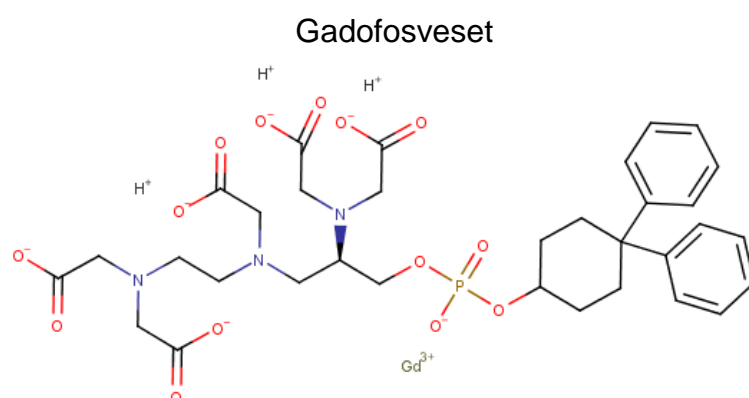
MmpL3							
Fármacos (CHEMPLP score)	DKxVT + DKxPC	SRH	M7D	VTi	MT	FLAG	X-Tox
Filoquinona (132,15)	56	0	3	0	8,6	-	67,6 (6 ^o)
Benzetônio (119,61)	21,5	0	1	0	0	100	122,5 (9 ^o)
Nefazodona (119,44)	20,5	0	1	0	5,6	50	77,1 (7 ^o)
Salmeterol (117,4)	61	0	1	0	11,7	50	123,7 (10 ^o)
Otilônio (116,09)	13	2	1	-	5,4	-	21,4 (2 ^o)
Carvedilol (114,76)	32	0	1	0	7,7	-	40,7 (3 ^o)
Amtolmetina Guacila (113,28)	33	2	1	-	20,5	-	56,5 (5 ^o)
Silodosina (112,11)	40	0	1	0	3,7	-	44,7 (4 ^o)
Saroglitazar (111,72)	0	2	1	-	0	-	3 (1 ^o)
Cetoconazol (111,26)	49	0	1	0	28,5	20	98,5 (8 ^o)

*Legenda: DKxVT – Derek dependente do Vitic; DKxPC – Derek dependente do PubChem; SRH - Sarah; M7D: ICH M7 Derek; VTi - Vitic individual; MT – Meteor; FLAG – avisos vermelhos, amarelos ou verdes. Resultado 0 no VTi significa negativo para os *endpoints* individuais dessa funcionalidade. Resultado (-) no VTi significa que o programa não conseguiu identificar resultado com 100% de similaridade no sistema.

APÊNDICE D – Descrição detalhada da aplicação do algoritmo desenvolvido para fármacos triados para alvo RNA-polimerase.

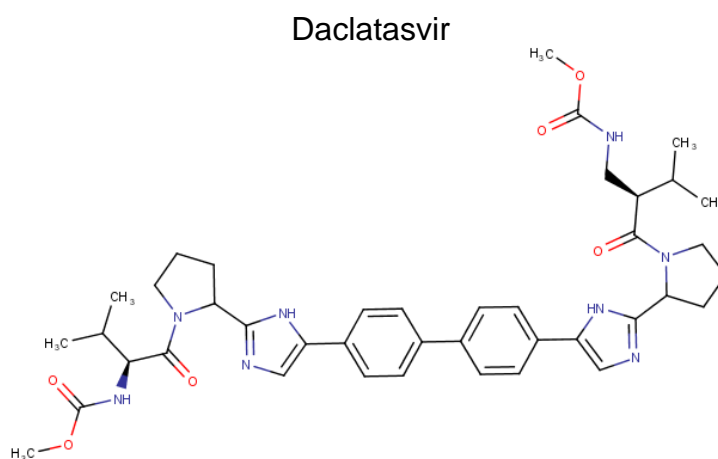
O gadofosveset é um agente de contraste que possui um átomo de gadolínio (Gd^{3+}) na sua estrutura e é utilizado para realização de ressonância magnética. O composto se liga de forma reversível à albumina plasmática, auxiliando na visualização de vasos sanguíneos e posterior diagnóstico de enfermidades. Inicialmente, o Derek não obteve resultado porque havia estruturas não classificadas, descrito como “*contains unclassified features*” do glossário, o Vitic não encontrou informações, a Sarah identificou como fora de domínio ou “*outside domain*” (acordando com o Derek) e o M7D como inativo (--). Utilizando o *software* MarvinSketch 20.21, nós retiramos o Gd^{3+} e o H^+ da molécula objetivando testar novos resultados no Nexus. Por fim, o único resultado obtido pelo Derek foi plausível para hepatotoxicidade. Mesmo sem os dois átomos citados, o Vitic não encontrou nenhuma molécula com 100% de similaridade e o PubChem não trouxe resultados sobre toxicidade, sendo mantido o resultado hepatotóxico (x1). A Sarah resultou em negativo com apenas 41% de similaridade (2), M7D negativo (---) (1). O Meteor não foi capaz de prever metabolismo para o fármaco, o que está de acordo com dados que mostraram que o gadofosveset é eliminado inalterado na urina (Zhang, 2004).

