

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR**

**VALNÊS DA SILVA RODRIGUES JUNIOR**

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DOS COMPOSTOS  
IQG-607 E IQG-639 EM UM MODELO DE TUBERCULOSE EM  
CAMUNDONGOS**

Porto Alegre, 2012

**VALNÊS DA SILVA RODRIGUES JUNIOR**

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DOS COMPOSTOS  
IQG-607 E IQG-639 EM UM MODELO DE TUBERCULOSE EM  
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada como requisito para a  
obtenção do grau de Doutor pelo Programa  
de Pós-Graduação em Medicina e Ciências  
da Saúde da Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul

Orientadora: **Profa. Dra. Maria Martha Campos**

Co-Orientador: **Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos**

Porto Alegre, 2012

**VALNÊS DA SILVA RODRIGUES JUNIOR**

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DOS COMPOSTOS  
IQG-607 E IQG-639 EM UM MODELO DE TUBERCULOSE EM  
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada como requisito para a  
obtenção do grau de Doutor pelo Programa  
de Pós-Graduação em Medicina e Ciências  
da Saúde da Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul

Aprovada em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

Dr. Afrânio Kritski - UFRJ

\_\_\_\_\_  
Dr. José Carlos Saraiva Gonçalves - UFRJ

\_\_\_\_\_  
Dr. Fernanda Bueno Morrone - PUCRS

\_\_\_\_\_  
Dr. Maurício Reis Bogo - PUCRS

\_\_\_\_\_  
Dr. Osmar Norberto de Souza – PUCRS (Suplente)

\_\_\_\_\_  
Porto Alegre, 2012

Dedico esta tese aos meus pais,  
Dilza e Valnês,  
por todo o amor, carinho e dedicação.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Professora Maria Martha Campos, por ter me acompanhado incansavelmente em todas as etapas deste trabalho, pela confiança, pelo auxílio e ensinamentos constantes, e pela revisão do manuscrito e desta tese;

Ao meu co-orientador, Professor Diógenes Santiago Santos, pela confiança depositada e por todo o apoio, fundamental no andamento deste trabalho;

Ao Professor Luiz Augusto Basso, pelos ensinamentos, por auxiliar na revisão do manuscrito e pela disponibilidade constante em ajudar;

À Professora Fernanda Bueno Morrone, por ter, gentilmente, me acompanhado durante o período de estágio de docência, pelas inúmeras lições e aprendizado dentro da sala de aula;

Aos Professores Silvia Dias de Oliveira, Paulo Pitrez e Carlos César Fritscher, pela participação na banca da qualificação do Doutorado e por todas as sugestões;

Aos colegas e amigos do CPBMF/INCT-TB e da 4G P&D, pela amizade, companheirismo, e por ter ajudado, de alguma forma, na realização deste trabalho;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia Aplicado e do Instituto de Toxicologia e Farmacologia, pela amizade, pelo carinho e pela acolhida;

Aos queridos amigos André dos Santos Junior, Anne Drumond Villela, Jacqueline Rehm, Natália Nicoletti, Thiago Milech de Assunção e Zilpa Adriana Quitian, com quem tive o prazer de trabalhar estreitamente durante o Doutorado;

A todos os meus amigos e familiares pelas sinceras demonstrações de apoio e carinho;

Ao BNDES, FINEP, FAPERGS, CNPq e CAPES, pelo financiamento, fundamental para a realização e continuação deste projeto.

*“All our science, measured against reality, is primitive and childlike - and yet, is the most precious thing we have.”*

*“Toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”*

Albert Einstein

## RESUMO

A tuberculose é uma das principais causas de morte no mundo. O surgimento e disseminação de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a fármacos, os efeitos indesejáveis dos fármacos atualmente disponíveis e a falta de adesão dos pacientes ao tratamento têm aumentado a necessidade do desenvolvimento de novos agentes anti-tuberculose. Estudos prévios revelaram uma potente atividade inibitória *in vitro* de dois compostos pentaciano(isoniazida)ferrato(II), denominados IQG-607 e IQG-639, frente a enzima enoil-ACP redutase de *M. tuberculosis*. Ainda, o IQG-607 e o IQG-639 foram ativos quando testados em culturas de *M. tuberculosis* H37Rv e sobre dois isolados clínicos resistentes à isoniazida *in vitro*. Neste trabalho, a atividade destes dois compostos foi avaliada *in vivo*, utilizando um modelo murino de infecção por *M. tuberculosis*. Camundongos suíços foram infectados com a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv e o IQG-607 ou o IQG-639 (250 mg/kg) foram administrados aos animais durante 28 ou 56 dias. Adicionalmente, um estudo de dose-resposta foi realizado com o composto IQG-607, empregando as doses de 5, 10, 25, 50, 100, 200 e 250 mg/kg. As atividades dos compostos-teste foram comparadas à atividade da isoniazida (25 mg/kg), o controle positivo do tratamento. Após 28 ou 56 dias de tratamento, tanto o IQG-607 quanto a isoniazida reduziram significativamente a esplenomegalia induzida pela infecção e, também, diminuíram as unidades formadoras de colônia, tanto nos pulmões quanto nos baços dos animais tratados. O IQG-607 e a isoniazida melhoraram o aspecto macroscópico dos pulmões, reduzindo as lesões pulmonares de maneira semelhante. Por sua vez, o IQG-639 não foi capaz de modificar significativamente nenhum parâmetro avaliado neste estudo. O IQG-607 não apresentou um perfil clássico de dose dependência, sendo observada atividade inibitória significativa similar, entre as doses de 10 mg/kg e 250 mg/kg. Além disto, um experimento utilizando um “controle pré-tratamento” demonstrou que o IQG-607 possui atividade bactericida no nosso modelo. A atividade satisfatória do IQG-607 em camundongos infectados com *M. tuberculosis* sugere que este composto pode ser um candidato promissor no desenvolvimento clínico de um novo agente antimicobacteriano.

## ABSTRACT

Tuberculosis continues to be one of the deadliest diseases in the world. The emergence of drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*, the unbearable side effects of the available drugs and the frequent patient non-compliance in completing the therapy have increased the need for development of new effective agents. We have previously demonstrated a potent *in vitro* inhibitory activity for two pentacyano(isoniazid)ferrate(II) compounds, namely IQG-607 and IQG-639 against the *M. tuberculosis* enoyl-ACP reductase enzyme. Importantly, IQG-607 and IQG-639 were active against cultures of *M. tuberculosis* H37Rv and two isoniazid-resistant clinical isolates *in vitro*. In the present study, the activity of these compounds was evaluated by using an *in vivo* murine model of tuberculosis. Swiss mice were infected with *M. tuberculosis* H37Rv strain, and IQG-607 and IQG-639 (250 mg/kg) were administered during 28 or 56 days. As well, a dose-response study was performed with IQG-607 (at 5, 10, 25, 50, 100, 200 and 250 mg/kg). The activity of test compounds was compared with that of the positive control drug isoniazid at 25 mg/kg. After 28 or 56 days of treatment, either IQG-607 or isoniazid significantly reduced *M. tuberculosis*-induced splenomegaly, and also significantly diminished the colony-forming units in both spleens and lungs. IQG-607 or isoniazid ameliorated the lung macroscopic aspect, reducing the lung lesions to a similar extent. However, IQG-639 was not capable of significantly modifying any evaluated parameter. IQG-607 did not display a classical dose-dependent profile in our murine model of tuberculosis, and 10 mg/kg was the lowest dose able to show significant activity, which was similar to the inhibition observed for higher doses. In addition, experiments using early and late controls of infection revealed a bactericidal activity for IQG-607 in our model. The promising activity of IQG-607 in *M. tuberculosis*-infected mice suggests that this compound might represent a good candidate for clinical development as a new antimycobacterial agent.



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACC: sequência dos nucleotídeos adenina, citosina e citosina
- AGC: sequência dos nucleotídeos adenina, guanina e citosina
- C(-15)T: substituição da Cisteína da posição - 15 da região promotora por uma Treonina
- CEUA: Comitê de Ética para o Uso de Animais
- CPBMF: Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional
- DNA: ácido desoxirribonucléico, do inglês *deoxiribonucleic acid*
- DOTS: tratamento de curto prazo diretamente observado, do inglês *directed observed treatment, short-course*
- HIV: síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês *human immunodeficiency virus*
- I16T: substituição da Isoleucina da posição 16 por uma Treonina
- I21V: substituição da Isoleucina da posição 21 por uma Valina
- I47T: substituição da Isoleucina da posição 47 por uma Treonina
- I95P: substituição da Isoleucina da posição 95 por uma Prolina
- INCT-TB: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose
- INH: isoniazida ou hidrazina do ácido isonicotínico
- inhA*: gene codificante da enzima enoil-ACP-CoA redutase de *Mycobacterium tuberculosis*
- InhA: enzima enoil-ACP-CoA redutase de *Mycobacterium tuberculosis*
- katG*: gene codificante da enzima peroxidase-catalase de *Mycobacterium tuberculosis*
- KatG: enzima peroxidase-catalase de *Mycobacterium tuberculosis*

MDR-TB: tuberculose resistente a múltiplas drogas, do inglês *multi drug-resistant tuberculosis*

MT: grupo de camundongos infectados com *M. tuberculosis* e não tratados

NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida

OADC: ácido oléico, albumina, dextrose, catalase

OMS: Organização Mundial da Saúde

PUCRS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RIF: rifampicina

*rpoB*: gene codificante da subunidade  $\beta$  da enzima RNA polimerase de *Mycobacterium tuberculosis*

S315T: substituição da Serina da posição 315 por uma Treonina

S94A: substituição da Serina da posição 94 por uma Alanina

SEM: erro padrão da média, do inglês *standard error of the mean*

TB: tuberculose

TecnoPUC: Parque Tecnológico da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

TDR-TB: tuberculose totalmente resistente a drogas, do inglês *totally drug-resistant tuberculosis*

UFC: unidades formadoras de colônia

XDR-TB: tuberculose extensivamente resistente a drogas, do inglês *extensively drug-resistant tuberculosis*

# SUMÁRIO

## Capítulo 1

<b>Introdução</b> .....	02
A tuberculose humana .....	02
Epidemiologia da tuberculose .....	03
Cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistentes a fármacos.....	05
Tratamento da tuberculose .....	07
Desenvolvimento de drogas anti-tuberculose .....	09
A parede celular micobacteriana.....	11
A isoniazida e seu mecanismo de ação .....	12
Mecanismos de resistência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> à isoniazida .....	14
IQG-607 e IQG-639 como possíveis agentes anti-micobacterianos . .....	16
<b>Justificativa</b> .....	<b>19</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>20</b>

## Capítulo 2

<b>Metodologia</b> .....	<b>22</b>
Animais .....	22
Compostos químicos.....	22
O inóculo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	23
Modelo de infecção por <i>M. tuberculosis</i> em camundongos.....	24

Protocolos de tratamento .....	24
Avaliação da eficácia após tratamento.....	25
Investigação do efeito bactericida ou bacteriostático do IQG-607 ....	
.....	26
Análise estatística .....	27

### Capítulo 3

<b>Resultados .....</b>	<b>29</b>
Validação do modelo murino de infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv .....	29
Avaliação da atividade do IQG-607 e IQG-639 após 28 dias de tratamento .....	31
Avaliação da atividade do IQG-607 e IQG-639 após 56 dias de tratamento .....	34
Avaliação da atividade de diferentes doses de IQG-607 .....	37
Investigação do efeito bactericida ou bacteriostático do IQG-607.....	
.....	40

### Capítulo 4

<b>Discussão.....</b>	<b>43</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>48</b>
<b>Referências.....</b>	<b>50</b>

## **Anexos**

<b>Anexo A:</b> Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais, PUC-RS.....	56
<b>Anexo B:</b> O manuscrito intitulado “Activity of IQG-607, a New Orally Active Compound in a Murine Model of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Infection”, contendo os resultados apresentados na Tese de Doutorado, foi aceito para publicação no periódico <i>International Journal of Antimicrobial Agents</i> .....	58
<b>Anexo C:</b> Participação em outro trabalho durante o período de doutoramento. O manuscrito, intitulado “Optimization of Intercalating Dye-Based Discrimination of Viable <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in Real-Time PCR-Assisted Absolute Quantification of DNA from Sputum”, foi submetido ao periódico <i>Journal of Clinical Microbiology</i> .....	85
<b>Anexo D:</b> Participação em outro trabalho durante o período de doutoramento. O manuscrito, intitulado “Implication of Purinergic P2X7 Receptor in <i>M. tuberculosis</i> Infection and Host Interaction Mechanisms: a Mouse Model Study”, foi submetido ao periódico <i>Immunobiology</i> .....	87
<b>Anexo E:</b> Participação em outro trabalho durante o período de doutoramento. O manuscrito, intitulado “Protective Effects of Resveratrol on Hepatotoxicity Induced by Isoniazid and Rifampicin via SIRT1 Modulation”, foi submetido ao periódico <i>Toxicology and Applied Pharmacology</i> .....	89

---

# Capítulo 1

---

Introdução

---

Justificativa

---

Objetivos

---

# Introdução

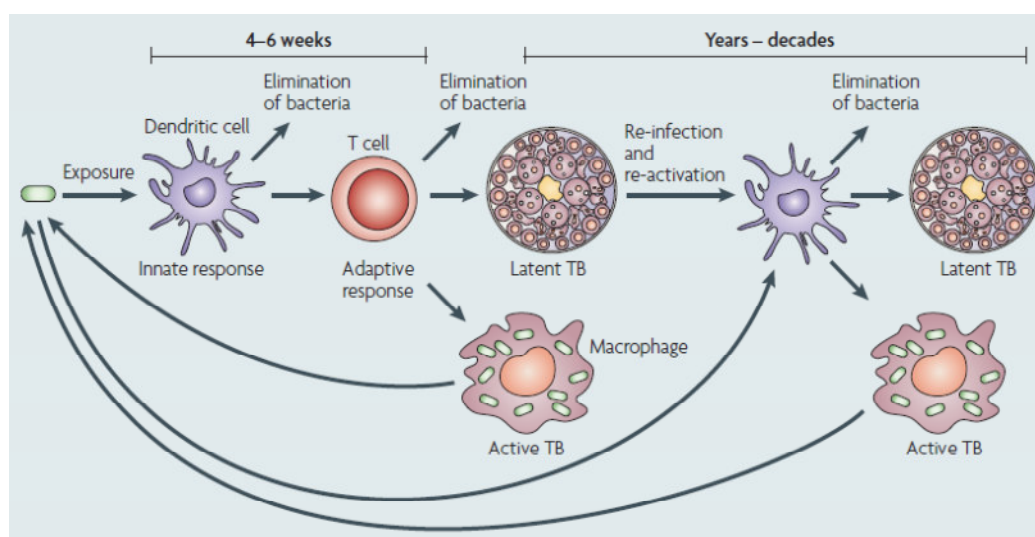
## A tuberculose humana

A tuberculose (TB) humana é uma doença infecto-contagiosa causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, uma bactéria aeróbia de crescimento lento, que causa infecção usualmente nos pulmões (Ducati et al., 2006). A TB foi responsável por milhões de mortes no passado, quando não existia tratamento adequado para a doença e se desconhecia seu agente causal. No século XIX, a TB apresentou-se como uma doença avassaladora, com altas taxas de transmissão e que levava a um número de mortes muito elevado. Esta época corresponde ao início da revolução industrial, onde houve o surgimento dos aglomerados urbanos, muitas vezes sem estruturas de higiene e habitação, o que colaborava para a disseminação e o estabelecimento de inúmeras doenças, dentre elas a TB (Ducati et al., 2006).

Somente em 1882, o médico e bacteriologista alemão Robert Koch tornou pública a identificação do *M. tuberculosis* como agente etiológico da TB, durante o IV Congresso Mundial de TB (Kaufmann, 2003). O *M. tuberculosis* é geralmente transmitido entre os indivíduos por aerossóis que contêm o bacilo. Essas pequenas gotículas podem permanecer por longos períodos de tempo em ambientes fechados. Quando inalada, a micobactéria é fagocitada pelos macrófagos alveolares nos bronquíolos respiratórios e nos alvéolos. O bacilo inalado poderá ou não estabelecer a infecção e isso dependerá da virulência bacteriana, da capacidade bactericida dos macrófagos e do sistema imune do indivíduo infectado (**Figura 1**; Young et al., 2008). Sob condições normais, a infecção é combatida pelo sistema imune do hospedeiro e, em 90 % dos indivíduos infectados, a infecção não progride para a doença ativa (Russell, 2001).

O *M. tuberculosis* tem sido apontado como o patógeno de maior sucesso no planeta de todos os tempos, conseguindo permanecer latente até que as defesas do hospedeiro sejam diminuídas como no caso da infecção pelo HIV e por imunossupressão por fármacos. Com o aumento no número de infectados com o HIV, torna-se preocupante o número de hospedeiros

ativamente contaminados e capazes de transmitir a doença (Manabe e Bishai, 2000).



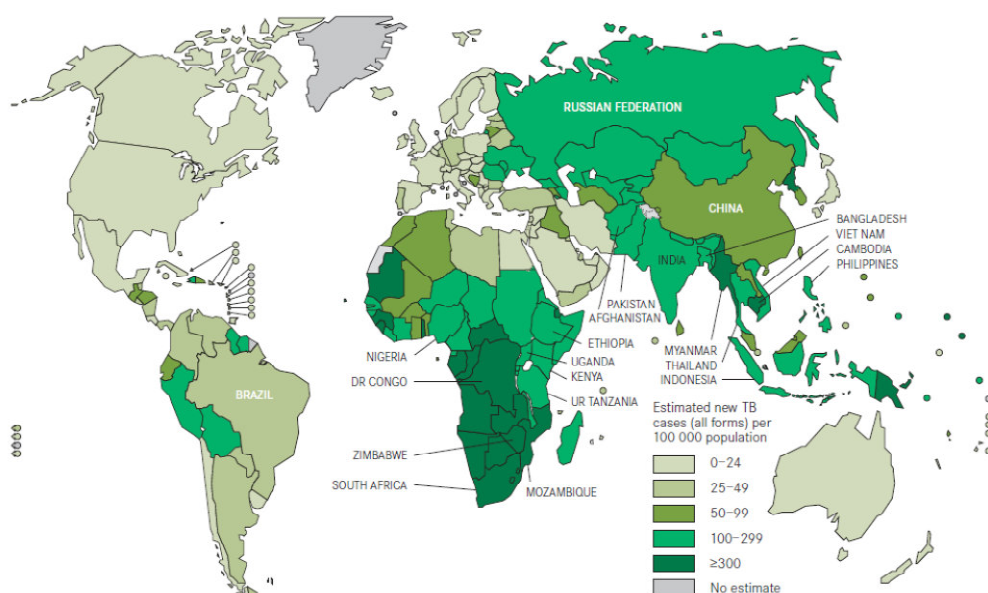
**Figura 1:** O *M. tuberculosis*, transmitido através de aerossóis, é ingerido por macrófagos alveolares ou células dendríticas, efetores importantes para o controle da infecção. O padrão de resposta do organismo frente à bactéria vai determinar o desenvolvimento da doença na forma latente ou ativa, ou casos de re-infecção ou re-ativação após anos ou, até mesmo, décadas (extraído de Young et al., 2008).

## Epidemiologia da tuberculose

Dados epidemiológicos, do ano de 2010, reportados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam a incidência de 128 casos de TB a cada 100.000 pessoas, e estima-se a ocorrência de 8,8 milhões de novos casos no mundo, levando 1,45 milhões dos pacientes a óbito (1,1 milhão de mortes em pacientes HIV negativos e mais 0,35 milhões de mortes em pacientes com TB associada ao HIV). Em 2010, a maioria dos casos de TB ocorreu na Ásia (59 %) e na África (26 %). Os 22 países com os maiores números absolutos de casos de TB contabilizam 81 % de todos os casos estimados em todo o mundo. Dentre estes 22 países, está o Brasil que, em 2008, ocupava a 14ª posição na lista destes países. Os cinco países com os maiores números de incidência da doença, em 2010, foram Índia, China, África do Sul, Indonésia e Paquistão. A Índia e a China contabilizam 38 % de todos os casos de TB no mundo e a Índia, sozinha, 26 % (**Figura 2**; WHO, 2011).



A epidemia do HIV, iniciada nos anos 80, levou a uma elevação nos casos de TB e a uma maior mortalidade em muitos países, que persistiu pelos anos 90 e nos primeiros anos desta década, especialmente nos países do leste e sul da África. Pacientes co-infectados com TB e HIV possuem até 34 vezes mais propensão de desenvolver a TB ativa comparados aos indivíduos HIV negativos. Dos 8,8 milhões de casos incidentes em 2010, 1,1 milhão (13 %) foram entre pessoas infectadas também com o HIV. Foi estimado que, em 2009, 14 milhões de crianças menores de 15 anos ficaram órfãs devido à morte de seus pais por conta de TB/HIV (3,1 milhões devido a casos de co-infecção e 6,5 milhões devido à TB entre pessoas HIV negativas) em todo o mundo (WHO, 2011).

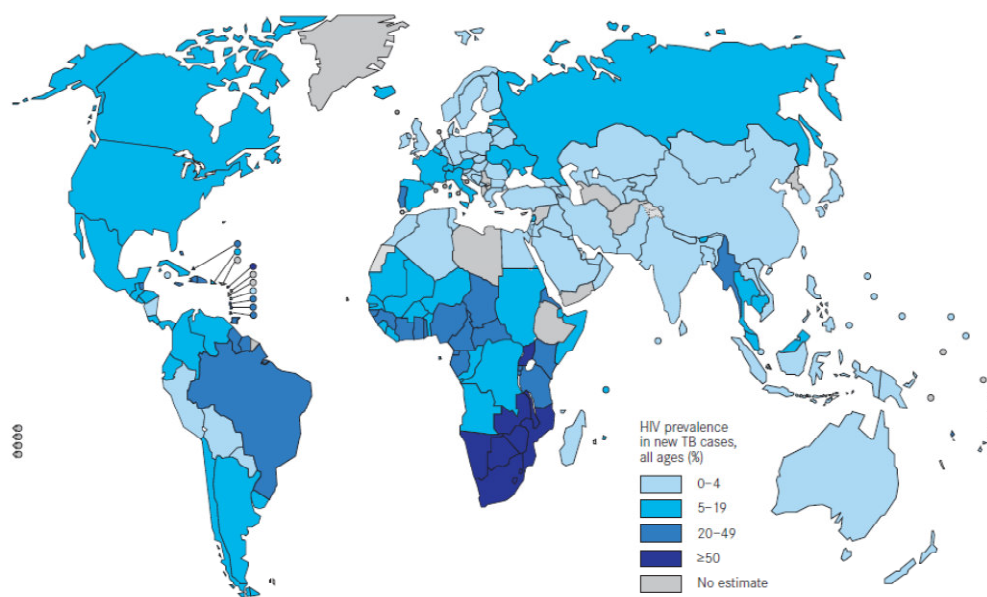


**Figura 2.** Mapa mundial mostrando as taxas de incidência de novos casos de TB, em 2010, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (extraído de WHO, 2011).

Segundo dados do ano de 2010, a proporção de casos de TB co-infectados com HIV é mais alta nos países da África, que contabilizam 82 % do total de casos de co-infecção por TB e HIV. Estima-se que, naquele continente, 900 mil (39 %) dos 2,3 milhões de pessoas que desenvolveram TB em 2010 eram HIV positivas. As taxas de co-infecção de TB e HIV no

continente africano estão na faixa de 8 a 82 %, e na região das Américas, aproximadamente 17 % (**Figura 3**; WHO, 2011).

Embora exista a disponibilidade de tratamento eficaz por décadas, a TB continua sendo um grande problema de saúde mundial. Em 1993, a OMS declarou a TB como uma emergência de saúde pública mundial, na época em que ocorriam de 1,3 a 1,6 milhões de mortes devido a esta doença, a cada ano. Dados da OMS apontam a TB como a segunda principal causa de morte devido a um único agente infeccioso em todo o mundo, estando atrás apenas do HIV (que causou cerca de 1,8 milhões de mortes em 2008). O *M. tuberculosis* é, portanto, a principal causa de morte devido a um único agente bacteriano (WHO, 2011).



**Figura 3:** Mapa mundial mostrando as estimativas de prevalência de co-infecção com o HIV entre os novos casos de TB, em 2010, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (extraído de WHO, 2011).

### **Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a fármacos**

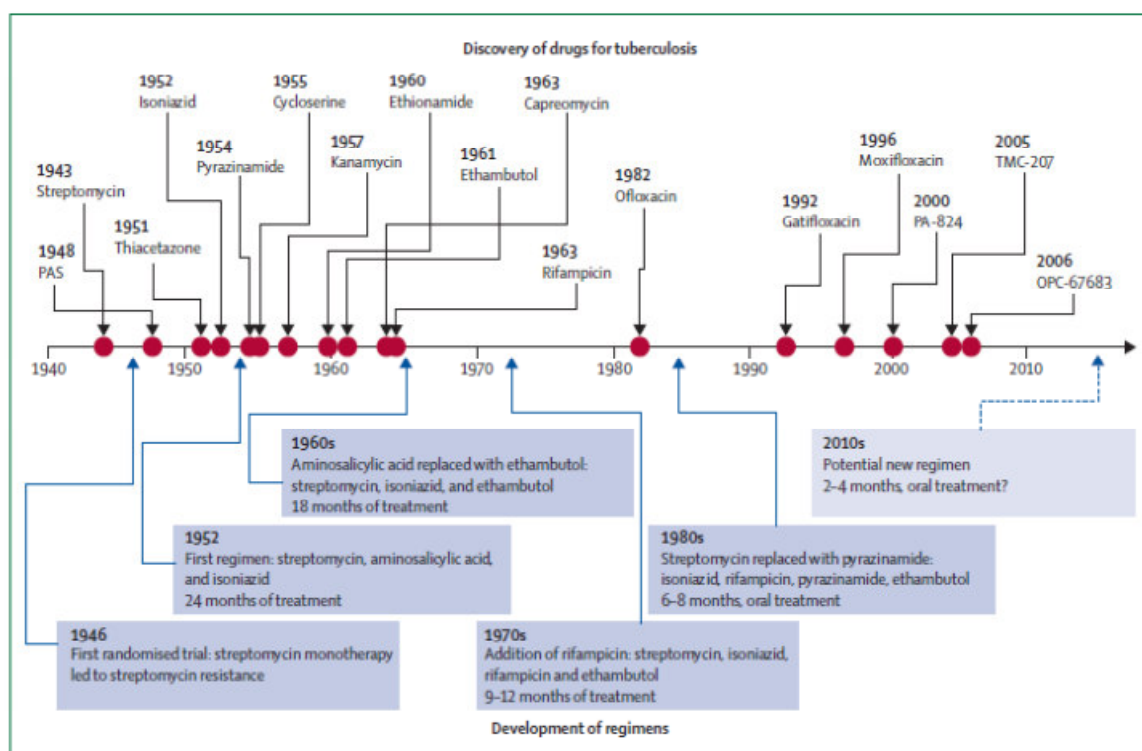
Regimes de tratamento inapropriados e a não adesão dos pacientes ao tratamento são comumente associados à emergência de cepas de *M.*

*tuberculosis* resistentes a múltiplas drogas (MDR-TB), cujos isolados são resistentes a pelo menos isoniazida (INH) e rifampicina (RIF), dois dos principais fármacos usados no tratamento padrão da TB, preconizado pela OMS (Duncan, 2003, Basso e Blanchard, 1998). Pacientes com MDR-TB devem ser tratados com uma combinação de fármacos de segunda linha que, além de serem significativamente mais caros, possuem mais efeitos tóxicos e são menos efetivos que os fármacos de primeira linha (O'Brien e Nunn, 2001). No ano de 2010, foram estimados 650 mil casos de MDR-TB entre os 12 milhões de casos prevalentes desta doença. Entretanto, pacientes adicionados nos tratamentos para MDR-TB representam apenas 16 % dos casos de MDR-TB estimados. Além disto, está disponível apenas uma pequena parcela dos resultados dos tratamentos dos casos de MDR-TB. Os números de casos de TB testados para MDR-TB, diagnosticados como tal e tratados com sucesso estão muito aquém das metas estabelecidas no Plano Global para controlar a TB. Na maioria dos países, menos de 5 % dos pacientes com TB são testados para MDR-TB (WHO, 2011).

Ainda mais preocupante é o surgimento das cepas de *M. tuberculosis* extensivamente resistentes (XDR-TB), definidas como casos de TB cujos isolados são resistentes à INH, RIF e a pelo menos três das seis principais classes de fármacos de segunda linha (aminoglicosídeos, polipeptídeos, fluoroquinolonas, tiamidas, ciclosserina e ácido p-aminosalicílico) (Dorman e Chaisson, 2007). XDR-TB está sendo relatada em todo o mundo, inclusive nos Estados Unidos, onde a TB estava sendo considerada sob controle. Além das cepas MDR-TB e XDR-TB, uma nova linhagem de *M. tuberculosis* foi identificada em 2009 e denominada TDR-TB, ou seja, uma cepa totalmente resistente aos fármacos de primeira e segunda linha, atualmente disponíveis para tratar a TB. Esta perigosa forma do bacilo contém a parede celular ainda mais espessa do que o comumente observado e tem sido relatada, com preocupação, em países como Irã e Índia (Velayati et al., 2009b, Velayati et al., 2009a, Udwadia et al., 2011, Loewenberg, 2012). O pouco êxito na terapia e a ocorrência já difundida destas cepas resistentes levam a discussões sobre a drástica situação de casos de TB virtualmente incuráveis e aponta para a necessidade urgente de se introduzir novos fármacos anti-TB mais eficazes (Dorman e Chaisson, 2007, Duncan, 2003).

## Tratamento da tuberculose

Os fármacos anti-TB usados como tratamento de primeira linha foram desenvolvidos há cerca de 50 anos atrás (**Figura 4**; Ma et al., 2010). O regime recomendado atualmente pela OMS para casos de TB susceptíveis a drogas é eficaz, com altas taxas de cura em pacientes HIV negativos. O tratamento usando as combinações de drogas anti-TB desenvolvidas nos anos 1940 e 1950 reduziram as taxas de mortalidade dramaticamente. Em estudos clínicos, as taxas de cura estão acima de 90 % e a taxa de sucesso entre casos de TB pulmonar, reportada pela OMS, alcançou 87 % em 2009 (WHO, 2011). No entanto, isto implica em seis meses de tratamento com os fármacos de primeira linha. Atualmente, o tratamento recomendado pela OMS é denominado “Directed Observed Treatment, Short-Course” (DOTS), que consiste na administração combinada dos fármacos INH, RIF, pirazinamida e etambutol durante dois meses. O tratamento deve prosseguir por mais quatro meses, quando se administra INH e RIF.



**Figura 4:** Histórico da descoberta de fármacos e do desenvolvimento de regimes de tratamento para a tuberculose (extraído de Ma et al., 2010).

Apesar de amplamente empregados, os fármacos usados no tratamento da TB estão associados a efeitos adversos e interações medicamentosas importantes e que podem estar relacionados ao abandono e à falha da terapia. Neuropatias periféricas e hepatite são as reações adversas mais comuns à INH. Os efeitos hepatotóxicos relacionados à administração de pirazinamida são raros, mas, algumas vezes, fatais. A reação adversa mais comum relacionada ao uso do etambutol é a neuropatia ocular, que pode ser irreversível. A RIF, por sua vez, pode estar associada a reações imunológicas bastante graves (Aouam et al., 2007).

Além disto, a RIF está associada a um grande número de interações medicamentosas importantes. Este fármaco é um potente indutor do sistema hepático citocromo P450, alterando, desta maneira, o metabolismo de vários outros fármacos, como os agentes hipoglicemiantes orais, anticoagulantes orais, antidepressivos, ácido valpróico, digoxina, enalapril, agentes bloqueadores beta-adrenérgicos, contraceptivos, corticosteróides, dentre outros (Arbex et al., 2010). Significativamente, nos casos de co-infecção de TB com HIV, existem interações entre a RIF e alguns fármacos usados na terapia anti-retroviral. A RIF provoca a redução da biodisponibilidade de alguns anti-retrovirais, especialmente alguns inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa e inibidores de proteases. Além disto, a RIF está associada à potencialização dos efeitos hepatotóxicos da INH, possivelmente por facilitar a produção dos metabólitos tóxicos da INH (hidrazina e monoacetilhidrazina), relacionados à patogênese da necrose hepática (Aouam et al., 2007, Arbex et al., 2010). Estes eventos tóxicos, associados ao fato de que alguns países não conseguem implementar o DOTS para a totalidade dos seus pacientes, reforçam a hipótese de que tratamentos mais curtos, com menores efeitos colaterais e interações medicamentosas minimizadas melhorariam a adesão do paciente à terapia, levando a uma maior eficácia no tratamento e uma diminuição de cepas resistentes (Duncan, 2003, Aouam et al., 2007).

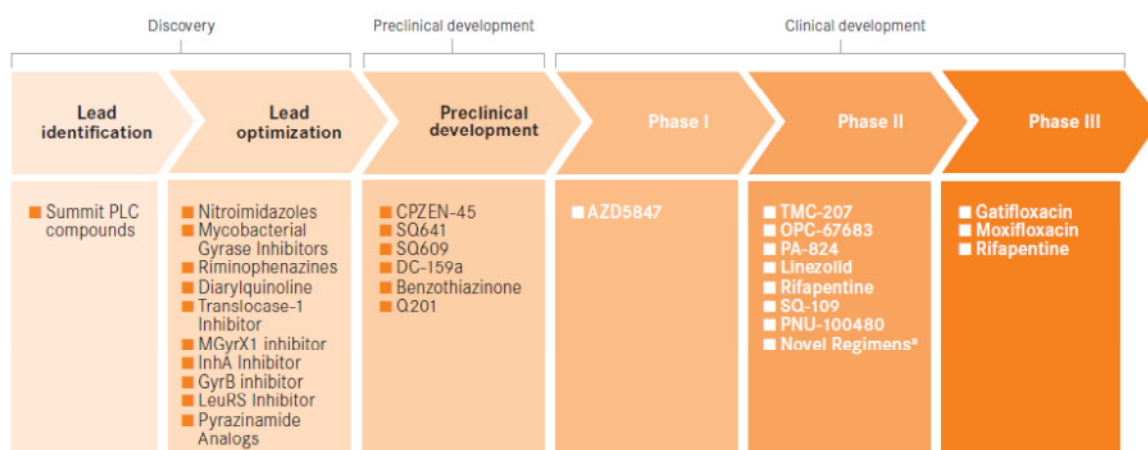
Os regimes recomendados para tratar casos de MDR-TB requerem pelo menos 20 meses de tratamento com fármacos de segunda linha, que estão associados a múltiplos (e algumas vezes sérios) efeitos adversos e a

taxas de cura mais baixas (geralmente entre 60 e 75 %) (WHO, 2011). Novas drogas são necessárias para diminuir e simplificar o tratamento, melhorar a eficácia e a tolerabilidade do tratamento anti-MDR-TB e para melhorar o tratamento simultâneo da TB e HIV, nos casos de co-infecção. Novas drogas poderiam também ajudar a tratar a infecção latente em pessoas sem a TB ativa; atualmente, a terapia preventiva usualmente consiste em seis a nove meses de monoterapia com INH (WHO, 2011, Koul et al., 2011).

Estima-se que entre 1995 e 2010, 55 milhões de pacientes com TB foram tratados em programas que adotaram o DOTS, e 46 milhões obtiveram sucesso no tratamento. Estes tratamentos salvaram quase 7 milhões de vidas. Apesar destes resultados positivos, esforços no diagnóstico e desenvolvimento de drogas eficazes contra cepas de *M. tuberculosis* resistentes continuam sendo prioridades (WHO, 2011).

### **Desenvolvimento de fármacos anti-tuberculose**

Pela primeira vez nos últimos 40 anos, existem 10 novos compostos ou drogas reposicionadas em investigação clínica (**Figura 5**; Dover e Coxon, 2011, Koul et al., 2011, WHO, 2011), com potencial de se tornarem novos fármacos para tratar a TB nos próximos anos, com a finalidade de diminuir o período de tratamento da TB causada por cepas susceptíveis e de melhorar o tratamento da doença quando causada por cepas resistentes. Uma delas está em teste de Fase I (investigação de segurança), 7 estão em Fase II (atividade bactericida e conversão da cultura do escarro) e 3 estão em Fase III (eficácia). Os resultados de três ensaios de Fase III durante regimes de 4 meses contra TB causada por bactérias susceptíveis são esperados entre 2012 e 2013, e resultados de dois estudos de Fase II de novas drogas para o tratamento de MDR-TB são esperados para 2012. Dois dos compostos que estão em teste de Fase II se encontram em estágios avançados para serem testados para o tratamento de MDR-TB (WHO, 2011, Ma et al., 2010).



**Figura 5:** Compostos com possível atividade anti-tuberculose que estão sendo testados nas fases de desenvolvimento pré-clínico e clínico, além das fases de identificação e otimização de moléculas líderes (extraído de WHO, 2011).

Estes avanços no desenvolvimento de drogas para tratar a TB sugerem que serão necessários estudos multicêntricos em vários países com grande número de casos de TB, como o Brasil. Estes estudos enfrentam muitos desafios, já que são demorados e onerosos e, os pacientes precisam ser seguidos durante um período de tempo prolongado, após completar a terapia. São, ainda, necessárias pessoas capacitadas e infra-estrutura para realizar este tipo de estudos de acordo com padrões internacionais requeridos (WHO, 2011).

A re-emergência da TB como um problema de saúde mundial, a grande susceptibilidade à doença de pessoas infectadas com o HIV, a proliferação de cepas MDR, XDR e, mais recentemente, TDR-TB e a necessidade de tratamentos mais curtos contra a doença criaram a necessidade urgente do desenvolvimento de terapias anti-TB inovadoras (Koul et al., 2011). Entretanto, existem atualmente poucos compostos com possível atividade antimicobacteriana em fase pré-clínica de investigação (**Figura 5**; Ma et al., 2010). Já que inibidores enzimáticos correspondem a aproximadamente 25 % dos fármacos comercializadas nos Estados Unidos

(Robertson, 2007), é importante considerar as enzimas como alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos.

Idealmente, novas drogas anti-TB deveriam ser efetivas contra as cepas resistentes, diminuir o longo período de tratamento, aumentando a adesão dos pacientes à quimioterapia, diminuir a frequência de doses e, ainda, possuir mínimas interações medicamentosas (especialmente com os fármacos anti-retrovirais) e baixo perfil de toxicidade (Koul et al., 2011).

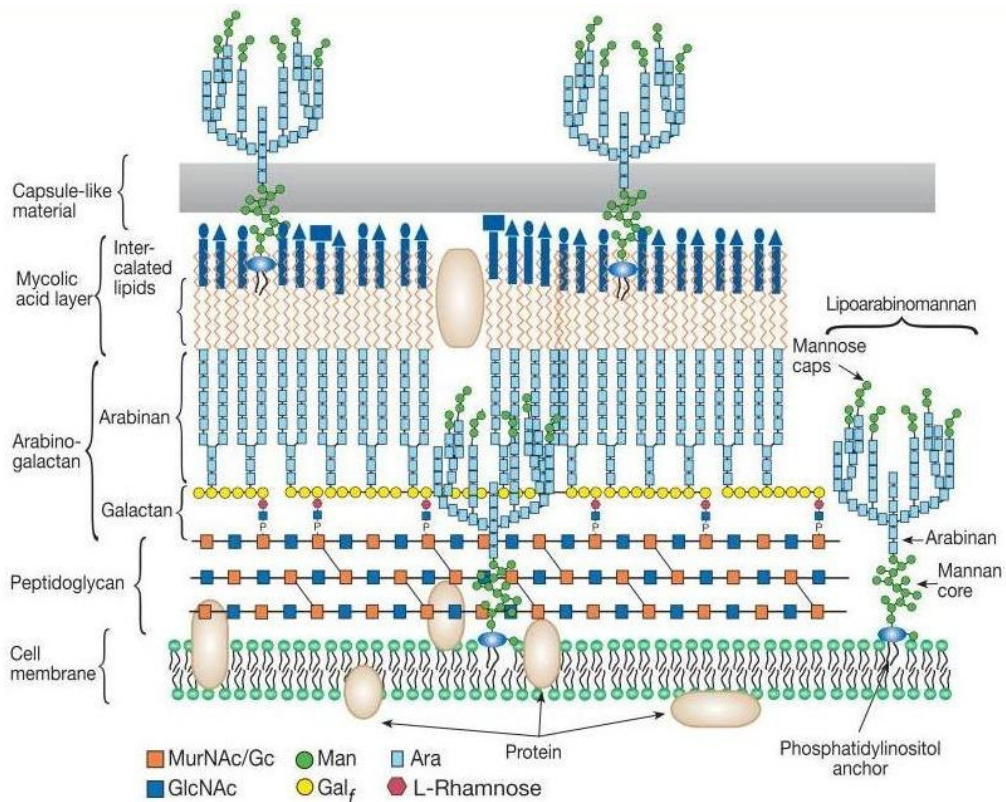
### **A parede celular micobacteriana**

A membrana citoplasmática micobacteriana é encapsulada por uma rígida camada de peptidoglicanos, covalentemente ligada a moléculas de arabinogalactana que, por sua vez, são ligadas aos ácidos micólicos, componentes característicos de micobactérias (**Figura 6**; Brennan, 2003).