Visto que o potencial toxicológico do gadofosveset completo não foi identificado pelo *software*, ele foi eliminado da lista.



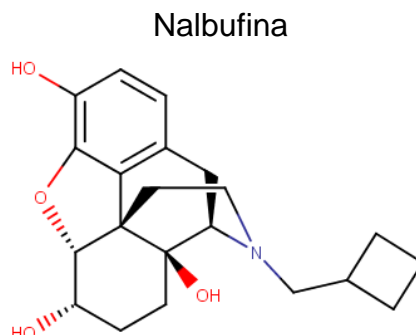
O daclatasvir é um fármaco inibidor da proteína não estrutural 5A (NS5A), que faz parte do complexo de replicação do vírus da hepatite C, impedindo tanto a sua estruturação quanto a replicação viral. O único *endpoint* apontado pelo Derek foi

plausível para hepatotoxicidade e o Vitic não acusou nada. Já de acordo com o PubChem, dados de toxicidade hepática foram relatados (x2), porém é frisado que este evento adverso é dificilmente correlacionado com o uso específico do daclatasvir. Primeiramente porque este não é utilizado como monoterapia, portanto o evento pode estar relacionado com outros mais tóxicos da farmacoterapia de hepatite C. Segundo, é comum que a hepatotoxicidade ocorra em pacientes com cirrose preexistente e coinfeção pelo vírus da hepatite B, logo, é complexo afirmar que o daclatasvir seja o responsável pelo evento. Ainda assim, mantivemos o resultado multiplicado por 2. A Sarah identificou como negativo para mutagenicidade com 51% de similaridade (1), o M7D como inativo (---) (1) e o Meteor pontuou 3,14, que foi multiplicado por 0,4 visto que aproximadamente 60% é excretado de forma inalterada (PubChem).



A nalbufina se trata de um fármaco que possui ação tanto agonista quanto antagonista opioide. Ela se liga a receptores kappa (κ) do sistema nervoso central, inibindo a liberação de neurotransmissores que mediam dor, e também antagonizam receptores mu (μ), produzindo menos depressão respiratória quando comparada com outros opioides. Desse modo, é utilizada como analgésico recomendado para dor moderada à severa. O Derek acusou 1 *endpoint* plausível (teratogenicidade) e 1 equívoco (inibição de canal HERG). O Vitic identificou a nalbufina como negativo para carcinogenicidade e toxicidade genética *in vivo*, porém nenhuma informação relacionada aos *endpoints* Derek. De forma semelhante, o PubChem também não apresentou dados expressivos sobre toxicidade, apenas que a overdose pode causar sono e disforia, não sendo contabilizados. Portanto, ambos os *endpoints* Derek foram mantidos (x1). A Sarah proveu resultado negativo para mutagenicidade com 100% de

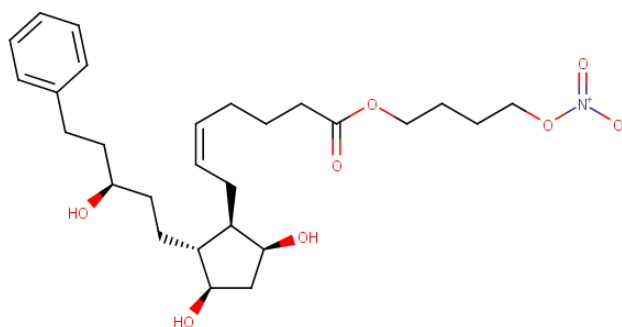
similaridade (0), M7D inativo (---) (1) e predição metabólica Meteor 4.1, multiplicada por 1, considerando que menos de 10% é excretado de forma inalterada (Errick; Heel, 1983).