Os processos de biossíntese e manutenção da estrutura da parede celular micobacteriana são amplamente explorados como alvos de fármacos que agem sobre os bacilos replicantes. Ademais, sabe-se que esta estrutura não é estática. A mesma constitui um polímero dinâmico que se adapta às fases intermediárias de não-replicação, o que faz dos elementos que participam de tais modificações durante a fase de latência, alvos promissores para o desenvolvimento de novas drogas anti-TB (Barry e Boshoff, 2006).

Os ácidos micólicos são ácidos graxos  $\alpha$ -alquil,  $\beta$ -hidróxi, de alto peso molecular que se tornaram uma das características taxonômicas de muitas espécies dos gêneros *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (Schroeder et al., 2002). O aumento da cadeia dos ácidos graxos ocorre através de ciclos repetitivos de condensação, redução  $\beta$ -ceto, desidratação, e redução enoil, que são catalisados, respectivamente, pelas enzimas  $\beta$ -cetoacil sintase,  $\beta$ -cetoacil redutase,  $\beta$ -hidróxiacil desidrase e enoil-ACP redutase (Vasconcelos et al., 2008).





**Figura 6.** Estrutura da parede celular de micobactérias, evidenciando o esqueleto principal de peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos. (ncbi.nlm.nih.gov).

### A isoniazida e seu mecanismo de ação

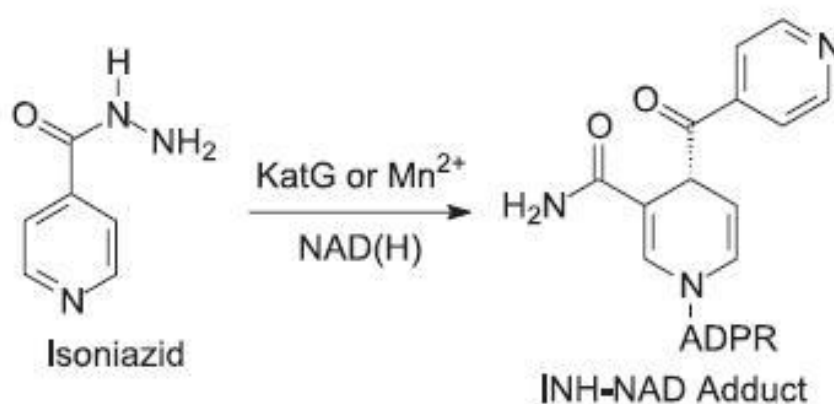
A isoniazida (INH, hidrazina do ácido isonicotínico) foi sintetizada pela primeira vez em 1912, mas sua poderosa atividade anti-TB foi descoberta apenas em 1951. A INH é o agente quimioterápico mais prescrito contra a infecção ativa e para a profilaxia da TB e é ativa contra bactérias em crescimento, mas não contra os bacilos latentes (Basso e Blanchard, 1998). A INH tem uma estrutura simples, contendo um anel piridínico e um grupamento hidrazina (**Figura 7**); tais grupos são essenciais para sua atividade contra o *M. tuberculosis*.

A INH interfere com a biossíntese de ácidos micólicos por inibir a enzima enoil-ACP-CoA redutase (InhA). Esta enzima, codificada pelo gene *inhA* de *M. tuberculosis*, é amplamente reportada como sendo o alvo primário da INH. A enzima InhA foi identificada como uma enoil-ACP-CoA redutase, proteína carreadora de grupos acila, dependente do cofator NADH e com

especificidade por enoil tioésteres de cadeia longa. A InhA é um membro do sistema de biossíntese de ácidos graxos micobacterianos do tipo II, que alonga ácidos graxos acilados, precursores dos ácidos micólicos. A inibição da InhA de *M. tuberculosis* pela INH leva, então, a uma inibição na biossíntese dos ácidos micólicos, componentes essenciais da parede celular micobacteriana (Banerjee et al., 1994).

Consistente com o mecanismo de ação proposto para a INH sobre a enzima InhA, a inativação da enzima homóloga enoil redutase de *Mycobacterium smegmatis* e o tratamento com INH resultam em inibições significantes na biossíntese de ácidos micólicos e alterações morfológicas na parede celular micobacteriana, levando à lise celular, naquele organismo (Vilcheze et al., 2000). Além disso, mutações no gene *inhA* foram identificadas em isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes à INH (Basso e Blanchard, 1998). Assim, tanto evidências bioquímicas quanto genéticas têm demonstrado que a enoil-ACP-CoA redutase é o alvo primário da INH (Kremer et al., 2003).

A INH é um pró-fármaco e, como tal, necessita ser ativada pela enzima micobacteriana peroxidase-catalase (KatG), codificada pelo gene *katG* de *M. tuberculosis*, na presença de íons manganês, NADH e oxigênio (**Figura 7**, Basso e Blanchard, 1998). O fragmento acilpiridina da INH resultante da ação da KatG é covalentemente ligado à posição C4 do NADH e forma um complexo binário ativo contra a enzima InhA selvagem de *M. tuberculosis* (Rozwarski et al., 1998).



**Figura 7.** Ativação da isoniazida pela enzima micobacteriana KatG formando o aduto isoniazida-NAD ativo.

## **Mecanismos de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida**

Diferentemente da maioria das bactérias nas quais a resistência adquirida a drogas pode ser mediada através da transferência horizontal de elementos genéticos móveis, em *M. tuberculosis* a resistência adquirida a drogas é causada principalmente por mutações genéticas, e pela seleção de cepas resistentes durante a terapia farmacológica com doses sub-terapêuticas. Desta maneira, o uso não racional dos fármacos anti-TB pode levar ao surgimento e emergência de cepas de *M. tuberculosis* resistentes (Laurenzo e Mousa, 2011, Almeida da Silva e Palomino, 2011). A cada ano, cerca de 440 mil novos casos de TB são causados por bacilos que são resistentes aos dois principais fármacos anti-TB, INH e RIF (Veziris e Robert, 2010).

Estudos de sequenciamento de DNA têm demonstrado que mais de 95 % dos casos de resistência à RIF ocorrem devido a mutações em uma região bem definida do gene *rpoB*, que codifica a subunidade  $\beta$  da enzima RNA polimerase, alvo primário da RIF. Contudo, os mecanismos pelos quais o *M. tuberculosis* se torna resistente à INH parecem ser mais complexos do que o da RIF e podem envolver diferentes mutações no genoma do bacilo. Mutações em vários genes, tais como *katG*, *ahpC*, *inhA*, *kasA* e *ndh* têm sido associadas com resistência à INH (Laurenzo e Mousa, 2011, Almeida da Silva e Palomino, 2011).

As mutações mais comumente encontradas, relacionadas à resistência à INH, têm sido descritas no gene *katG* (de 30 a 90 % dos casos) e na região promotora do gene *inhA* (aproximadamente 15 % dos casos). Mutações no gene da KatG, a alteração genética mais comum associada à resistência à INH, levam a uma perda ou diminuição na atividade de catalase peroxidase desta enzima. Uma mutação, em particular, a substituição da Serina da posição 315 por uma Treonina (S315T, substituição do códon AGC por ACC), causa a grande maioria da resistência à INH, e é encontrada em cerca de 50 a 90 % das cepas resistentes à INH. Tal alteração resulta em um produto INH que é altamente deficiente em formar o aduto NAD-INH que é o responsável pela atividade antimicobacteriana. De modo interessante, tem sido demonstrado que a mutação S315T no gene *katG* ocorre mais

frequentemente em MDR-TB do que em cepas resistentes apenas à INH (Laurenzo e Mousa, 2011, Almeida da Silva e Palomino, 2011).

A resistência também pode ser causada devido a mutações no gene *inhA* ou na região promotora deste gene. Mutações na região regulatória do gene *inhA* (nucleotídeos - 8 a - 24) e na região codificante deste gene (I16T, I21V, I47T, S94A e I95P) têm sido identificadas (Basso e Blanchard, 1998, Laurenzo e Mousa, 2011). Mutações no gene estrutural da InhA podem reduzir a afinidade de ligação da enzima ao aduto inibidor, protegendo-a da inativação. As mutações no promotor da InhA podem super-regular a expressão deste gene, produzindo resistência à INH através de um mecanismo de titulação da droga-enzima. A mutação mais comum relacionada ao gene *inhA* ocorre na sua região promotora, a substituição da Cisteína da posição - 15 por uma Treonina, C(-15)T, em aproximadamente 15 % dos casos. As mutações no gene *inhA* e na sua região regulatória podem também conferir resistência à etionamida, uma droga estruturalmente semelhante à INH (Sajduda et al., 2004, Almeida da Silva e Palomino, 2011).

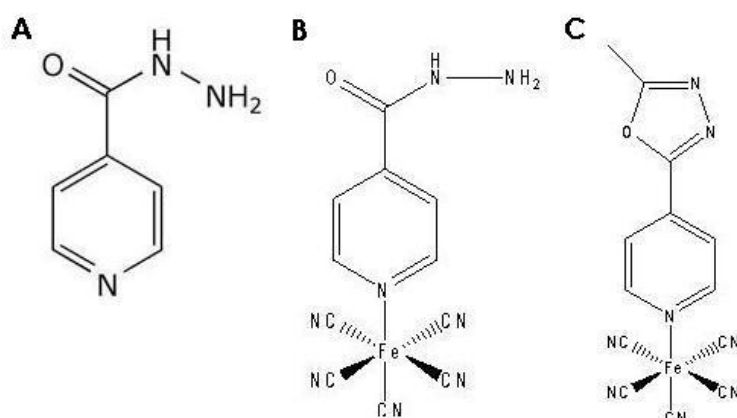
Estudos avaliando o perfil de mutações presente em amostras de pacientes brasileiros aponta a maior ocorrência de mutações no gene *katG* (mutação S315T), o que também é observado em outros países. O primeiro estudo brasileiro com o objetivo de caracterizar as mutações presentes em amostras resistentes à INH foi publicado no ano de 2003 e envolveu amostras de três estados brasileiros, Rio Grande do Sul (RS), Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP) (Silva et al., 2003). Os dados relataram maiores frequências de mutações no gene *katG* e na região regulatória do gene *inhA* (Silva et al., 2003), o que é consistente com os resultados de estudos semelhantes em outros países (Sajduda et al., 2004, Haas et al., 1997, Jiao et al., 2007, Guo et al., 2006). Cerca de 87 % das amostras do RS e 60 % das do RJ e SP apresentaram mutações pontuais no códon 315 do gene *katG*. Determinou-se que 12 % dos isolados do RS, 21 % dos isolados do RJ e 6 % dos de SP apresentaram mutações em distintas posições da região regulatória do gene *inhA* (Silva et al., 2003). Outro estudo brasileiro, de 2005, apontou a presença da mutação S315T no gene *katG* em de cerca de 60 % amostras resistentes à INHA estudadas, provenientes do estado de São Paulo (Hofling et al., 2005) . Por sua vez, um estudo publicado em 2009,

envolvendo pacientes da cidade de Brasília, demonstrou a presença da substituição S315T no gene *katG* em 73 das 97 amostras resistentes à INH analisadas (de Siqueira et al., 2009).

### **IQG-607 e IQG-639 como possíveis agentes anti-micobacterianos**

Considerando o fato de a INH ser um pró-fármaco, o número crescente de casos de resistência a esta droga e a carência de inovação em relação aos fármacos anti-TB por décadas, o estudo de novos análogos da INH que não necessitem de ativação e que também sejam ativos contra cepas de *M. tuberculosis* resistentes parece promissor. Com base nesta estratégia, um sistema modelo para ativação *in vitro* de drogas anti-TB foi proposto, no qual um centro metálico contendo uma porção pentacianoferrato ligada ao átomo de nitrogênio do anel heterocíclico da INH (**Figura 8A**) promoveria uma reação de transferência de elétrons que mimetizaria a sua ativação *in vitro* pela enzima KatG ou  $Mg^{+2}$  (Oliveira et al., 2006, Sousa et al., 2005). Além disto, foi demonstrado que o novo composto pentaciano(isoniazida)ferrato(II) (denominado IQG-607, **Figura 8B**) inibe *in vitro* um alvo já validado, a InhA de *M. tuberculosis* (Oliveira et al., 2006), e que ele não requer ativação pela KatG ou qualquer outra enzima para ligar a este seu provável alvo molecular (Oliveira et al., 2004), o que pode ajudar a superar o mais importante mecanismo de resistência à INH, as mutações no gene *katG*. De maneira interessante, também foi demonstrado que o composto IQG-607 inibe de maneira marcante enzimas InhA mutantes e resistentes à INH (I21V, I47T e S94A), além de inibir a enzima selvagem, *in vitro* (Vasconcelos et al., 2008). Espera-se que velocidades de dissociação mais lentas aumentem a efetividade inibitória, e, assim, os intervalos entre as doses podem ser mais longos. Uma comparação entre o tempo de meia-vida para o IQG-607 e para o aduto INH-NAD mostra que o complexo inorgânico se dissocia das enzimas InhA selvagem e mutantes I47T, I21V e S14A mais lentamente que o aduto. Combinado ao fato de que o composto em questão forma o complexo enzima-inibidor mais rapidamente (Vasconcelos et al., 2008), estas observações sugerem que o IQG-607 pode representar um agente anti-TB promissor.

Foram idealizadas outras novas moléculas com possível atividade inibitória contra a enzima micobacteriana InhA e, conseqüentemente, contra o bacilo *M. tuberculosis*. Dentre elas, outro composto, contendo um grupamento pentacianoferrato e um anel oxadiazol, pentaciano(2-metil-5-(piridin-4-il)-1,3,4-oxadiazol)ferrato(II) (denominado IQG-639, **Figura 8C**) também foi capaz de inibir *in vitro* a atividade das enzimas InhA de *M. tuberculosis* do tipo selvagem e resistente à INH (S94A) (I. B. Vasconcelos, D. S. Santos e L. A. Basso, dados não publicados). Além disto, estes dois novos compostos, IQG-607 (Basso et al., 2010) e IQG-639 (C. Z. Schneider, L. A. Basso e D. S. Santos, dados não publicados) foram ativos quando testados em culturas de *M. tuberculosis* H37Rv e de dois isolados clínicos resistentes à INH, demonstrando uma eficácia satisfatória *in vitro*. De forma interessante, foram estabelecidos importantes parâmetros toxicológicos que determinaram a segurança após a administração oral do IQG-607 (Basso et al., 2010) e IQG-639 (A. A. Santos Jr., M. M. Campos e D. S. Santos, dados não publicados), o que nos foi útil na escolha das doses empregadas nos experimentos *in vivo*. Ainda, estudos toxicológicos em roedores investigaram os efeitos da administração de doses diárias do composto IQG-607 durante 90 dias e revelaram um perfil de toxicidade bastante favorável (menor hepatotoxicidade e neurotoxicidade) para este composto em relação à INH (M. M. Campos e J. B. Calixto, dados não publicados).



**Figura 8.** Estruturas químicas da isoniazida (A), IQG-607 (B) e IQG-639 (C).

A descoberta de novas drogas envolve diferentes etapas de desenvolvimento que são comumente iniciadas por estudos *in vitro*. Estes estudos costumam ser bons preditores dos efeitos de novos compostos, embora uma série de questões relevantes justifique a realização de estudos *in vivo*, a fim de comprovar os achados obtidos previamente em sistemas isolados. De fato, há vários fatores farmacológicos que influenciam a eficácia de um inibidor enzimático, especialmente aqueles que precedem a ligação do composto ao seu alvo molecular, como absorção, distribuição sistêmica, e *clearance* (Anders e Vielhauer, 2007).

## Justificativa

A tuberculose permanece como uma das principais causas de morte em todo o mundo, e levou 1,45 milhões dos pacientes a óbito, em 2010. Além disto, a doença foi declarada como emergência de saúde global, em 1993, pela Organização Mundial da Saúde. A re-emergência da tuberculose como um problema de saúde mundial, a grande susceptibilidade de pessoas infectadas com o HIV à doença, a proliferação de cepas resistentes aos fármacos atualmente disponíveis e a necessidade de tratamentos mais curtos e com menores efeitos indesejáveis criaram a necessidade urgente do desenvolvimento de terapias anti-tuberculose inovadoras. Idealmente, novas drogas anti-tuberculose deveriam ser efetivas contra as cepas resistentes, diminuir o longo período de tratamento, aumentando a adesão dos pacientes à quimioterapia, diminuir a frequência de doses e, ainda, possuir mínimas interações medicamentosas (especialmente com os fármacos anti-retrovirais) e baixo perfil de toxicidade (WHO, 2011, Koul et al., 2011).

Os compostos IQG-607 e IQG-639 possuem perfis satisfatórios de inibição enzimática contra a enzima enoil-ACP-CoA redutase (tanto a do tipo selvagem como mutantes resistentes à isoniazida) de *M. tuberculosis*, um alvo já validado (Oliveira et al., 2004, Oliveira et al., 2006, Vasconcelos et al., 2008, I. B. Vasconcelos, D. S. Santos e L. A. Basso, dados não publicados). Além disto, estes compostos foram ativos quando testados em culturas de *M. tuberculosis* H37Rv e de dois isolados clínicos resistentes à isoniazida, demonstrando uma eficácia satisfatória *in vitro*. De forma importante, foram estabelecidos importantes parâmetros toxicológicos que determinaram a segurança após a administração oral dos compostos IQG-607 e IQG-639 (Basso et al., 2010, C. Z. Schneider, L. A. Basso e D. S. Santos, dados não publicados).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo determinar a atividade dos compostos IQG-607 e IQG-639 em um modelo *in vivo* de infecção por *M. tuberculosis*.



# Objetivos

## Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicobacteriana dos compostos IQG-607 e IQG-639 em um modelo de tuberculose em camundongos.

## Objetivos específicos

1. Validar um modelo de infecção com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv em camundongos suíços;
2. Analisar a aparência clínica macroscópica dos pulmões e determinar o peso dos baços dos animais infectados;
3. Determinar a capacidade do composto IQG-607 em reduzir as unidades formadoras de colônia de homogeneizados de pulmões e de baços de animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv;
4. Determinar a capacidade do composto IQG-639 em reduzir as unidades formadoras de colônia de homogeneizados de pulmões e de baços de animais infectados com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv;
5. Comparar a atividade dos compostos IQG-607 e IQG-639 com a atividade da isoniazida;
6. Avaliar a atividade de diferentes doses dos compostos em questão;
7. Investigar o efeito bactericida ou bacteriostático dos compostos em questão.

---

# Capítulo 2

---

Metodología

---

## Metodologia

### Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos, pesando entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPel; Pelotas, RS). Foram utilizados 6 animais por grupo. Os animais foram mantidos no Laboratório de Testes Pré-clínicos, localizado no CPBMF/INCT-TB, na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), com temperatura controlada ( $22,5 \pm 1$  °C) e ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 7 h; luzes apagadas às 19 h). Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas para roedores, preenchidas com maravalha de pinus (troca 3 vezes por semana). Os animais receberam ração peletizada (marca Nuvilab®) e água *ad libitum*. Nenhum outro procedimento experimental foi realizado no espaço destinado à manutenção dos animais, a fim de evitar a produção de qualquer tipo de estresse comportamental.

Os procedimentos experimentais seguiram as recomendações para o cuidado com animais de laboratório e normas éticas para a experimentação em animais conscientes, do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do National Institute of Health dos Estados Unidos da América, que são adotadas pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da PUCRS (Número de Protocolo 09/00094; **Anexo A**).

### Compostos químicos

A INH foi adquirida da empresa Acros Organics (Geel, Bélgica). Os compostos IQG-607 e IQG-639 foram sintetizados no Laboratório de Química, anexo ao CPBMF/INCT-TB, na PUCRS, em estreita colaboração com o Laboratório de Bioinorgânica, da Universidade Federal do Ceará. O composto IQG-607 foi sintetizado de acordo com Oliveira et al. (2006). O complexo 2-metil-5-(piridin-4-il)-1,3,4-oxadiazol, que compõe o composto

IQG-639, foi sintetizado como descrito previamente (Popova et al., 1997), e o produto foi, a seguir, coordenado ao grupamento pentacianoferrato(II) de acordo com Oliveira et al. (2006). Os compostos IQG-607 e IQG-639 tiveram as suas estruturas químicas caracterizadas conforme descrito previamente (Oliveira et al., 2006). Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina a 0,9 %. As soluções das drogas foram preparadas logo antes da administração aos animais, e foram protegidas da luz e do calor.

### **O inóculo de *Mycobacterium tuberculosis***

A cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) é a cepa laboratorial de referência mais amplamente utilizada e possui as características de virulência do bacilo. Além disto, a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv é sensível à INH (Jia et al., 2005, Tyagi et al., 2005, Lu et al., 2010, Basso et al., 2010). Esta cepa foi mantida em meio sólido Ogawa a 4 °C e subcultivada no mesmo meio em estufa a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> durante cerca de cinco semanas. As colônias de *M. tuberculosis* foram cuidadosamente coletadas e suspensas em solução salina a 0,9 % estéril contendo 0,05 % de Tween-80 (Sigma-Aldrich). Esta suspensão celular foi agitada com esferas de vidro estéreis (4 mm) durante 5 minutos para minimizar a agregação celular. A seguir, esta suspensão foi deixada em repouso por 30 minutos. O sobrenadante foi medido espectrofotometricamente em cubetas de plástico descartáveis em um volume de 1 ml a uma absorbância de 600 nm. Esta suspensão foi, então, diluída com solução salina estéril até atingir uma densidade óptica de 0,8 a 600 nm, o que corresponde a aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/ml. A suspensão de *M. tuberculosis* foi alíquotada e congelada a -20 °C. No dia da infecção, uma única alíquota foi descongelada, diluída e o inóculo resultante foi determinado. A concentração final do inóculo foi determinada semeando 100 µl de três diferentes diluições ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ ) em triplicata, em placas contendo o meio Middlebrook 7H10 agar (Difco), suplementadas com 10 % (v/v) de Middlebrook OADC (ácido oléico, albumina, dextrose, catalase; Becton Dickinson). As placas foram incubadas a 37 °C por quatro semanas, e as contagens das unidades formadoras de colônia (UFC) da suspensão bacteriana descongelada foram determinadas.

O manuseio das culturas de *M. tuberculosis* foi realizado em condições apropriadas, respeitando todas as normas técnicas necessárias para este tipo de procedimento, em um laboratório com Nível de Biosegurança III, localizado no INCT-TB, na PUCRS.

### **Modelo de infecção por *M. tuberculosis* em camundongos**

Os experimentos de infecção foram conduzidos no Laboratório de Testes Pré-clínicos, localizado no CPBMF/INCT-TB, Prédio 92A, do TecnoPUC. Durante os procedimentos experimentais, a temperatura do laboratório foi mantida em  $22,5 \pm 1$  °C.

Os camundongos foram infectados pela via endovenosa, através do plexo venoso retro-orbital, de acordo com técnicas previamente descritas (Cynamon et al., 1999a, Klemens et al., 1994), com pequenas modificações. Grupos de 6 animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina (100 mg/kg, Cristália) e xilazina (10 mg/kg, Vetbrands) e, a seguir, foram infectados com  $10^6$  a  $10^7$  células de *M. tuberculosis* H37Rv viáveis suspendidas em 200 µl de solução salina estéril contendo 0,05 % de Tween-80. Para cada experimento, um grupo controle de 6 animais recebeu solução salina contendo Tween-80 a 0,05 % através da mesma via. A eficiência do protocolo de infecção foi confirmada através de coloração de Ziehl-Neelsen de fatias de pulmões.

### **Protocolos de Tratamento**

Após a infecção, os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos contendo 6 animais para cada grupo de tratamento. O tratamento foi iniciado 7 dias após a infecção e as drogas foram administradas diariamente por via oral (gavagem). Neste trabalho, realizamos quatro experimentos diferentes.

O primeiro experimento consistiu em um esquema quimioterapêutico de 28 dias de tratamento. A fim de investigar o impacto do aumento do período de administração dos compostos-teste, foi realizado o segundo

experimento, que consistiu em 56 dias de tratamento. Para ambos os experimentos, de 28 e 56 dias de tratamento, os grupos que receberam as drogas-teste receberam IQG-607 (250 mg/kg, que corresponde a 560  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou IQG-639 (250 mg/kg, que corresponde a 532  $\mu\text{mol/kg}$ ). O fármaco INH (25 mg/kg, que corresponde a 182  $\mu\text{mol/kg}$ ) foi administrado como controle positivo do tratamento em todos os experimentos (Klemens et al., 1994, Cynamon et al., 1999a, Jia et al., 2005, Tyagi et al., 2005, Lu et al., 2010). O grupo controle negativo (camundongos não infectados) e o grupo controle positivo da doença (infectados com *M. tuberculosis* e não tratados) receberam solução salina a 0,9 % durante todo o período dos tratamentos.

O terceiro experimento consistiu na avaliação do padrão de dose-resposta do composto IQG-607. Para isto, camundongos infectados com *M. tuberculosis* foram divididos em grupos de tratamento, que receberam diferentes doses diárias de IQG-607 (5, 10, 25, 50, 100, 200 e 250 mg/kg, que correspondem a 11, 22, 56, 112, 224, 448 e 560  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente) durante 28 dias. O grupo controle positivo do tratamento recebeu INH (25 mg/kg, que corresponde a 182  $\mu\text{mol/kg}$ ). O grupo controle positivo da infecção e, também, os camundongos não infectados receberam solução salina a 0,9 % durante o período do tratamento.

### **Avaliação da eficácia após tratamento**

A eficácia dos diferentes tratamentos foi avaliada com base nas contagens das UFC dos baços e pulmões e também pela determinação da esplenomegalia. Os camundongos foram eutanasiados com inalação de isoflurano (Cristália), 3 a 5 dias após a última administração dos compostos. Os baços e os pulmões esquerdos foram removidos em condições assépticas. Além disto, os baços tiveram seus pesos determinados em condições assépticas. Os pulmões e baços foram, então, homogeneizados, separadamente, em um homogeneizador de vidro contendo 3 ml de solução salina estéril. O número de microrganismos viáveis foi determinado após semeadura de diluições seriadas dos homogeneizados em placas contendo Middlebrook 7H10 ágar (Difco) suplementadas com 10 % de Middlebrook OADC (Becton Dickinson). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C a 5

% de CO<sub>2</sub> durante 4 semanas, antes da contagem das células de *M. tuberculosis* viáveis.

### **Investigação do efeito bactericida ou bacteriostático do IQG-607**

A fim de investigar a atividade bactericida ou bacteriostática do composto IQG-607, idealizamos o quarto experimento deste trabalho. Os camundongos foram infectados com *M. tuberculosis* H37Rv. Sete dias após a infecção, os camundongos receberam INH (25 mg/kg, que corresponde a 182 µmol/kg) ou IQG-607 (150 mg/kg, que corresponde a 336 µmol/kg), durante 28 dias. Um grupo de seis camundongos infectados e que não receberam nenhum tratamento (grupo controle pré-tratamento) foi submetido à eutanásia sete dias após a infecção, no mesmo dia em que foi iniciado o tratamento dos outros grupos (Klemens et al., 1994, Cynamon et al., 1999a).

Após a eutanásia, os pulmões e os baços destes animais foram removidos e os baços tiveram seus pesos determinados em condições assépticas. Além disto, os números de organismos viáveis nestes dois órgãos, pulmões e baços, foram determinados como descrito acima. Adicionalmente, um grupo (denominado controle tardio) de seis animais infectados recebeu solução salina a 0,9 % durante o período de tratamento. Este grupo de animais foi eutanasiado juntamente com os grupos que receberam INH ou IQG-607. Os pesos dos baços e a carga de micobactérias viáveis nos pulmões e nos baços destes animais foram determinados como descrito anteriormente.

Espera-se que as cargas de organismos viáveis nos pulmões e nos baços e o peso dos baços após tratamento com um composto bacteriostático serão significativamente menores quando comparados aos do grupo controle tardio, mas não serão significativamente diferentes do controle pré-tratamento. Por outro lado, espera-se que um composto bactericida seja capaz de diminuir significativamente a esplenomegalia e a carga de micobactérias viáveis nos órgãos quando comparadas com os dois grupos controle, tardio e pré-tratamento.

## **Análise estatística**

Para comparar as contagens de células viáveis presentes nos pulmões e baços dos camundongos, os números de UFC foram previamente convertidos para logaritmo ( $\log_{10}$  UFC). Os pesos dos baços foram previamente corrigidos pelo peso corporal de cada animal (peso do baço/peso corporal). Os dados foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo *pos-hoc* de Bonferroni, usando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significantes a um nível de confiança de 95%.



---

# Capítulo 3

---

Resultados

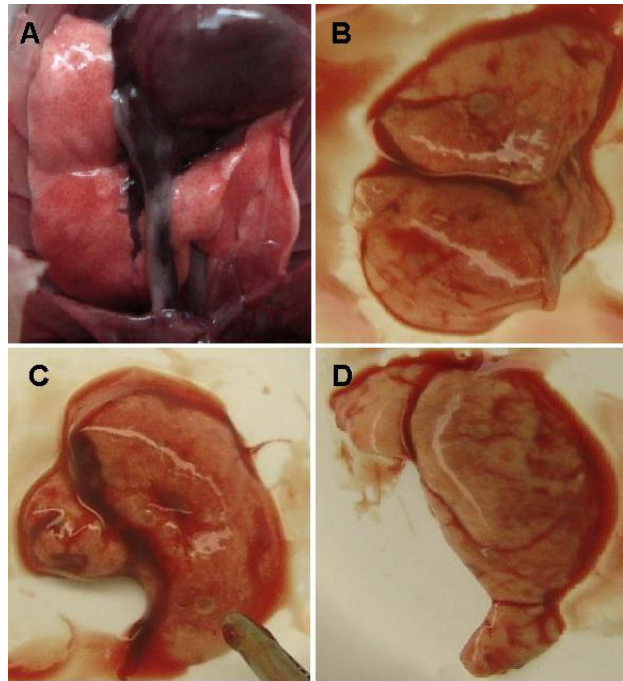
---

## Resultados

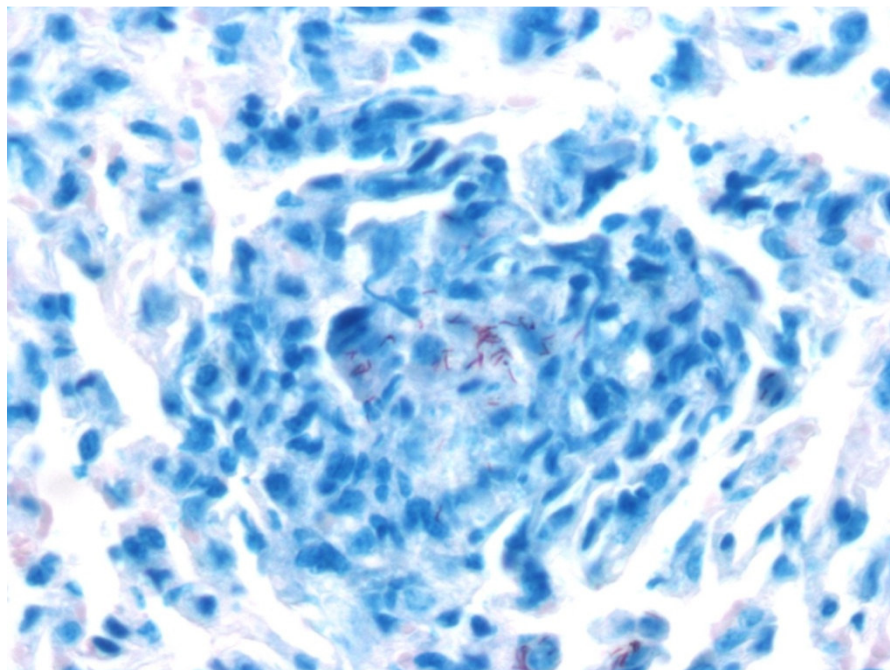
### Validação do modelo murino de infecção por *M. tuberculosis* H37Rv

Inicialmente, os camundongos foram infectados com  $10^7$  *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv viáveis, através da via endovenosa. Após 28 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados e avaliou-se o aspecto macroscópico dos pulmões, assim como o peso dos baços. Foi observada uma acentuada esplenomegalia no grupo infectado em comparação com os camundongos que receberam solução salina através da mesma via. A média de peso dos baços (corrigida pelo peso corporal dos animais) foi aumentada mais de 3,5 vezes no grupo infectado com *M. tuberculosis*, quando comparado ao grupo controle não infectado (resultados não mostrados).

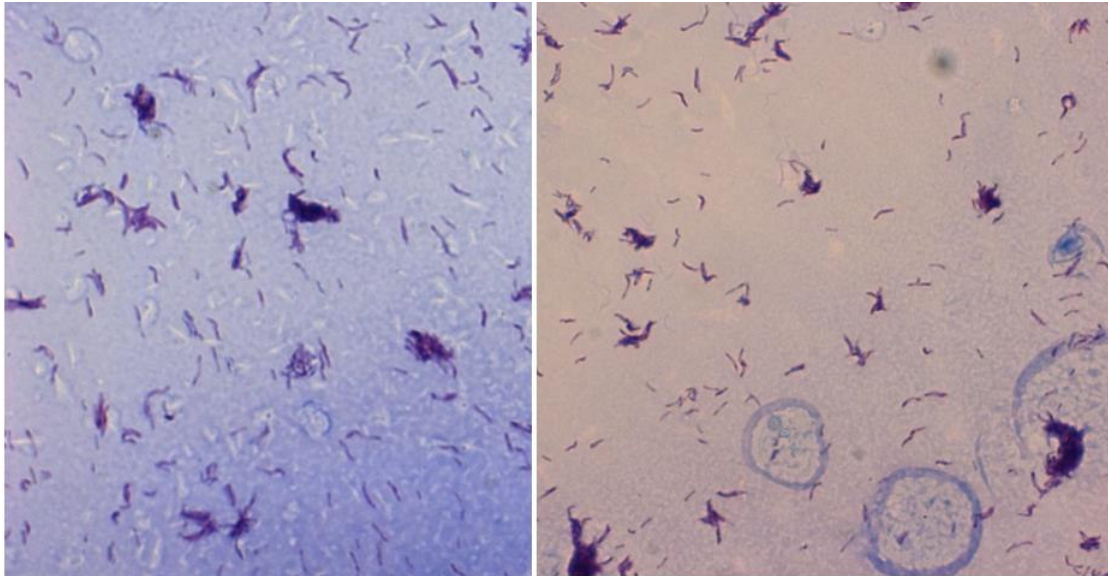
Também foi verificado o aspecto clínico dos pulmões dos animais infectados (**Figuras 9B, 9C, 9D**) e foi possível visualizar macroscopicamente o dano tecidual neste órgão quando comparado aos pulmões do grupo não infectado (**Figura 9A**). Foi realizada, adicionalmente, coloração de Ziehl-Neelsen em fatias de pulmões de animais infectados, o que evidenciou a formação da típica estrutura do granuloma, com bacilos de *M. tuberculosis* no interior de macrófagos, rodeados de linfócitos (**Figura 10**); indicando a validação do nosso protocolo de infecção. Além disto, cultivaram-se os homogeneizados de pulmões e baços de animais infectados e, após 30 dias, as colônias foram observadas. Estas colônias foram coletadas e submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen, confirmando a presença de inúmeras bactérias (bacilos) álcool-ácido resistentes (**Figura 11**).



**Figura 9:** Imagens representativas mostrando pulmões de um animal não infectado (A) e de animais infectados com *M. tuberculosis* H37Rv (B, C e D).



**Figura10:** Imagem representativa mostrando as lesões granulomatosas em pulmões de camundongos suíços infectados com *M. tuberculosis* H37Rv, 28 dias após a infecção. As fatias de pulmões foram submetidas à coloração para células álcool-ácido resistentes. É possível observar a característica estrutura da formação do granuloma, com bacilos no centro da lesão, cercados por linfócitos. Aumento: 40 X.

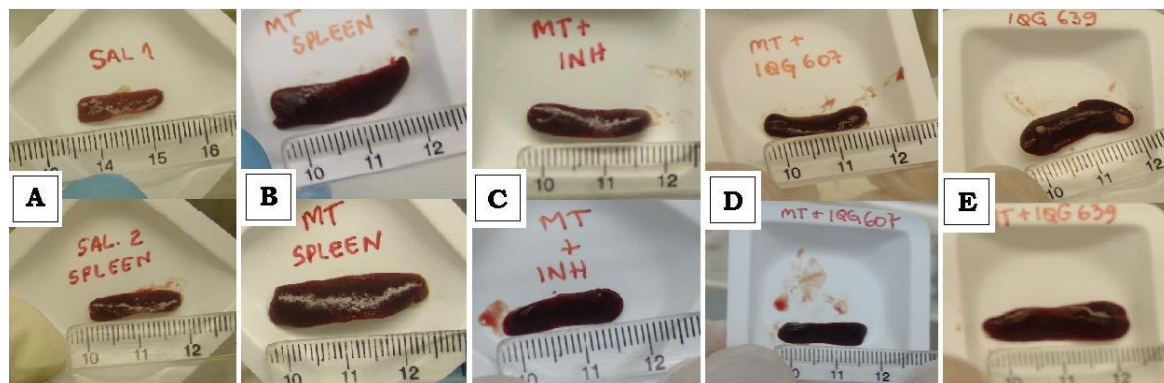


**Figura11:** Imagens representativas mostrando aglomerados de bacilos após submeter as colônias resultantes de 30 dias de cultivo em meio de cultura para micobactérias à coloração de Ziehl-Neelsen.

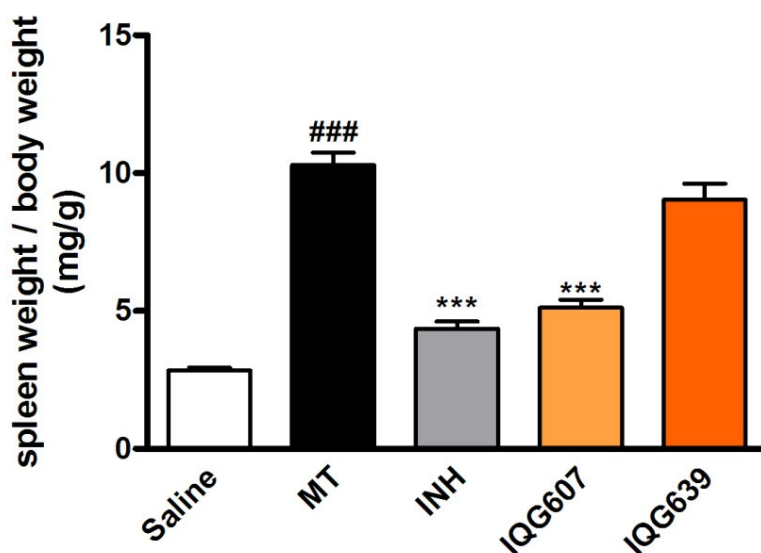
#### **Avaliação da atividade do IQG-607 e IQG-639 após 28 dias de tratamento**

Camundongos infectados com  $10^6$  *M. tuberculosis* H37Rv viáveis foram tratados diariamente com INH (25 mg/kg), IQG-607 (250 mg/kg) e IQG-639 (250 mg/kg), durante 28 dias. Após 5 dias da última dose administrada, os camundongos foram eutanasiados, os pesos dos baços foram determinados, e os pulmões e baços foram homogeneizados e cultivados em meio específico para o crescimento de micobactérias. Camundongos infectados com *M. tuberculosis* apresentaram 261 % de aumento no peso dos baços ( $P < 0,001$ ), quando comparados ao grupo não infectado (**Figuras 12 e 13**). O tratamento com INH ou IQG-607 reduziu 58 % ( $P < 0,001$ ) e 50 % ( $P < 0,001$ ), respectivamente, a esplenomegalia quando comparados aos controles não tratados (**Figuras 12 e 13**). Entretanto, a administração de INH e IQG-607 durante 28 dias não foi capaz de reverter completamente a esplenomegalia a níveis observados nos camundongos não-infectados ( $P < 0,05$  para a INH e  $P < 0,01$  para o IQG-607). O tratamento com IQG-639 não afetou significativamente o peso dos baços ( $P > 0,05$ ; **Figuras 12 e 13**). Notoriamente, os tratamentos com INH e IQG-607 melhoraram o aspecto

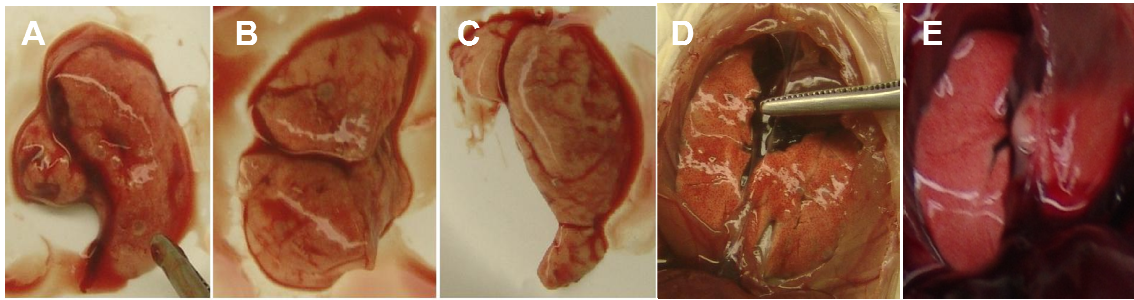
macroscópico dos pulmões, reduzindo as lesões quando comparados ao grupo não tratado (**Figura 14**).