A coenzima Q10 foi abordada anteriormente pois também mostrou potencial de inibição da Enoil-ACP-redutase. Desse modo, seus resultados no *software* Nexus se mantêm.

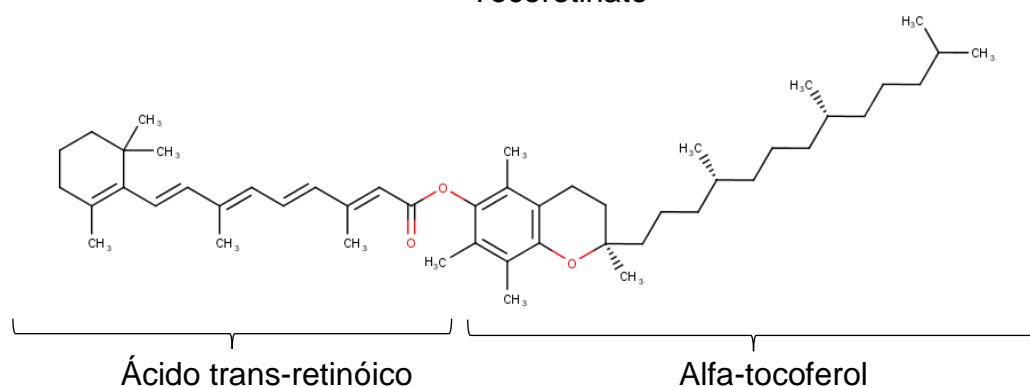
O latanoprosteno é um novo pro-fármaco para uso tópico ocular cuja atividade depende da formação dos metabólitos latanoprostá ácido (análogo de prostaglandina F2 α) e óxido nítrico (NO), que possui função de vasodilatação. Ele foi sintetizado para tratamento de glaucoma de ângulo aberto e hipertensão ocular, pois promovem o escoamento do humor aquoso e relaxamento dos músculos do olho. O Derek apontou 2 *endpoints*, 1 plausível (agonista de receptor glicocorticoide) e 1 equívoco (teratogenicidade). O Vitic não apresentou resultado relativo ao Derek, porém apresentou um resultado individual (VTi) para sensibilização da pele (2,5 pontos), que foi ajustado para o fator de normalização (Fn) de idade (Fda, 2017), resultando em 2,4. O PubChem demonstrou que não há estudos em humanos para segurança do fármaco durante gravidez, porém, considerando que a prostaglandina F2 α é responsável pela contração uterina e indução do parto, é possível que possua efeitos abortivos ou de desenvolvimento. No entanto, como não houve informações sobre ambos os *endpoints*, estes foram mantidos (1x). Os eventos adversos relatados pelo PubChem foram apenas de pigmentação da íris, hiperemia, irritação ocular e dor local, recendo *FLAG* verde e adicional de 20 pontos.

Latanoprosteno



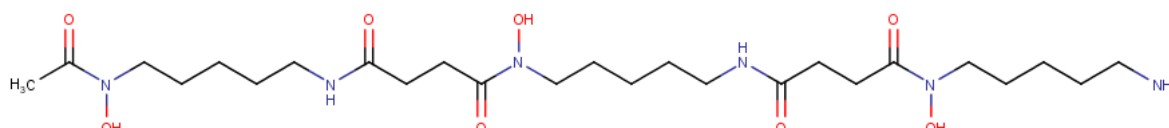
O tocoretinato é um éster alfa-tocoferol (vitamina E) do ácido trans-retinóico (vitamina A ácida). Este composto promove cicatrização tecidual e diferenciação granulocítica, sendo indicado para tratamento de úlceras, escaras e queimaduras. Além disso, já foi visto que o fármaco induz diferenciação granulocítica também em células leucêmicas e inibe sua proliferação celular. A substância acionou 5 *endpoints* no Derek, destes 3 plausíveis (sensitização da pele, hepatotoxicidade e teratogenicidade) e 2 equívocos (carcinogenicidade e fototoxicidade). O Vitic não foi capaz de encontrar molécula com 100% de similaridade e o PubChem não trouxe informações a respeito dos *endpoints* citados, portanto, todos foram mantidos (x1). Entretanto, este é um composto formulado para utilização tópica e ensaios realizados com sua administração por outras vias (oral, subcutânea, intravenoso, intraperitoneal) relatados no PubChem, demonstraram seu potencial de causar diarreia, hipermotilidade intestinal, distúrbios no fígado, rins, bexiga, ureter, hematúria e alteração no peso do timo, logo, foi considerado *FLAG* amarela (+50). A Sarah identificou como negativo para mutagenicidade com apenas 34% de similaridade (2), M7D inativo (---) (1) e Meteor resultou em 21,45 pontos, multiplicados por 0,4, obtendo resultado de 8,7, já que aproximadamente 60% do fármaco é excretado inalterado (Nakazawa; Kuroda; Arai; Nakahara *et al.*, 1992).