**Figura 12:** Imagens representativas mostrando baços de animais tratados com INH25 mg/kg (C), IQG-607 250 mg/kg (D) e IQG-639 250 mg/kg (E). (A) corresponde ao grupo não infectado e (B) ao grupo infectado e não tratado.

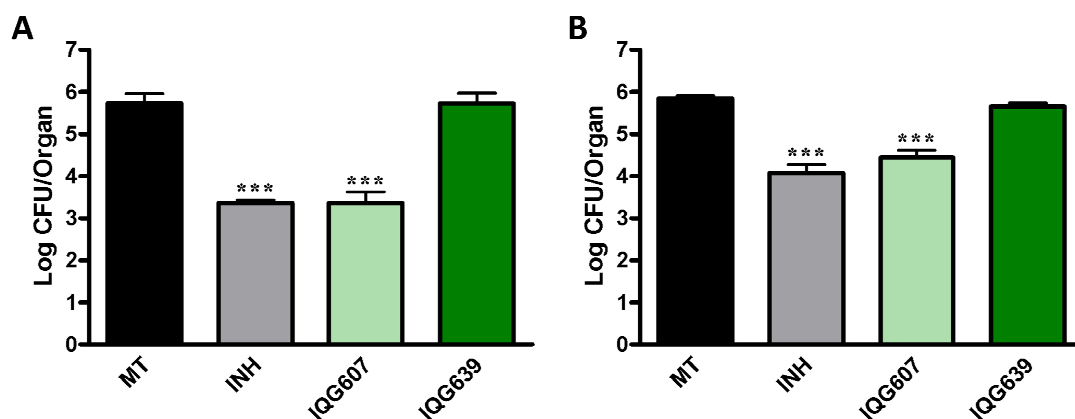


**Figura13:** Pesos dos baços dos camundongos após 28 dias de tratamento com 25 mg/kg de INH, e 250 mg/kg de IQG-607 ou IQG-639. MT representa o grupo infectado com *M. tuberculosis* e não tratado. ###  $P < 0,001$  comparado ao grupo não infectado (Saline); \*\*\*  $P < 0,001$  comparados ao grupo não tratado (MT). Os resultados representam medias  $\pm$  SEM de 5 a 6 camundongos por grupo.

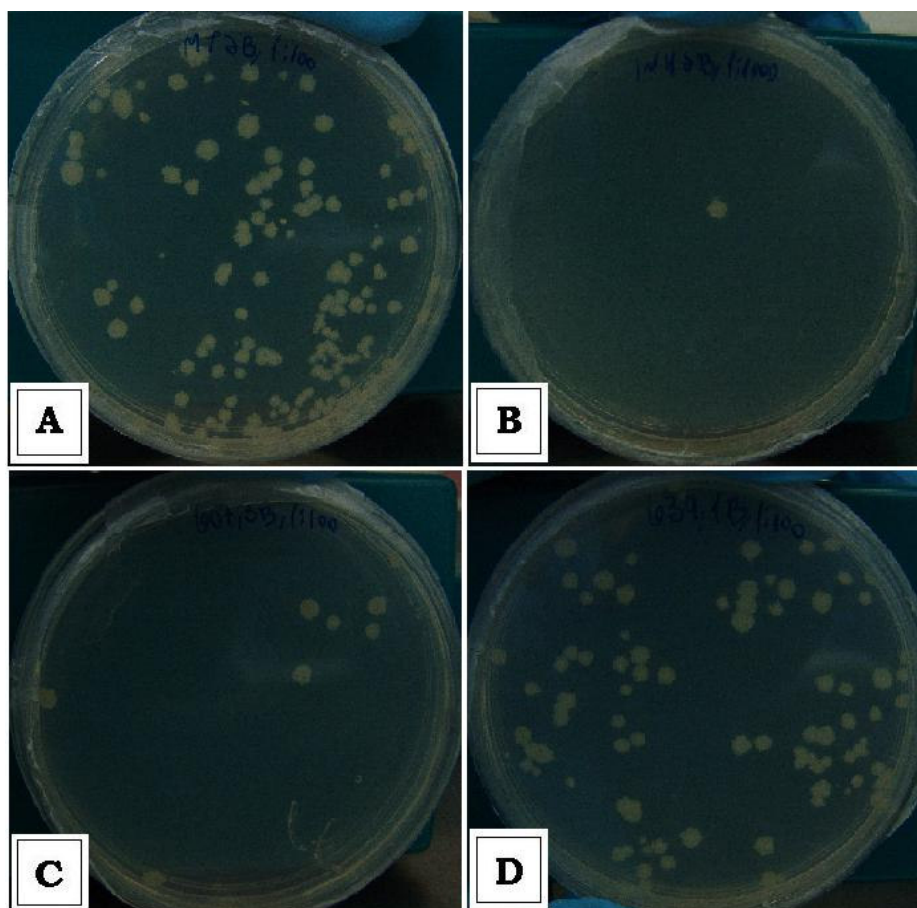


**Figura14:** Imagens representativas de pulmões de camundongos infectados e não tratados (A,B,C,D) e tratados com IQG-607 250 mg/kg (E).

Além disto, a INH causou uma redução de 2,37  $\log_{10}$  ( $P < 0,001$ ) e 1,77  $\log_{10}$  ( $P < 0,001$ ) nos pulmões e baços, respectivamente, comparados ao grupo infectado e não tratado, conforme as contagens de UFC (**Figuras 15 e 16**). Notavelmente, diferenças significantes na redução da carga bacteriana foram observadas entre os camundongos tratados com IQG-607 e o grupo controle não tratado: 2,37  $\log_{10}$  ( $P < 0,001$ ) nos pulmões (**Figura 15A**) e 1,4  $\log_{10}$  ( $P < 0,001$ ) nos baços (**Figuras 15B e 16**). Não foi observada alteração significativa no número de UFC após o tratamento com IQG-639 (**Figuras 15 e 16**).



**Figura15:** Número de UFC após 30 dias de cultivo dos homogeneizados de pulmões (A) e de baços (B) de camundongos infectados com *M. tuberculosis* e não tratados (MT), e tratados com INH, IQG-607 e IQG-639 durante 28 dias. \*\*\*  $P < 0,001$  comparados ao grupo não tratado (MT). Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM de 3 a 4 camundongos por grupo.

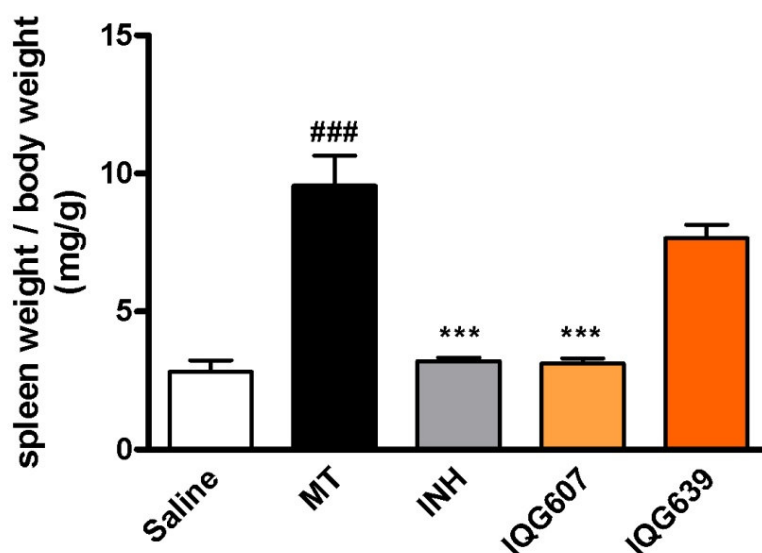


**Figura 16:** Placas representativas mostrando os crescimentos de UFC após 30 dias de cultivo de homogeneizados de baços (diluídos 1:100) de camundongos infectados com *M. tuberculosis* e não tratados (A), tratados com INH (B), tratados com IQG-607 (C) e tratados com IQG-639 (D).

#### **Avaliação da atividade do IQG-607 e IQG-639 após 56 dias de tratamento**

Neste experimento, IQG-607 (250 mg/kg), IQG-639 (250 mg/kg) e INH (25 mg/kg) foram administrados diariamente durante oito semanas a camundongos infectados com  $10^6$  bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv viáveis. A média do peso dos baços foi aumentada 239 % nos camundongos infectados ( $P < 0,001$ ) comparados à média do grupo não infectado (**Figura 17**). A INH e o IQG-607 reduziram 66 % ( $P < 0,001$ ) e 67 % ( $P < 0,001$ ), respectivamente, a esplenomegalia comparando ao grupo não tratado (**Figura 17**). Cabe ressaltar que, após 56 dias de tratamento, nenhuma diferença significativa foi observada comparando os pesos dos baços dos

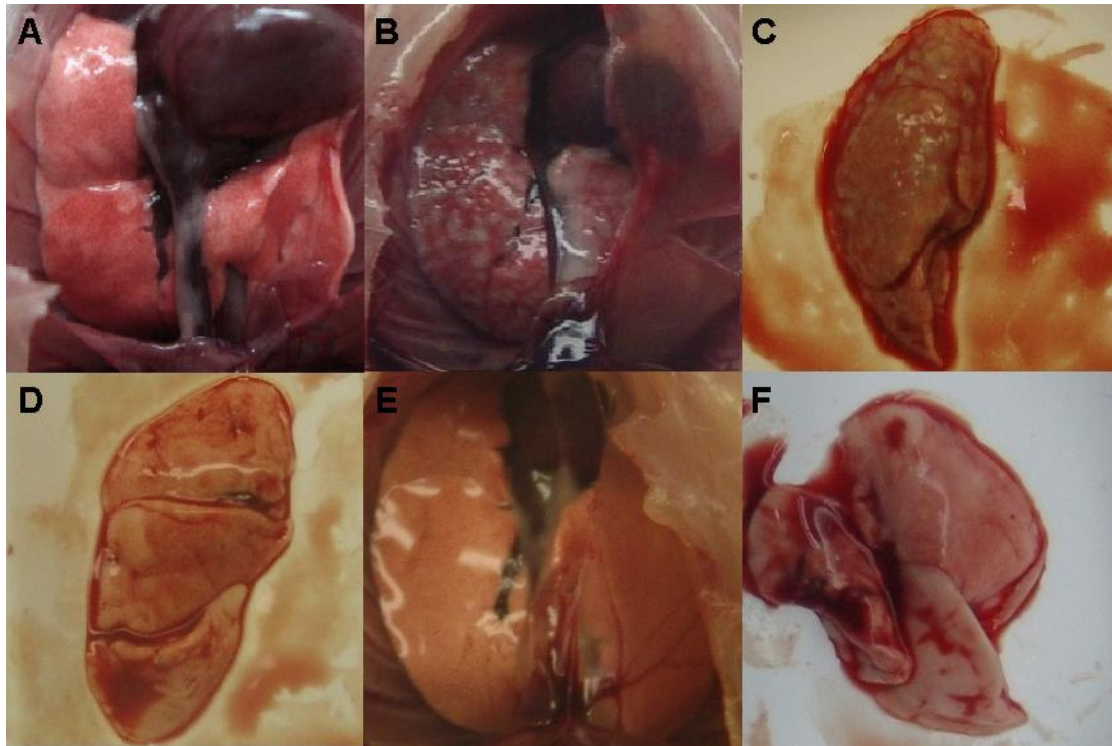
camundongos não infectados com aqueles dos grupos tratados com INH ou IQG-607. Por outro lado, mesmo após 56 dias de tratamento com IQG-639 não foi observada uma diferença significativa neste parâmetro (**Figura 17**).



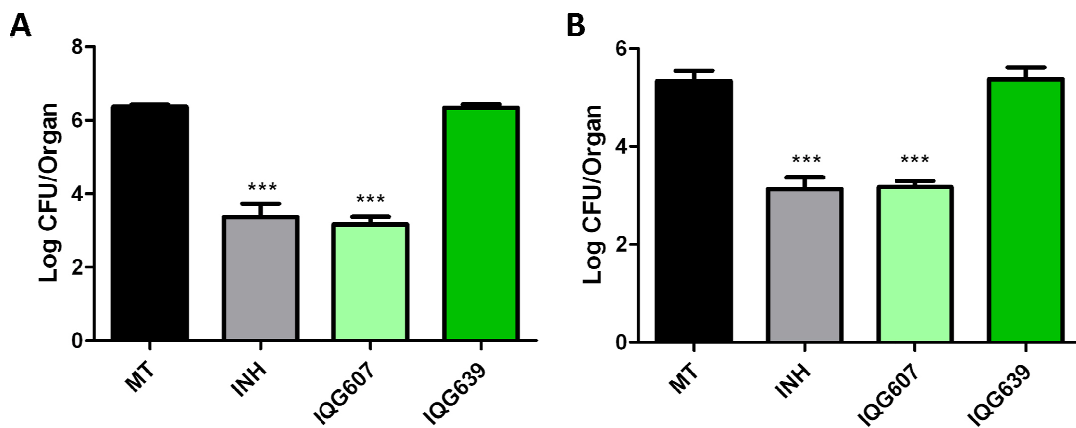
**Figura 17:** Pesos dos baços dos camundongos após 56 dias de tratamento com 25 mg/kg de INH, e 250 mg/kg de IQG-607 ou IQG-639. MT representa o grupo infectado com *M. tuberculosis* e não tratado. ###  $P < 0,001$  comparado ao grupo não infectado (Saline); \*\*\*  $P < 0,001$  comparados ao grupo não tratado (MT). Os resultados representam medias  $\pm$  SEM de 5 a 6 camundongos por grupo.

Os tratamentos com INH e IQG-607 melhoraram o aspecto macroscópico dos pulmões, reduzindo as lesões quando comparados ao grupo não tratado (**Figura 18**). O tratamento com INH reduziu 3  $\log_{10}$  ( $P < 0,001$ ) e 2,21  $\log_{10}$  ( $P < 0,001$ ) UFC nos pulmões e baços, respectivamente (**Figura 19**). A carga bacteriana nos pulmões e baços dos camundongos tratados com IQG-607 foi reduzida 3,2  $\log_{10}$  ( $P < 0,001$ ) e 2,16  $\log_{10}$  ( $P < 0,001$ ) comparando com os controles não tratados (**Figura 19**). O tratamento com o IQG-639 por oito semanas não reduziu as contagens de UFC nos pulmões e baços comparados aos animais infectados que não receberam nenhum tratamento (**Figura 19**).





**Figura 18:** Imagens representativas de pulmões de camundongos não infectados (A), infectados com *M. tuberculosis* e não tratados (B, C), tratados com INH 25 mg/kg (D) e tratados com IQG-607 250 mg/kg (E, F).



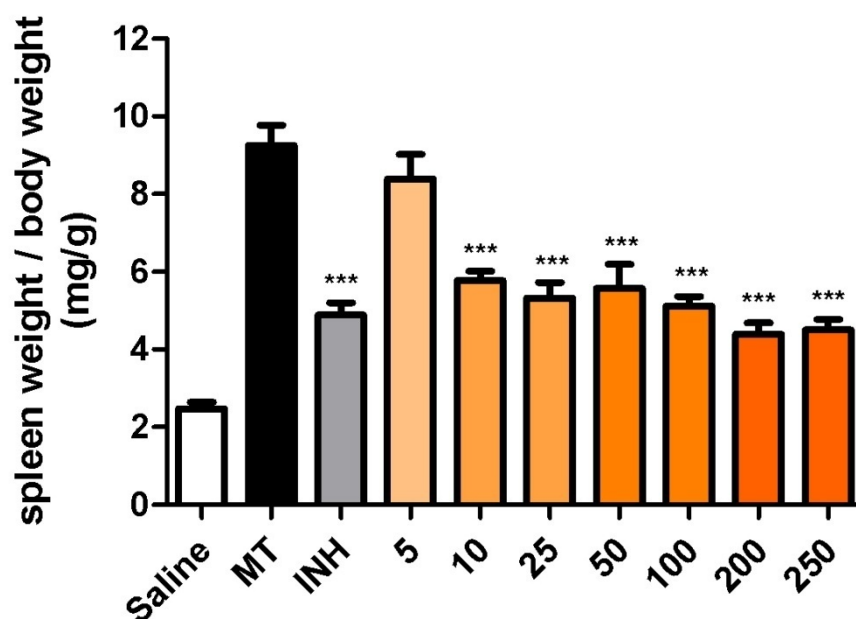
**Figura 19:** Número de UFC após 30 dias de cultivo dos homogeneizados de pulmões (A) e de baços (B) de camundongos infectados com *M. tuberculosis* e não tratados (MT), e tratados com INH, IQG-607 e IQG-639 durante 56 dias. \*\*\*  $P < 0,001$  comparados ao grupo não tratado (MT). Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM de 4 a 5 camundongos por grupo.

## Avaliação da atividade de diferentes doses de IQG-607

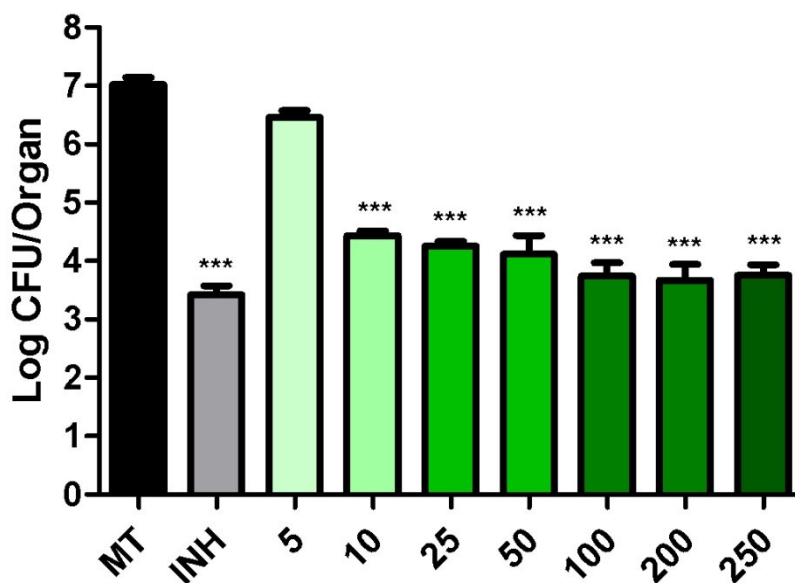
Também foram avaliadas diferentes doses do composto IQG-607 (5, 10, 25, 50, 100, 200 e 250 mg/kg) utilizando este modelo de infecção em camundongos. Os animais foram infectados com aproximadamente  $10^7$  *M. tuberculosis* H37Rv viáveis e tratados durante 28 dias, diariamente. A INH (25 mg/kg) novamente foi usada como controle positivo do tratamento. Neste experimento, os camundongos infectados com *M. tuberculosis* apresentaram 297 % de aumento no peso dos baços ( $P < 0,001$ ) quando comparados ao grupo de animais não infectados (**Figura 20**). Os pesos dos baços foram significativamente mais baixos nos grupos de animais tratados com INH e com IQG-607 (nas doses de 10, 25, 50, 100, 200 e 250 mg/kg) quando comparados ao grupo controle não tratado ( $P < 0,001$  para todas as comparações). No grupo de camundongos tratados com INH, a esplenomegalia foi 47 % menor que os controles, enquanto que nos grupos tratados com as doses de 10, 25, 50, 100, 200 e 250 mg/kg de IQG-607 os pesos dos baços foram 38 %, 43 %, 40 %, 45 %, 52 % e 51 % mais baixos, respectivamente, do que os pesos dos baços dos camundongos não tratados (**Figura 20**). O tratamento com a dose de 5 mg/kg de IQG-607 não afetou significativamente o peso dos baços comparando com o grupo não tratado ( $P > 0,05$ ).

As cargas micobacterianas foram de  $7,03 \pm 0,11 \log_{10}$  nos pulmões e  $6,10 \pm 0,15 \log_{10}$  nos baços dos animais do grupo infectado e não tratado. O grupo tratado com INH apresentou uma diminuição de  $3,61 \log_{10}$  ( $P < 0,001$ ) nas contagens de UFC nos pulmões e de  $1,07 \log_{10}$  ( $P < 0,001$ ) unidades nos baços comparando com o controle não tratado. Nos pulmões, os tratamentos com IQG-607 nas doses de 10, 25, 50, 100, 200 e 250 resultaram em uma faixa de 2,59 a  $3,36 \log_{10}$  ( $P < 0,001$  para todas as doses) UFC menor, comparando ao grupo não tratado (**Figura 21**). Nos baços, estas mesmas doses reduziram as contagens bacterianas em uma faixa de 0,76 a  $1,03 \log_{10}$  ( $P < 0,001$  para todos os tratamentos) comparados aos camundongos não tratados (**Figura 22**). Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as contagens de UFC dos grupos tratados com INH ou com as doses de IQG-607 de 10 mg/kg ou maiores, tanto nos pulmões quanto nos baços (**Figuras**

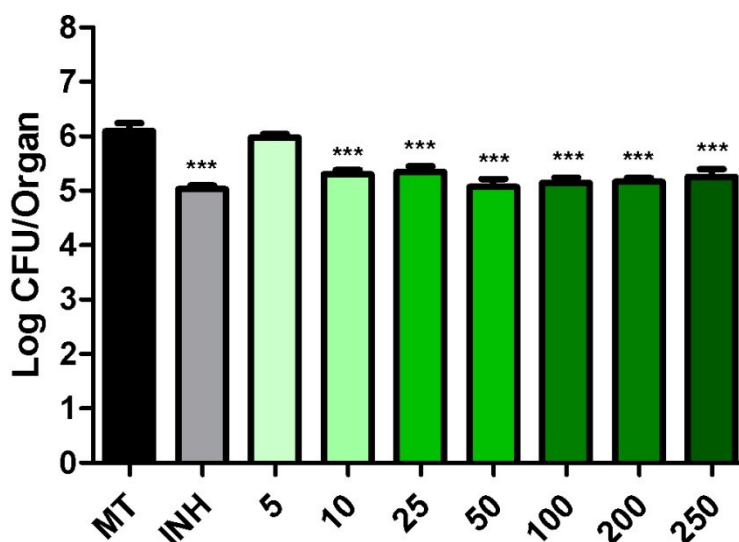
21 e 22). Nenhuma redução significativa nas UFC dos baços e dos pulmões foi observada após 28 dias de tratamento com a dose de 5 mg/kg de IQG-607, comparando com o grupo não tratado ( $P > 0,05$ , Figuras 21 e 22).



**Figura 20:** Pesos dos baços dos camundongos após 28 dias de tratamento com 25 mg/kg de INH, e com diferentes doses de IQG-607: 5, 10, 25, 50, 100, 200 e 250 mg/kg. MT representa o grupo infectado com *M. tuberculosis* e não tratado.\*\*\*  $P < 0,001$  comparados ao grupo não tratado (MT). Os resultados representam medias  $\pm$  SEM de 5 a 6 camundongos por grupo.



**Figura 21:** Número de UFC após 30 dias de cultivo dos homogeneizados de pulmões de camundongos infectados com *M. tuberculosis* e não tratados (MT), tratados com 25 mg/kg de INH, e com diferentes doses de IQG-607: 5, 10, 25, 50, 100, 200 e 250 mg/kg (tratamento durante 28 dias). \*\*\*  $P < 0,001$  comparados ao grupo não tratado (MT). Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM de 5 a 6 camundongos por grupo.

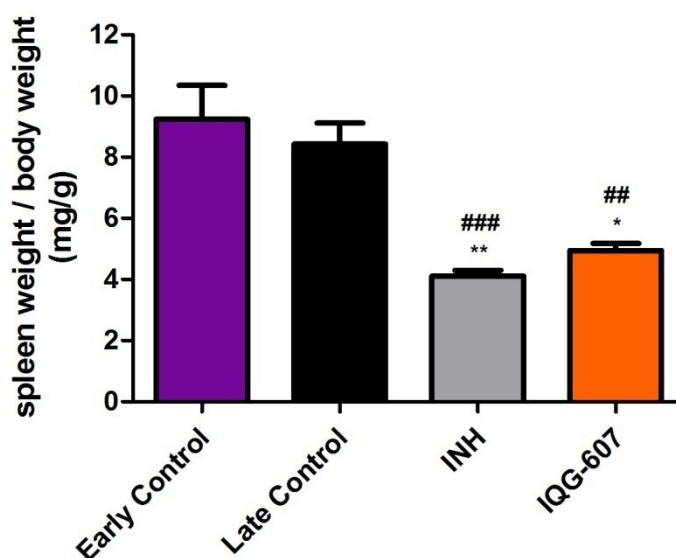


**Figura 22:** Número de UFC após 30 dias de cultivo dos homogeneizados de baços de camundongos infectados com *M. tuberculosis* e não tratados (MT), tratados com 25 mg/Kg de INH, e com diferentes doses de IQG-607: 5, 10, 25, 50, 100, 200 e 250 mg/Kg (tratamento durante 28 dias). \*\*\*  $P < 0,001$  comparados ao grupo não tratado (MT). Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM de 5 a 6 camundongos por grupo.

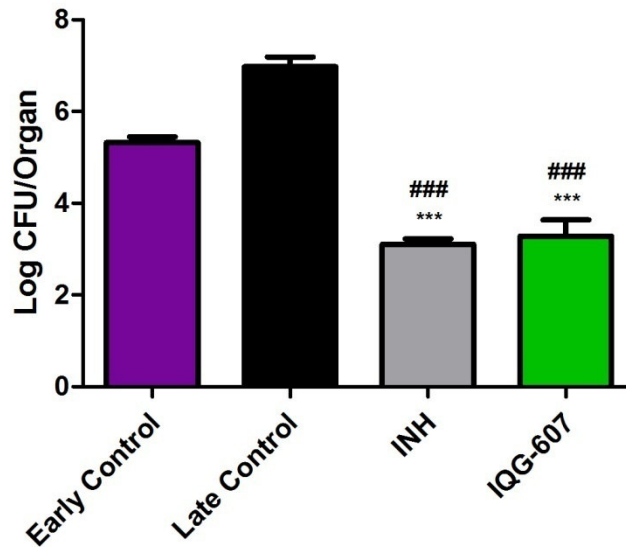
## Investigação do efeito bactericida ou bacteriostático do IQG-607

Camundongos infectados com *M. tuberculosis* foram tratados diariamente com INH (25 mg/kg) ou com IQG-607 (150 mg/kg), durante 28 dias. No primeiro dia do tratamento, um grupo controle de camundongos infectados foi submetido à eutanásia (grupo controle pré-tratamento). A INH reduziu a esplenomegalia 55 % ( $P < 0,001$ ) e 51 % ( $P < 0,01$ ), comparando com o grupo controle pré-tratamento e com o controle tardio, respectivamente (**Figura 23**). O tratamento com IQG-607 na dose de 150 mg/kg diminuiu 46 % ( $P < 0,01$ ) e 41 % ( $P < 0,05$ ) o peso dos baços dos animais, comparando com os controles pré-tratamento e tardio, respectivamente (**Figura 23**).

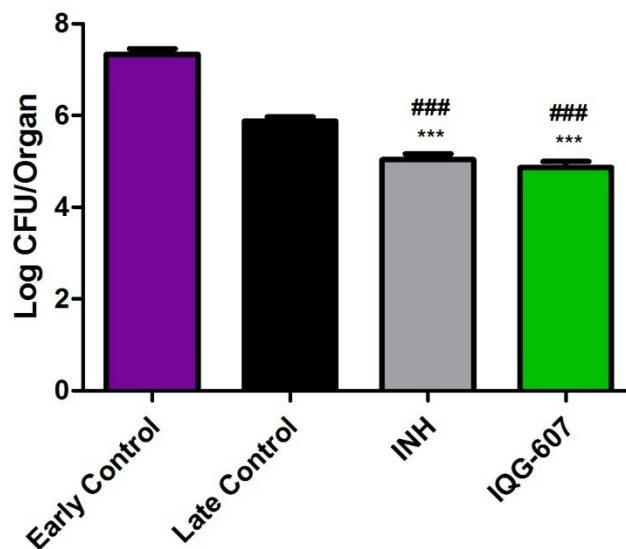
Os tratamentos com INH e com IQG-607 reduziram significativamente a carga micobacteriana nos pulmões (**Figura 24**) e nos baços (**Figura 25**), comparados com os controles pré-tratamento e tardio ( $P < 0,001$  para todas as comparações), um perfil que indica que a atividade do composto IQG-607 seja bactericida, e não bacteriostática (**Figuras 24 e 25**).



**Figura 23:** Pesos dos baços dos camundongos após 28 dias de tratamento com 25 mg/kg de INH e com 150 mg/kg de IQG-607. *Early control* representa o grupo “controle pré-tratamento” e *Late control* representa o grupo “controle tardio”. ###  $P < 0,001$  e ##  $P < 0,01$  comparados ao grupo controle pré-tratamento (Early control); \*\*  $P < 0,01$  e \*  $P < 0,05$  comparados ao grupo controle tardio (Late control). Os resultados representam medias  $\pm$  SEM de 5 a 6 camundongos por grupo.



**Figura 24:** Número de UFC após 30 dias de cultivo dos homogeneizados de pulmões de camundongos infectados com *M. tuberculosis* e tratados com 25 mg/kg de INH e com 150 mg/kg de IQG-607. *Early control* representa o grupo “controle pré-tratamento” e *Late control* representa o grupo “controle tardio”. ###  $P < 0,001$  comparados ao grupo controle pré-tratamento (Early control); \*\*\*  $P < 0,001$  comparados ao grupo controle tardio (Late control). Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM de 5 a 6 camundongos por grupo.



**Figura 25:** Número de UFC após 30 dias de cultivo dos homogeneizados de baços de camundongos infectados com *M. tuberculosis* e tratados com 25 mg/kg de INH e com 150 mg/kg de IQG-607. *Early control* representa o grupo “controle pré-tratamento” e *Late control* representa o grupo “controle tardio”. ###  $P < 0,001$  comparados ao grupo controle pré-tratamento (Early control); \*\*\*  $P < 0,001$  comparados ao grupo controle tardio (Late control). Os resultados representam as médias  $\pm$  SEM de 5 a 6 camundongos por grupo.

---

# Capítulo 4

---

Discussão

---

Perspectivas

---

## Discussão

A urgente necessidade de identificar novas moléculas com potencial antimicrobiano, especialmente compostos eficazes contra as cepas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas, e as dificuldades encontradas no desenvolvimento de tais substâncias são evidentes (Dover and Coxon, 2011, Koul et al., 2011, Russell et al., 2010). Uma nova molécula deveria, idealmente, diminuir a duração do tratamento que prejudica a adesão do paciente à quimioterapia, diminuindo a frequência da administração das doses dos medicamentos. Uma nova droga também deveria apresentar um perfil de toxicidade favorável com relação aos fármacos atualmente disponíveis e poder ser co-administrada com fármacos anti-HIV, sem interações medicamentosas relevantes (Koul et al., 2011). Satisfazer todos estes requisitos de um novo fármaco anti-TB com o perfil mais próximo do ideal dificulta os esforços no desenvolvimento de tais medicamentos.

O desenvolvimento de novos agentes anti-TB requer comprometimento de médio em longo prazo para realizar os trabalhosos e demorados estudos *in vivo* necessários. Consequentemente, poucos novos compostos estão sendo testados atualmente na fase pré-clínica de desenvolvimento de fármacos anti-TB (Dover e Coxon, 2011, De Groote et al., 2011). Novos compostos precisam ser testados em modelos animais a fim de estabelecer parâmetros de tratamento, toxicidade e eficácia antes de chegar à fase clínica de desenvolvimento. É bem conhecido que nenhum modelo animal é ideal para mimetizar todas as características da TB humana, já que cada modelo animal reproduz de maneira incompleta alguns aspectos da doença em humanos (Cosma et al., 2003). Por ser efetivo, prático, favorável em termos de custos e por não requerer quantidades muito elevadas de composto-teste o modelo animal utilizando o camundongo é o modelo de escolha para a triagem de novas substâncias e da combinação de fármacos anti-TB (Cosma et al., 2003, Koul et al., 2011, De Groote et al., 2011). Os agentes que apresentam satisfatória atividade *in vitro* devem, então, ser avaliados em um modelo animal antes de evoluir nos próximos passos do processo de desenvolvimento.



Neste contexto, os compostos IQG-607 e IQG-639 apresentaram atividade inibitória satisfatória contra a enzima InhA de *M. tuberculosis*, em ensaios *in vitro* (Oliveira et al., 2006, Vasconcelos et al., 2008). Além disto, estes dois compostos apresentaram atividade antimicobacteriana *in vitro* quando testados em culturas de *M. tuberculosis* H37Rv e de isolados clínicos resistentes à INH (Basso et al., 2010). Desta maneira, este trabalho teve por objetivo a avaliação *in vivo* da eficácia de ambos os compostos, utilizando o modelo murino de TB.

Primeiramente, validou-se, no nosso laboratório, o modelo de infecção em camundongos machos suíços, infectados através de injeção endovenosa da cepa de *M. tuberculosis* laboratorial virulenta H37Rv. No nosso protocolo experimental, a infecção induziu esplenomegalia, o que já havia sido descrito em outros trabalhos envolvendo infecção micobacteriana em camundongos (Martins de Sousa et al., 2010, Tyagi et al., 2005). Além disto, a visualização macroscópica do aspecto dos pulmões dos animais infectados sugere uma marcante resposta inflamatória e o desenvolvimento consistente de lesões teciduais (Tyagi et al., 2005). Ainda, as características morfológicas da formação do granuloma, a característica patológica mais marcante da TB, consistindo de micobactérias no interior de macrófagos, cercados por uma rede linfocitária formando estruturas organizadas (Russell et al., 2010) foram observadas nos pulmões dos camundongos infectados.

As atividades *in vivo* do IQG-607 e IQG-639 foram avaliadas após a administração destes compostos a camundongos infectados com a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, sensível à INH. Inicialmente, foram comparadas as atividades da INH a 25 mg/kg, IQG-607 250 mg/kg e IQG-639 250 mg/kg, em um regime de tratamento de 4 semanas. No nosso segundo experimento, aumentou-se o período de administração das drogas para 8 semanas, usando as mesmas doses empregadas no protocolo de 4 semanas. Os resultados mostraram que o tratamento com o fármaco de referência INH ou o composto teste IQG-607 diminuiu efetivamente as lesões pulmonares, de acordo com a análise macroscópica. Além disto, foi evidenciado que o IQG-607 diminuiu a esplenomegalia induzida pela infecção, com percentagens de redução estatisticamente similares àquelas encontradas no grupo tratado com o fármaco INH, controle positivo, em ambos os esquemas de tratamento,

28 e 56 dias. Ainda, a INH ou o IQG-607 reverteram completamente a esplenomegalia induzida pela infecção a níveis estatisticamente comparáveis ao grupo não infectado, após 56 dias de tratamento.

Com relação às contagens de UFC, o IQG-607 foi capaz de reduzir a carga bacteriana tanto nos baços quanto nos pulmões. As contagens de UFC nestes dois órgãos foram significativamente mais baixas do que os controles não tratados após 4 e 8 semanas de tratamento. O IQG-607 reduziu pelo menos 2 e 1  $\log_{10}$  as contagens de células micobacterianas viáveis nos pulmões e baços, respectivamente, após 28 dias de tratamento. Após 56 dias de tratamento, este composto reduziu pelo menos 3 e 2  $\log_{10}$  de UFC nos pulmões e baços, respectivamente. A eficácia do IQG-607 na dose de 250 mg/kg não foi significativamente diferente da observada para a INH a 25 mg/kg, quando consideradas as contagens de UFC dos pulmões e baços, após 4 ou 8 semanas de tratamento.

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, é tentador sugerir que o IQG-607 possa representar uma molécula líder para o desenvolvimento de novas estratégias anti-TB. O fato de este composto apresentar uma atividade bastante satisfatória no nosso modelo indica que ele é absorvido e atinge os pulmões após administração por via oral, sendo, também, capaz de atravessar a membrana do macrófago para alcançar os bacilos do interior dos macrófagos.

Entretanto, o IQG-639 na dose de 250 mg/kg não foi capaz de modificar significativamente nenhum parâmetro avaliado, mesmo após o experimento mais prolongado, usando 56 dias de tratamento. Poderia ser especulado que o IQG-639 não alcança os compartimentos intracelulares dos macrófagos pulmonares, ou que ele não é absorvido após administração oral. Ainda, este composto poderia ser inativado por algum mecanismo desconhecido, o que poderá ser esclarecido em outros estudos. Agentes que possuam atividade *in vitro* favorável, mas que falham em apresentar atividade *in vivo*, como o IQG-639, podem ser submetidos a manipulações que aumentem sua absorção ou permitam a entrada nos macrófagos. Desta maneira, nós decidimos utilizar apenas o IQG-607 para os próximos experimentos.

Nosso terceiro experimento foi planejado a fim de avaliar se a atividade do IQG-607 segue um padrão de dose-resposta. Administrou-se, então, o IQG-607 nas doses de 5, 10, 25, 50, 100, 200 e 250 mg/kg durante 28 dias em camundongos infectados com *M. tuberculosis* usando, ainda, a INH a 25 mg/kg como controle positivo do tratamento. No experimento de dose-resposta, os tratamentos com as doses de 10, 25, 50, 100, 200 e 250 mg/kg do IQG-607 diminuíram significativamente os pesos dos baços e notavelmente reduziram as cargas bacterianas dos baços e pulmões, quando comparados ao grupo infectado e não tratado. Notavelmente, não há nenhuma diferença estatisticamente significativa entre grupos que foram tratados com IQG-607 (nas doses de 10, 25, 50, 100, 200 e 250 mg/kg) e com INH, para a esplenomegalia ou para as contagens de UFC dos baços e pulmões. Por sua vez, o grupo tratado com a dose de 5 mg/kg de IQG-607 não apresentou alteração significativa em nenhum dos parâmetros analisados, quando comparado com o grupo controle. Considerando estes resultados, pode-se concluir que o IQG-607 apresentou um perfil dose-dependente no nosso modelo murino de TB e que a dose mais baixa testada que foi capaz de demonstrar atividade significativa foi a de 10 mg/kg.

Considerando os pesos moleculares da INH e do IQG-607, pode-se observar que uma dose mais baixa de IQG-607 (22  $\mu\text{mol/kg}$ ) produziu resultados estatisticamente similares com relação aos parâmetros analisados em comparação à INH (182  $\mu\text{mol/kg}$ ). Comparados aos nossos resultados, um estudo publicado recentemente demonstrou percentagens de redução na carga bacteriana nos pulmões e baços similares, nos grupos tratados com 25 mg/kg de INH, usando um esquema experimental semelhante ao apresentado por este trabalho, embora eles tenham empregado camundongos BALB/c fêmeas e tenham tratado estes animais por 5 dias na semana (Lu et al., 2010). Estas semelhanças foram observadas em ambos os períodos de tratamento, 28 e 56 dias (Lu et al., 2010). Os nossos resultados do tratamento com INH foram consistentes com os de outros estudos publicados previamente (Cynamon et al., 1999b, Jia et al., 2005, Klemens et al., 1994).

Similarmente ao IQG-607, o composto nitroimidazopirano PA-824 e, a oxazolidina PNU-100480 (ambos a 100 mg/kg) apresentaram atividades

antimicrobianas comparáveis àquelas da INH, quando estes compostos foram testados na fase pré-clínica, usando o sistema murino, como foi utilizado neste trabalho (Cynamon et al., 1999a, Tyagi et al., 2005). Por outro lado, o composto diamina SQ109 (25 mg/kg) foi menos potente que o controle positivo INH, embora tenha causado reduções nas UFC tanto nos pulmões como nos baços comparáveis àquelas do outro fármaco anti-TB usado como controle positivo, o etambutol (Jia et al., 2005).

Cabe ressaltar que a dose de IQG-607 usada no tratamento dos animais infectados durante 28 e 56 dias, 250 mg/kg, foi escolhida de acordo com os ensaios de toxicidade aguda após administração oral, onde as doses de 250 e 500 mg/kg não causaram nenhum sinal clínico de toxicidade nem mortalidade nos camundongos machos e fêmeas, sugerindo, assim, características toxicológicas favoráveis. A INH, por sua vez, causou 80 % de mortes em camundongos após administração de dose única de 250 mg/kg (Basso et al., 2010). Baseando-se nos dados de eficácia apresentados neste trabalho, temos sólida evidência que o IQG-607 é absorvido após administração por via oral, sem causar nenhuma toxicidade aparente em camundongos. Ainda, demonstramos neste trabalho que o composto IQG-607 tem atividade notavelmente bactericida.