Tocoretinato



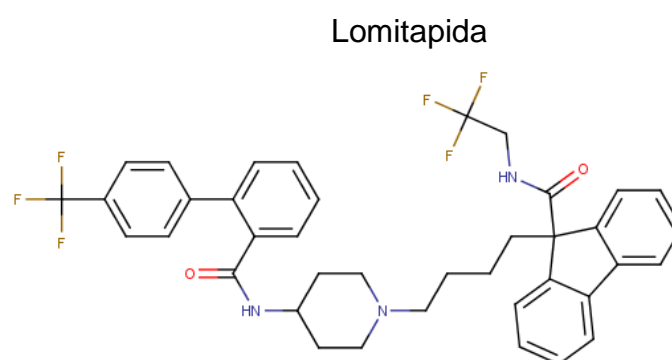
A deferoxamina se trata de um fármaco quelante de ferro (Fe), retirando Fe livre da circulação sanguínea, ou seja, da ferritina e hemossiderina. É utilizado em pacientes pós transfusão sanguínea que apresentem excesso de Fe na circulação. O Derek apresentou apenas 1 *endpoint* plausível para sensibilização da pele, que não foi encontrado pelo Vitic, porém confirmado pelo PubChem (x2). O Vitic, no entanto, encontrou estudo relatando positividade para toxicidade genética *in vitro* (+10 pontos), que foi ajustado pelo fator de normalização de idade do fármaco, que foi aprovado pela primeira vez pelo FDA em 1968, há 53 anos (Fda, 1968), resultando na pontuação 6,5. O PubChem apresentou TENDAs relacionadas a nefrotoxicidade, ototoxicidade, toxicidade ocular e potencial anafilático após uso prolongado, portanto recebeu *FLAG* vermelha (+100 pontos). O resultado Sarah foi negativo com apenas 48% de similaridade (2), M7D inativo (---) (1) e Meteor não foi capaz de metabolizar a molécula, o que entra de acordo com estudo demonstrando que a deferoxamina é eliminada praticamente inalterada pela urina de forma complexada com Fe (Porter, 2001).

Deferoxamina



A lomitapida é um fármaco inibidor da proteína de transferência de triglicerídeos microssômicos (MTP), que se trata de uma enzima localizada no lúmen do retículo

endoplasmático. É responsável pela transferência de triglicerídeos para a apolipoproteína B (apo-B) na síntese de VLDL. O bloqueio da MTP inibe a transferência de triglicerídeos para apo-B, resultando na redução de colesterol. Portanto, é uma substância utilizada para tratamento de casos severos de hipercolesterolemia familiar. O Derek identificou 1 *endpoint* plausível (inibição de canal HERG) e 1 equívoco (fototoxicidade). O Vitic não identificou nenhuma molécula com 100% de similaridade, e o PubChem não encontrou dados sobre os desfechos (1x). No entanto, trouxe TENDAs relacionadas a um potencial teratogênico, hepatotoxicidade e distúrbios do TGI, sendo adicionada uma *FLAG* vermelha (+100 pontos). O *score* Sarah foi de 2 (negativo com apenas 28% de similaridade) e M7D de 1 (negativo ---). O resultado de metabolismo Meteor foi de 2, multiplicado por 0,8, visto que aproximadamente 15% é excretado inalterado (Berberich; Hegele, 2017), resultando em 1,6 pontos.