No nosso estudo experimental, o modelo utilizando camundongos suíços pareceu útil para a avaliação do potencial de novos agentes a serem utilizados na quimioterapia anti-TB. Foi notável que o composto IQG-607 apresentou significativa atividade bactericida contra *M. tuberculosis* H37Rv em camundongos infectados. A promissora atividade anti-TB *in vivo* do composto IQG-607 demonstrada neste trabalho sugere que ele possa representar um candidato promissor para o desenvolvimento clínico de um novo agente antimicobacteriano.

## Perspectivas

Mutações no gene que codifica a enzima micobacteriana KatG são as alterações genéticas mais comuns associadas à resistência à INH. Especificamente, a substituição da Serina da posição 315 por uma Treonina no gene *katG* (S315T) causa a grande maioria dos casos de resistência à INH, e é encontrada em cerca de 50 a 90 % das cepas resistentes a este fármaco. A resistência à INH também pode ser causada devido a mutações na região promotora do gene *inhA* e as alterações geralmente encontradas nesta região regulatória estão entre os nucleotídeos - 8 e - 24. A mutação mais comum encontrada no gene *inhA* ocorre na sua região promotora, a substituição da Cisteína da posição - 15 por uma Treonina, C(-15)T, em aproximadamente 15 % dos casos (Almeida da Silva e Palomino, 2011, Sajduda et al., 2004).

Pesquisadores brasileiros realizaram um estudo, publicado em 2003, no qual se avaliou o perfil de mutações presente em isolados clínicos resistentes à INH de pacientes brasileiros. Os resultados mostraram a maior ocorrência de mutações no gene *katG* (mutação S315T), além da ocorrência substancial de mutações na região regulatória do gene *inhA*. Estes pesquisadores, gentilmente, doaram ao nosso grupo cepas de *M. tuberculosis* resistentes à INH e contendo as seguintes mutações: C(-15)T na região regulatória do gene *inhA* e S315T no gene *katG*, derivadas dos isolados clínicos utilizados no estudo publicado por eles (Silva et al., 2003). Estas cepas estão, atualmente, sendo mantidas e cultivadas no nosso laboratório.

Considerando a atividade satisfatória do composto IQG-607 em camundongos infectados com a cepa laboratorial e virulenta H37Rv de *M. tuberculosis*, pretendemos avaliar a atividade deste composto em camundongos infectados com cepas de *M. tuberculosis* resistentes à INH e contendo as seguintes mutações: C(-15)T na região regulatória do gene *inhA* e S315T no gene *katG*.

---

# Referências

---

## Referências

- ALMEIDA DA SILVA, P. E. & PALOMINO, J. C. 2011. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1417-1430.
- ANDERS, H. J. & VIELHAUER, V. 2007. Identifying and validating novel targets with in vivo disease models: Guidelines for study design. *Drug Discovery Today*, 12, 446-451.
- AOUAM, K., CHAABANE, A., LOUSSAIEF, C., BEN ROMDHANE, F., BOUGHATTAS, N. A. & CHAKROUN, M. 2007. Adverse effects of antitubercular drugs: epidemiology, mechanisms, and patient management. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, 37, 253-261.
- ARBEX, M. A., VARELLA, M. C. L., DE SIQUEIRA, H. R. & MELLO, F. A. F. 2010. Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: First-line drugs. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 36, 626-640.
- BANERJEE, A., DUBNAU, E., QUEMARD, A., BALASUBRAMANIAN, V., UM, K. S., WILSON, T., COLLINS, D., DELISLE, G. & JACOBS, W. R. 1994. *InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 263, 227-230.
- BASSO, L. A. & BLANCHARD, J. S. 1998. Resistance to antitubercular drugs. *Resolving the Antibiotic Paradox: Progress in Understanding Drug Resistance and Development of New Antibiotics*, 456, 115-144.
- BASSO, L. A., SCHNEIDER, C. Z., DOS SANTOS, A. J. A. B., DOS SANTOS, A. A., JR., CAMPOS, M. M., SOUTO, A. A. & SANTOS, D. S. 2010. An Inorganic Complex that Inhibits *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl Reductase as a Prototype of a New Class of Chemotherapeutic Agents to Treat Tuberculosis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21, 1384-1389.
- BRENNAN, P. J. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83, 91-97.
- COSMA, C. L., SHERMAN, D. R. & RAMAKRISHNAN, L. 2003. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 57, 641-676.
- CYNAMON, M. H., KLEMENS, S. P., SHARPE, C. A. & CHASE, S. 1999a. Activities of several novel oxazolidinones against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 1189-1191.
- CYNAMON, M. H., ZHANG, Y., HARPSTER, T., CHENG, S. & DESTEFANO, M. S. 1999b. High-dose isoniazid therapy for isoniazid-resistant murine *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 2922-2924.

- DE GROOTE, M. A., GILLILAND, J. C., WELLS, C. L., BROOKS, E. J., WOOLHISER, L. K., GRUPPO, V., PELOQUIN, C., ORME, I. M. & LENAERTS, A. J. 2011. Comparative studies evaluating mouse models used for efficacy testing of experimental drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 1237-1247.
- DE SIQUEIRA, H. R., DUTRA DE FREITAS, F. A., DE OLIVEIRA, D. N., WERNECK BARRETO, A. M., DALCOLMO, M. P. & ALBANO, R. M. 2009. Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains arising from mutations in two different regions of the katG gene. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 35, 773-779.
- DORMAN, S. E. & CHAISSON, R. E. 2007. From magic bullets back to the Magic Mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nature Medicine*, 13, 295-298.
- DOVER, L. G. & COXON, G. D. 2011. Current Status and Research Strategies in Tuberculosis Drug Development. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 6157-6165.
- DUCATI, R. G., RUFFINO-NETTO, A., BASSO, L. A. & SANTOS, D. S. 2006. The resumption of consumption -- a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101, 697-714.
- DUNCAN, K. 2003. Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis*, 83, 201-207.
- GUO, H., SEET, Q., DENKIN, S., PARSONS, L. & ZHANG, Y. 2006. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. *J Med Microbiol*, 55, 1527-31.
- HAAS, W. H., SCHILKE, K., BRAND, J., AMTHOR, B., WEYER, K., FOURIE, P. B., BRETZEL, G., STICHT-GROH, V. & BREMER, H. J. 1997. Molecular analysis of katG gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrob Agents Chemother*, 41, 1601-3.
- HOFLING, C. C., PAVAN, E. M., GIAMPAGLIA, C. M. S., FERRAZOLI, L., AILY, D. C. G., DE ALBUQUERQUE, D. M. & RAMOS, M. C. 2005. Prevalence of katG Ser315 substitution and rpoB mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 9, 87-93.
- JIA, J., TOMASZEWSKI, J. E., HANRAHAN, C., COWARD, L., NOKER, P., GORMAN, G., NIKONENKO, B. & PROTOPOPOVA, M. 2005. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of SQ109, a new diamine-based antitubercular drug. *British Journal of Pharmacology*, 144, 80-87.
- JIAO, W. W., IGOR, M., SUN, G.-Z., LI, M., LIU, J. W., OLGA, N. & SHEN, A. D. 2007. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant



- Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China. *Chinese Medical Journal*, 120, 814-819.
- KAUFMANN, S. H. E. 2003. A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: Those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis*, 83, 86-90.
- KLEMENS, S. P., GROSSI, M. A. & CYNAMON, M. H. 1994. Activity of KRM-1648, a new benzoxazinorifamycin, against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother*, 38, 2245-8.
- KOUL, A., ARNOULT, E., LOUNIS, N., GUILLEMONT, J. & ANDRIES, K. 2011. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*, 469, 483-490.
- KREMER, L., DOVER, L. G., MORBIDONI, H. R., VILCHEZE, C., MAUGHAN, W. N., BAULARD, A., TU, S. C., HONORE, N., DERETIC, V., SACCHETTINI, J. C., LOCHT, C., JACOBS, W. R. & BESRA, G. S. 2003. Inhibition of InhA activity, but not KasA activity, induces formation of a KasA-containing complex in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 20547-20554.
- LAURENZO, D. & MOUSA, S. A. 2011. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and current status of rapid molecular diagnostic testing. *Acta Tropica*, 119, 5-10.
- LOEWENBERG, S. 2012. India reports cases of totally drug-resistant tuberculosis. *The Lancet*, 379, 205.
- LU, J., YUE, J., WU, J., LUO, R., HU, Z., LI, J., BAI, Y., TANG, Z., XIAN, Q., ZHANG, X. & WANG, H. 2010. In vitro and in vivo Activities of a New Lead Compound I2906 against *Mycobacterium tuberculosis*. *Pharmacology*, 85, 365-371.
- MA, Z., LIENHARDT, C., MCILLERON, H., NUNN, A. J. & WANG, X. 2010. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *Lancet*, 375, 2100-9.
- MANABE, Y. C. & BISHAI, W. R. 2000. Latent *Mycobacterium tuberculosis* - persistence, patience, and winning by waiting. *Nature Medicine*, 6, 1327-1329.
- MARTINS DE SOUSA, E., BONFIM DE BORTOLI, F., AMARAL, E. P., BATISTA, A. C., LIBERMAN KIPNIS, T., MARQUES CARDOSO, A., KIPNIS, A. & JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. 2010. Acute immune response to *Mycobacterium massiliense* in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect Immun*, 78, 1571-81.
- O'BRIEN, R. J. & NUNN, P. P. 2001. The need for new drugs against tuberculosis - Obstacles, opportunities, and next steps. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163, 1055-1058.
- OLIVEIRA, J. S., DE SOUSA, E. H. S., DE SOUZA, O. N., MOREIRA, I. S., SANTOS, D. S. & BASSO, L. A. 2006. Slow-onset inhibition of 2-trans-

- enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 2409-2424.
- OLIVEIRA, J. S., SOUSA, E. H. S., BASSO, L. A., PALACI, M., DIETZE, R., SANTOS, D. S. & MOREIRA, I. S. 2004. An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemical Communications*, 312-313.
- POPOVA, N. A., KRASOVITSKY, B. M., PIVNENKO, N. S. & SUROV, Y. N. 1997. Synthesis and spectral properties of 2-methyl-5-aryl-1,3,4-oxadiazoles. *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii*, 816-821.
- ROBERTSON, J. G. 2007. Enzymes as a special class of therapeutic target: clinical drugs and modes of action. *Current Opinion in Structural Biology*, 17, 674-679.
- ROZWARSKI, D. A., GRANT, G. A., BARTON, D. H. R., JACOBS, W. R. & SACCHETTINI, J. C. 1998. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 279, 98-102.
- RUSSELL, D. G. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: Here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 569-577.
- RUSSELL, D. G., BARRY, C. E., III & FLYNN, J. L. 2010. Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. *Science*, 328, 852-856.
- SAJDUDA, A., BRZOSTEK, A., POPLAWSKA, M., AUGUSTYNOWICZ-KOPEC, E., ZWOLSKA, Z., NIEMANN, S., DZIADEK, J. & HILLEMANN, D. 2004. Molecular characterization of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *J Clin Microbiol*, 42, 2425-31.
- SCHROEDER, E. K., DE SOUZA, N., SANTOS, D. S., BLANCHARD, J. S. & BASSO, L. A. 2002. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Pharm Biotechnol*, 3, 197-225.
- SILVA, M. S., SENNA, S. G., RIBEIRO, M. O., VALIM, A. R., TELLES, M. A., KRITSKI, A., MORLOCK, G. P., COOKSEY, R. C., ZAHA, A. & ROSSETTI, M. L. 2003. Mutations in katG, inhA, and ahpC genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 41, 4471-4.
- SOUSA, E. H., PONTES, D. L., DIÓGENES, I. C., LOPES, L. G., OLIVEIRA, J. S., BASSO, L. A., SANTOS, D. S. & MOREIRA, I. S. 2005. Electron transfer kinetics and mechanistic study of the thionicotinamide coordinated to the pentacyanoferrate(III)/(II) complexes: a model system for the in vitro activation of thioamides anti-tuberculosis drugs. *J Inorg Biochem*, 99, 368-75.
- TYAGI, S., NUERMBERGER, E., YOSHIMATSU, T., WILLIAMS, K., ROSENTHAL, I., LOUNIS, N., BISHAI, W. & GROSSET, J. 2005. Bactericidal activity of the nitroimidazopyran PA-824 in a murine model of tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 2289-2293.

- UDWADIA, Z. F., AMALE, R. A., AJBANI, K. K. & RODRIGUES, C. 2011. Totally drug-resistant tuberculosis in India. *Clinical Infectious Diseases*, 54, 579-81.
- VASCONCELOS, I., MEYER, E., SALES, F., MOREIRA, I., BASSO, L. A. & SANTOS, D. S. 2008. The mode of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* wild-type and isoniazid-resistant 2-trans-enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes by an inorganic complex. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 7, 13.
- VELAYATI, A. A., FARNIA, P., MASJEDI, M. R., IBRAHIM, T. A., TABARSI, P., HAROUN, R. Z., KUAN, H. O., GHANA VI, J. & VARAHRAM, M. 2009a. Totally drug-resistant tuberculosis strains: evidence of adaptation at the cellular level. *European Respiratory Journal*, 34, 1202-1203.
- VELAYATI, A. A., MASJEDI, M. R., FARNIA, P., TABARSI, P., GHANA VI, J., ZIAZARIFI, A. H. & HOFFNER, S. E. 2009b. Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli Super Extensively Drug-Resistant Tuberculosis or Totally Drug-Resistant Strains in Iran. *Chest*, 136, 420-425.
- VEZIRIS, N. & ROBERT, J. 2010. Anti-tuberculosis drug resistance and therapeutic dead end. *Med Sci (Paris)*, 26, 976-80.
- VILCHEZE, C., MORBIDONI, H. R., WEISBROD, T. R., IWAMOTO, H., KUO, M., SACCHETTINI, J. C. & JACOBS, W. R. 2000. Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 182, 4059-4067.
- WHO 2011. Global Tuberculosis Control.
- YOUNG, D., STARK, J. & KIRSCHNER, D. 2008. Systems biology of persistent infection: tuberculosis as a case study. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 520-528.

---

# Anexo A

---

Carta de Aprovação pelo  
Comitê de Ética para o Uso  
de Animais

---

CEUA, PUC-RS, 2009

---



Ofício 059/09 - CEUA

Porto Alegre, 04 de junho de 2009.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00094, intitulado: **"Avaliação farmacológica e toxicológica de complexos inorgânicos derivados da isoniazida em modelo de tuberculose em camundongos"** e, sugere as reflexões em anexo.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios do andamento do projeto devem ser entregues a este Comitê.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Anamaria Feijó  
Coordenadora do CEUA - PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos  
CPBMF/TECNO PUC  
N/Universidade

PUCRS

**Campus Central**

Av. Ipiranga, 6690 - Prédio 60 sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)

---

# Anexo B

---

Activity of IQG-607, a New Orally Active Compound in a Murine Model of *Mycobacterium tuberculosis* Infection

---

V.S. Rodrigues-Junior, A.A. dos Santos Jr., A.J. dos Santos, C.Z. Schneider, J.B. Calixto, E.H. Sousa, L.G.F. Lopes, A.A. Souto, L.A. Basso, D.S. Santos, M.M. Campos

---

Manuscrito aceito para publicação no periódico *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012.

---

**Date:** May 21, 2012  
**To:** "Maria Martha Campos" camposmmartha@yahoo.com  
**From:** "International Journal of Antimicrobial Agents" ijaa@elsevier.com  
**Subject:** Your Submission IJAA-D-12-00266R1

---

Ms. Ref. No.: IJAA-D-12-00266R1  
Title: Activity of IQG-607, a new orally active compound in a murine model of Mycobacterium tuberculosis infection  
International Journal of Antimicrobial Agents

Dear Dr. Campos,

I am pleased to confirm that your paper "Activity of IQG-607, a new orally active compound in a murine model of Mycobacterium tuberculosis infection" has been accepted for publication in International Journal of Antimicrobial Agents and has now been forwarded to the Publisher.

You will receive proofs in due course.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Professor Alasdair Geddes  
Editor-in-Chief  
International Journal of Antimicrobial Agents

---

**Activity of IQG-607, a new orally active compound in a murine model of  
*Mycobacterium tuberculosis* infection**

Running Title: Anti-tuberculosis activity of IQG-607 in mice

Valnês da Silva Rodrigues-Junior<sup>a,b,†</sup>, André dos Santos Junior<sup>a,c,†</sup>, Anderson Jader dos Santos<sup>a</sup>, Christopher Zandoná Schneider<sup>a</sup>, João Batista Calixto<sup>d</sup>, Eduardo Henrique Silva Sousa<sup>e</sup>, Luiz Gonzaga de França Lopes<sup>e</sup>, André Arigony Souto<sup>f</sup>, Luiz Augusto Basso<sup>a,b,c</sup>, Diógenes Santiago Santos<sup>\*,a,b,c</sup>, Maria Martha Campos<sup>\*,a,b,g</sup>

<sup>a</sup>Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681 –Prédio 92A Tecnopuc, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil, Phone/Fax: +55 51 33203629

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>e</sup>Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Laboratório de Bioinorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

<sup>f</sup>Faculdade de Química, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>g</sup>Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work

**\*Corresponding authors:** Maria M. Campos or Diógenes S. Santos

Av. Ipiranga 6681, Tecnopuc, Prédio 92A, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone/Fax: +55 51 33203629;

E-mail: camposmmartha@yahoo.com or diogenes@pucrs.br



## ABSTRACT

We have previously demonstrated a potent in vitro inhibitory activity for two pentacyano(isoniazid)ferrate(II) compounds, namely IQG-607 and IQG-639 against the *M. tuberculosis* enoyl-ACP reductase enzyme. Importantly, IQG-607 and IQG-639 were active against cultures of *M. tuberculosis* H37Rv and two isoniazid-resistant clinical isolates in vitro. In the present study, the activity of these compounds was evaluated by using an in vivo murine model of tuberculosis. Swiss mice were infected with *M. tuberculosis* H37Rv strain, and IQG-607 and IQG-639 (250 mg/kg) were administered during 28 or 56 days. As well, a dose-response study was performed with IQG-607 (at 5, 10, 25, 50, 100, 200 and 250 mg/kg). The activity of test compounds was compared with that of the positive control drug isoniazid at 25 mg/kg. After 28 or 56 days of treatment, either IQG-607 or isoniazid significantly reduced *M. tuberculosis*-induced splenomegaly, and also significantly diminished the colony-forming units in both spleens and lungs. IQG-607 or isoniazid ameliorated the lung macroscopic aspect, reducing the lung lesions to a similar extent. However, IQG-639 was not capable of significantly modifying any evaluated parameter. In addition, experiments using early and late controls of infection revealed a bactericidal activity for IQG-607 in our model. The promising activity of IQG-607 in *M. tuberculosis*-infected mice suggests that this compound might represent a good candidate for clinical development as a new antimycobacterial agent.

## 1. Introduction

Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis*, remains a major global health concern. According to the World Health Organization, TB was responsible for the occurrence of 1.3 million deaths in 2009, and currently represents the main cause of human death due to a single pathogen [1,2]. Increasing HIV-TB co-infections [2], the emergence of multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) [3], and, more recently, of totally drug-resistant strains (TDR) [4,5] have increased the need for developing new drugs to treat TB. Ideally, novel anti-TB drugs should be effective against the resistant strains, decreasing the length of the treatment thereby improving patients' compliance, with lower dose frequency, minimal drug-drug interactions and reduced toxicity issues [1].

Isoniazid (INH, Figure 1A) is the most prescribed drug for active TB and prophylaxis. It has been demonstrated that its primary target is the *M. tuberculosis* 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) reductase enzyme (InhA) [6]. Furthermore, INH is a pro-drug, activated by the mycobacterial *KatG*-encoded catalase-peroxidase enzyme in the presence of manganese ions, NAD(H), and oxygen [7]. Unfortunately, the use of INH has been allied to a series of collateral effects, especially neurotoxic and hepatotoxic side effects [8].