O venetoclax é um fármaco inibidor da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Esta proteína costuma estar aumentada em determinados cânceres, e estão associados com a sobrevivência e resistência de células tumorais. Desse modo, o venetoclax é utilizado para tratamento de leucemia linfocítica crônica (LLC) refratária, induzindo apoptose de células que possuem alta concentração de Bcl-2. O Derek apresentou 11 *endpoints* possíveis, sendo 8 plausíveis (hiperplasia urotelial da bexiga, carcinogenicidade, hepatotoxicidade, inibição de canal HERG, mutagenicidade *in vitro*, fototoxicidade, toxicidade ocular e toxicidade de tireoide) e 3 equívocos (dano cromossomal *in vitro* e *in vivo* e mutagenicidade *in vivo*). O Vitic proveu resultado negativo para genotoxicidade *in vitro*, cancelando os *endpoints* de mutagenicidade e dano cromossomal *in vitro* (x0). O PubChem confirmou o *endpoint* de

hepatotoxicidade (x2) e anulou o de dano cromossomal *in vivo* (x0). Por fim, ainda apresentou potencial teratogênico e de toxicidade testicular, sendo classificado como *FLAG* vermelha e recebendo adicional de 100 pontos. O resultado Sarah foi negativo com 100% de similaridade (0), M7D plausível (+++) (3) e metabolismo Meteor 22, multiplicado por 0,8 (20% é excretado inalterado; PubChem), resultando em 17,6 pontos.

Venetoclax

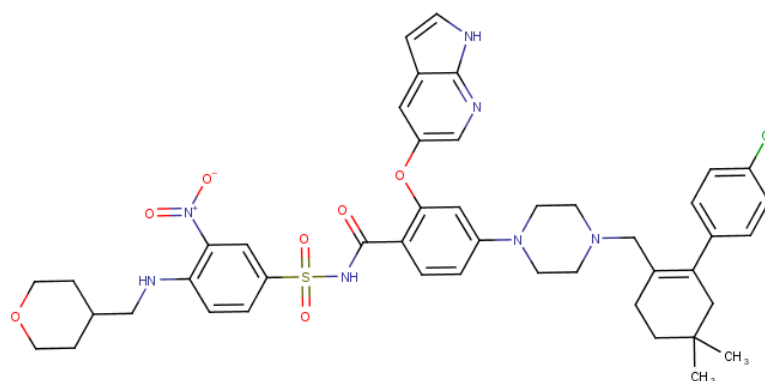


Tabela S3. Aplicação do algoritmo X-Tox para alvo RNA-polimerase.

RNA-polimerase							
Fármacos (CHEMPLP score)	DKxVT + DKxPC	SRH	M7D	VTi	MT	FLAG	X-Tox
Coenzima Q10 (104,52)	26	0	1	0	2,8	20	49,8 (4 ^o)
Tocoretinato (88,56)	40,5	2	1	-	8,7	50	102,2 (6 ^o)
Deferoxamina (86,63)	3	2	1	6,5	-	100	112,5 (7 ^o)
Venetoclax (85,22)	75,5	0	3	0	17,6	100	196,1 (9 ^o)
Nalbufina (84,29)	21	0	1	0	4,1	-	26,1 (3 ^o)
Gadofosveset Sem H+ e Gd+ (77,65)	3	2	1	-	-	-	6 (1 ^o)
Latanoprosteno (75,66)	14,5	1	1	2,4	14,8	20	53,7 (5 ^o)
Daclatasvir (74,65)	6	1	1	0	1,3	-	9,3 (2 ^o)
Lomitapida (73,47)	10	2	1	-	1,6	100	114,6 (8 ^o)

*Legenda: DKxVT – Derek dependente do Vitic; DKxPC – Derek dependente do PubChem; SRH - Sarah; M7D: ICH M7 Derek; VTi - Vitic individual; MT – Meteor; FLAG – avisos vermelhos, amarelos ou verdes. Resultado 0 no VTi significa negativo para os *endpoints* individuais dessa funcionalidade. Resultado (-) no VTi significa que o programa não conseguiu identificar resultado com 100% de similaridade no sistema.

APÊNDICE E – Links externos para acesso a planilhas de dados extraídos do *software* Lhasa Nexus Suite (v.2.3.1) e planilha de dados utilizados no processo de validação do algoritmo X-Tox.

[Planilha da análise Meteor para alvo RNA-polimerase](#)

[Planilha da análise Meteor para alvo Enoil-ACP-redutase](#)

[Planilha da análise Meteor para o alvo MmpL3](#)

[Planilha de dados DL50, NOAEL, Margem Terapêutica e IARC](#)