Our group has described a new approach to the rational design of an INH analog based on an inorganic group (a pentacyanoferrate III/II) attached to the nitrogen atom of the heterocyclic ring of INH, which inhibits a validated target (InhA) [9]. The metal center can promote an electron transfer reaction that mimics the *in vitro* activation of INH by *KatG* enzyme [9]. In fact, our group has also proved that this new compound pentacyano(isoniazid)ferrate(II) (named IQG-607, Figure 1B) does not require the activation by *KatG* or any other enzyme to bind to its probable molecular target, the *M. tuberculosis* InhA [10]; this profile might help to overcome an important mechanism of INH-resistance, the mutations in the *katG* gene. Moreover, our group has demonstrated that IQG-607 is able to inhibit the *in vitro* activity of wild-type and INH-resistant (I21V, I47T and S94A) *M. tuberculosis* InhA enzymes. In addition, this compound dissociates from the wild-type and INH-resistant InhA enzymes more slowly than INH [11]. Slow

rates of dissociation are expected when we intend to reach higher inhibitory effectiveness and, therefore, the intervals between the doses administered to patients can be longer. Noteworthy, another new compound containing a pentacyanoferrate and an oxadiazole moiety, pentacyano(2-metil-5-(piridin-4-il)-1,3,4-oxadiazole)ferrate(II), (denoted IQG-639, Figure 1C) was also found to be able to inhibit the in vitro activity of wild-type and INH-resistant (S94A) *M. tuberculosis* InhA enzymes (I. B. Vasconcelos, D. S. Santos and L. A. Basso, unpublished data).

Noteworthy, both IQG-607 [12] and IQG-639 (C. Z. Schneider and D. S. Santos, unpublished data), were active against cultures of *M. tuberculosis* H37Rv and two INH-resistant clinical isolates, showing a satisfactory efficacy in vitro. Importantly, we have established toxicological parameters in mice to determine the safety of IQG-607 [12] and IQG-639 (A. A. Santos Jr., M. M. Campos and D. S. Santos, unpublished data) and to guide us in the next in vivo tests. Furthermore, 90-days repeated-doses toxicological studies in rats revealed a very favorable outcome for IQG-607 (J. B. Calixto, unpublished data). It thus appears warranted to examine the potential in vivo anti-TB activity of these two new compounds, IQG-607 and IQG-639. Accordingly, the present work aimed at describing the preclinical evaluation of IQG-607 and IQG-639 in a murine model of TB.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Animals**

In this study, male Swiss mice (25 to 30 g) obtained from the Central Biotery of Universidade Federal de Pelotas (Brazil) were used. Mice were maintained during both infection and treatment procedures in the Preclinical Tests Laboratory, located at INCT-TB-PUCRS. Animals were maintained at temperature- ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and humidity-controlled room (60-80%) with a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM), and food and water available ad libitum. Mice were adapted to the laboratory for a period of 1 week before infection.

### **2.2. Drugs and reagents**

Isoniazid was purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). IQG-607 was synthesized according to Oliveira et al. (2006). IQG-639 had its 2-metil-5-(piridin-4-il)-1,3,4-oxadiazole complex synthesized as previously described [13], and the product was further coordinated to the pentacyanoferrate(II) moiety according to Oliveira et al. (2006). IQG-607 and IQG-639 had their chemical structures characterized as reported previously [9]. All drugs were dissolved in saline solution. Drug solutions were prepared freshly, prior to administration and were protected from light and heat.

### **2.3. Bacterial strain**

Virulent *M. tuberculosis* H37Rv reference strain (ATCC 27294) was maintained in Ogawa solid medium at  $4^\circ\text{C}$  and subcultured in Ogawa medium at  $37^\circ\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  environment for approximately 5 weeks. *M. tuberculosis* colonies were carefully scraped and suspended in sterile 0.9% saline solution containing 0.05% Tween-80 (Sigma-Aldrich). This cell suspension was vortexed with sterile glass beads (4 mm) for 5 min to disrupt clumps, and it was allowed to settle for 30 min. The supernatant was measured spectrophotometrically in a total volume of 1 ml at an absorbance of 600 nm. Subsequently, the suspension was appropriately diluted to achieve an optical density of 0.8 at 600 nm, which corresponds to  $2 \times 10^8$  cells/ml. The *M. tuberculosis* suspension was aliquotted and frozen at  $-20^\circ\text{C}$ . On the day of

infection, a single aliquot was thawed, diluted and the final inoculum was determined. The final inoculum size was determined by using three different dilutions ( $10^4$ -,  $10^5$ - and  $10^6$ -fold), and plating 100  $\mu$ l in duplicate on Middlebrook 7H10 agar (Difco) plates supplemented with 10% (v/v) Middlebrook OADC enrichment (oleic acid, albumin, dextrose, catalase; Becton Dickinson). Plates were incubated at 37°C for 4 weeks, and colony-forming unit (CFU) counts from the thawed bacterial suspension were determined.

#### **2.4. Infection procedures**

Mice were infected intravenously (i.v.) through the retro-orbital venous plexus, according to the technique previously described [14,15], with minor modifications. Groups of six mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of a mixture containing ketamine (100 mg/kg, Cristália) and xylazine (10 mg/kg, Vetbrands), and subsequently infected with  $10^6$  to  $10^7$  viable *M. tuberculosis* H37Rv cells suspended in 200  $\mu$ l of saline solution. The infection model adopted by us has been validated beforehand, as a useful model of in vivo *M. tuberculosis* infection [16]. For each experiment, a non-infected control group of six animals received saline solution by the i.v. route. Efficiency of the infection protocol was confirmed by Ziehl-Neelsen staining of lung slices.

#### **2.5. Treatment schemes**

Following infection, mice were randomly divided into treatment groups with six animals each. Treatment was started 7 days post-infection and drugs were administered daily (7 days/week) by oral gavage. Our study involved three separate experimental groups. The first chemotherapeutic experiment consisted in a 28-day schedule of treatment. To assess the impact of increasing the period of drug administration, we designed the second chemotherapeutic regimen, which consisted of 56 days of treatment. For both the first and second regimens, treatment groups received IQG-607 (250 mg/kg, which corresponds to 560  $\mu$ mol/kg), or IQG-639 (250 mg/kg or 532  $\mu$ mol/kg).

The experiment 3 was carried out to evaluate the dose-response pattern of the compound IQG-607, also aiming to compare its potency to that of INH. For this purpose, we have divided *M. tuberculosis*-infected mice into groups of treatment, which received different daily doses of IQG-607 (5, 10, 25, 50, 100, 200 and 250 mg/kg, which correspond to 11, 22, 56, 112, 224, 448 and 560  $\mu\text{mol/kg}$ , respectively) for 28 days. INH (25 mg/kg or 182  $\mu\text{mol/kg}$ ) [14-18] was given as a positive treatment control in all experiments. Negative control group (non-infected mice) and the disease-positive group (infected and non-treated) received saline solution during the treatment period.

## **2.6. Assessment of treatment efficacy**

The treatment efficacy was assessed on the basis of lung and spleen CFU counts and splenomegaly. Mice were euthanized by isoflurane (Cristália) inhalation, 3 to 5 days after the last dose of drugs. The spleens and the left lung were removed under aseptic conditions. Additionally, the spleens had their weight measured aseptically. Both lungs and spleens were separately placed in 3 ml of saline solution and disrupted in a glass tissue homogenizer. The number of viable organisms was determined by plating serial dilutions of homogenates on Middlebrook 7H10 agar (Difco) plates containing 10% Middlebrook OADC enrichment (Becton Dickinson). Plates were incubated at 37°C for 4 weeks in a 5% CO<sub>2</sub> environment prior to the counting of viable *M. tuberculosis* cells.

## **2.7. Evidence for bactericidal effects**

In order to investigate the bactericidal activity of the compound IQG-607, a fourth experimental set was performed. Seven days after infection, infected mice received INH (25 mg/kg or 182  $\mu\text{mol/kg}$ ) or IQG-607 (150 mg/kg or 336  $\mu\text{mol/kg}$ ) for 28 days. A group of six infected mice were sacrificed at the start of treatment, as pretreatment controls (early control group) [14,15] and the number of viable organisms in spleen and lungs was determined as stated above. Additionally, infected and untreated mice were sacrificed after therapy was given (late control group).

## **2.8. Statistical analysis**

To compare cell counts recovered from spleens and lungs of mice, the numbers were firstly converted into logarithms of CFU ( $\log_{10}$  CFU). The spleen weight was previously corrected with the body weight from each animal (spleen weight/body weight). Data were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's post-test, using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant at the 95% level of confidence.

### 3. Results

#### 3.1. Evaluation of the activity of IQG-607 and IQG-639 after 28 days of treatment

The purpose of this experiment was to evaluate the treatment efficacy of IQG-607 and IQG-639 in the mouse model of TB. *M. tuberculosis*-infected mice were treated daily with INH (25 mg/kg), IQG-607 (250 mg/kg), and IQG-639 (250 mg/kg) for 28 days. After 5 days of the last dose administration, mice were sacrificed, the spleen weights were determined and the macroscopic aspect of the lungs was evaluated. In addition, spleen and lungs were homogenized and cultivated in specific medium for mycobacterial growth.

We have observed a marked splenomegaly in the infected group, in relation to those mice that received saline through the same route. Infected mice showed a 261 % increase in the spleen weights ( $P < 0.001$ ), when compared to the non-infected group. We have also verified the clinical aspect of the lungs, and it was possible to macroscopically visualize the tissue damage of this organ, with many tubercles distributed over the lung surface, when comparing to the non-infected group (Supplementary data). We have additionally performed Ziehl-Neelsen staining from a histological lung section of an infected animal, which confirmed the typical granuloma structure formation, with acid-fast bacilli within macrophages surrounded by lymphocytes (Supplementary data), indicating the success of our infection protocol.

Spleen weights were 58 % ( $P < 0.001$ ) and 50 % ( $P < 0.001$ ) lower in INH- and IQG-607-treated animals when compared to untreated controls. Both INH and IQG-607 treatments ameliorated the lung macroscopic aspect, by reducing the lung lesions in relation to the untreated group (Supplementary data). Furthermore, CFU counting results from INH-treated mice were  $2.37 \log_{10}$  ( $P < 0.001$ ) and  $1.77 \log_{10}$  ( $P < 0.001$ ) lower than those from untreated group in the lungs and spleen, respectively (Table 1). Importantly, significant differences in the bacterial loads were observed between IQG-607-treated mice and untreated controls:  $2.37 \log_{10}$  ( $P < 0.001$ ) in the lungs and 1.4



$\log_{10}(P < 0.001)$  in the spleen (Table 1). No significant difference in CFU loads was observed after IQG-639 treatment (Table 1).

### **3.2. Evaluation of the activity of IQG-607 and IQG-639 after 56 days of treatment**

In this set of experiments, IQG-607 (250 mg/kg), IQG-639 (250 mg/kg) and INH (25 mg/kg) were each dosed 7 days a week for 56 days to *M. tuberculosis*-infected mice. The mean of spleen weight was 239 % higher in the infected mice ( $P < 0.001$ ) compared to non-infected group. Spleen weights were 66 % ( $P < 0.001$ ) and 67 % ( $P < 0.001$ ) lower in INH- and IQG-607-treated animals, respectively, when compared to untreated controls. On the other hand, 56 days of treatment with IQG-639 was not sufficient to obtain a significant difference of this parameter (data not shown). Treatment with INH resulted in 3  $\log_{10}$  ( $P < 0.001$ ) and 2.21  $\log_{10}$  ( $P < 0.001$ ) units of CFU lower than those from untreated group in the lungs and spleen, respectively (Table 1). The bacterial loads in the lungs and spleen from IQG-607-treated mice were 3.2  $\log_{10}$  ( $P < 0.001$ ) and 2.16  $\log_{10}$  ( $P < 0.001$ ) lower than those of untreated controls (Table 1). Treatment with IQG-639 for 8 weeks did not affect the CFU counts in the lungs and spleens compared with infected mice that did not receive any treatment (Table 1).

### **3.3. Evaluation of the activity of different doses of IQG-607**

We have also evaluated the activity of different doses of the compound IQG-607 (5, 10, 25, 50, 100, 200 and 250 mg/kg). In this experiment, *M. tuberculosis*-infected mice showed a 297 % increase in the spleen weights ( $P < 0.001$ ) when compared to the non-infected group. Spleen weights were significantly lower in IQG-607- (at doses of 10, 25, 50, 100, 200 and 250 mg/kg) and INH-treated groups compared to the untreated controls ( $P < 0.001$  for all treatments). In INH-treated mice, the splenomegaly was 47 % lower than controls whereas at the doses of 10, 25, 50, 100, 200 and 250 mg/kg of IQG-607 the spleen weights were 38%, 43 %, 40%, 45%, 52%, and 51% lower, respectively, than untreated mice. Treatment with 5 mg/kg of IQG-607 did not significantly affect the spleen weight compared to the untreated group ( $P > 0.05$ ).

INH-treated group showed a decrease of 3.61 log<sub>10</sub> ( $P < 0.001$ ) in the CFU counts of the lungs and 1.07 log<sub>10</sub> ( $P < 0.001$ ) units in the spleens compared to the untreated group (Table 2). Treatment with the doses of 10, 25, 50, 100, 200 and 250 of IQG-607 resulted in a range of 2.59 to 3.36 log<sub>10</sub> ( $P < 0.001$  for all doses) CFU units lower than the untreated group, in the lungs (Table 2). In the spleen, those doses reduced the bacterial counts in a range of 0.76 to 1.03 log<sub>10</sub> ( $P < 0.001$  for all treatments), compared to the untreated mice (Table 2). No significant reduction in spleen and lung CFU loads was observed after 28 days of treatment with 5 mg/kg of IQG-607 (Table 2).

#### **3.4. Assessment of bactericidal activity**

*M. tuberculosis*-infected mice were treated daily with INH (25 mg/kg) or IQG-607 (150 mg/kg) for 28 days. In the start of treatment, a control group of infected mice was sacrificed (early control group). INH (25 mg/kg) reduced the splenomegaly in 55 % ( $P < 0.001$ ) and 51% ( $P < 0.01$ ), compared to early and late untreated controls, respectively. Treatment with IQG-607 (150 mg/kg) decreased the spleen weights in 46 % ( $P < 0.01$ ) and 41% ( $P < 0.05$ ), compared to early and late controls, respectively. Treatment with INH or IQG-607 significantly reduced the bacterial load from lungs and spleens compared with the early and late control groups ( $P < 0.001$  for all comparisons), a profile which is indicative of bactericidal activity (Table 3).

#### 4. Discussion

The shortcomings of current chemotherapy used to treat TB are evident. The urgent necessity and priority for identifying new antimycobacterial scaffolds is consensual [1,19,20]. A new molecule must diminish the length of therapy that makes patient compliance difficult, lowering the dosing frequency and should be ideally active against resistant strains. It should also have low toxicity issue, like hepatotoxicity, and might be co-administered with HIV medications [1]. Contemplating the expectations of a new anti-TB drug with the ideal profile certainly complicates drug development efforts.

Developing new antimycobacterial agents requires long-term commitment to performing the laborious and slow in vivo studies required [16]. Accordingly, only few novel compounds are currently being tested in the preclinical phase of development [19]. New drugs need to be assessed in animal models in order to establish crucial treatment parameters prior to entering the clinical phases. It is well known that no animal model is ideal to thoroughly mimic human TB, as each model only incompletely reproduces some aspects of the disease in humans [21]. Because it is cost-effective and practical, the mouse is the animal model of choice for the screening of new drugs to treat TB [1,16,21]. Agents that display satisfactory in vitro activity must therefore be evaluated in an animal model prior to further evolution in the drug development steps.

Of relevance, both compounds IQG-607 and IQG-639 have shown marked inhibitory activities of the *M. tuberculosis* InhA enzyme in in vitro assays [9,11]. In addition, these two new compounds displayed in vitro antimicrobial activities against cultures of *M. tuberculosis* H37Rv strain and INH-resistant clinical isolates [12]. Therefore, the present study was aimed to evaluate the in vivo efficacy of both compounds by employing a murine model of TB.

In this work, we have intravenously infected Swiss mice with the *M. tuberculosis* H37Rv laboratorial virulent strain. The infection induced severe splenomegaly, as also observed in previous mycobacterial infection studies [18,22]. In addition, the macroscopic visualization of the lung aspects in infected animals suggested a marked inflammatory response, and the

consistent development of lesions. Moreover, the morphological features of the granuloma formation, the pathological hallmarks of TB, including the mycobacteria within macrophages surrounded by a mantle of lymphocytes forming organized structures [20], were observed in lungs from infected mice.

IQG-607- and IQG-639-in vivo activities were assessed by administering both compounds to mice infected with *M. tuberculosis*. We initially compared the activities of INH at 25 mg/kg, IQG-607 at 250 mg/kg and IQG-639 at 250 mg/kg, as single agents, in a 4-week daily treatment regimen. In our second experimental series, we have lengthened the period of drug administration to 8 weeks, using the same doses employed before. Importantly, our work shows that treatment with either the reference drug INH or the test compound IQG-607 effectively resolved visible lung lesions, according to macroscopic evaluation. In addition, it was evident that IQG-607 diminished the infection-induced splenomegaly, with percentages of reduction statistically similar to those seen for INH, in both treatment schemes, during 28 and 56 days.

With respect to changes in CFU counts, the bacterial loads in either the lungs or spleens from IQG-607-treated mice were markedly lower than those from untreated controls, after both 4 and 8 weeks of treatment. The efficacy of IQG-607 at 250 mg/kg was not significantly different from that observed for INH at 25 mg/kg, when considering the CFU counts of lungs and spleen, after 4 or 8 weeks of treatment. On the basis of data presented herein, it is tempting to suggest that IQG-607 might represent a promising molecule for development of new anti-TB strategies. The fact that this compound has a very satisfactory activity in our mouse model indicates that it is absorbed and reaches the lungs after oral administration, being able to cross the macrophage membrane to reach the bacilli, and killing them within the phagosome of the macrophages. Nevertheless, IQG-639 250 mg/kg was not capable of significantly modifying any evaluated parameters of infection, even after the more prolonged experimental approach, 56 days of treatment. It could be speculated that IQG-639 does not reach the intracellular compartments of the macrophage within the lungs, or it is not absorbed after oral administration. Furthermore, IQG-639 might also be inactivated by some additional unknown mechanism, which remains to be evaluated. Agents that

display favorable in vitro activity, but fail to demonstrate in vivo activity, as IQG-639, may require further manipulation to enhance absorption or macrophage delivery. Accordingly, we decided to select only IQG-607 for the next experiments.

Our next set of experiments was designed to evaluate whether IQG-607 activity follows a dose-response pattern. In this protocol, the treatment with IQG-607 at 10, 25, 50, 100, 200 and 250 mg/kg significantly modified the spleen weights and the bacterial loads from lungs and spleen, as compared to the infected and untreated group, although the dose of 5 mg/kg failed to modify any evaluated parameter of infection. Considering these findings, we might conclude that IQG-607 displayed a dose-dependent profile in our murine model of TB, and 10 mg/kg was the lowest dose able to show significant activity. Considering the molecular weights of these chemical compounds, we can observe that a lower dose of IQG-607 (22  $\mu\text{mol/kg}$ ) produced results that were statistically similar in terms of all the analyzed parameters in comparison to INH (182  $\mu\text{mol/kg}$ ). Compared with our findings, a recently published study has demonstrated a clear relationship on percentages of reduction of mycobacterial loads in both lungs and spleen from the INH 25 mg/kg-treated groups, using the same treatment scheme utilized in our work, although they employed female BALB/c mice and treatments occurred 5 days/week. These similarities were observed in both 28 and 56 days of treatment [23]. Our results of INH treatment were also consistent with previous findings [15,17,24]. Similarly to IQG-607, the nitroimidazopyran compound PA-824 and the oxazolidione PNU-100480 (both at 100 mg/kg) have displayed antimycobacterial activity comparable to that of INH, when these drugs were tested in the preclinical phase, using the murine test system, as we have performed in this work [14,18]. On the other hand, the diamine compound SQ109 (at 25 mg/Kg) was less potent than INH, although showing reductions of CFU counts in both spleen and lungs comparable to those from another positive control anti-TB drug ethambutol [17].

It appears to be worth pointing out that the dose of IQG-607 used for treating the infected mice for 28 and 56 days, 250 mg/kg, has been chosen according to the acute oral toxicity assays as the doses of 250 or 500 mg/kg

did not cause any toxic clinical sign or mortality in male and female mice, showing favorable toxicological features. INH, in turn, caused 80 % deaths in mice after single oral administration of 250 mg/Kg [12]. Additional studies to evaluate the toxicological parameters/safety after repeated doses of IQG-607 in mice are in progress. Preliminary results have shown favorable long-term safety indicators. Based on the efficacy data presented in this work, we have solid evidence that IQG-607 is absorbed after oral route of administration, without causing any apparent toxicity in mice. However, additional studies on this regard are still needed. Of note, IQG-607 was also found to display bactericidal activity, as it is required to a novel anti-TB compound.

In summary, in the present experimental study, it was noticeable that the compound IQG-607 displayed a marked bactericidal activity against *M. tuberculosis* H37Rv in infected mice. IQG-607 represents a potential molecule for new anti-TB drugs, and its promising activity in *M. tuberculosis*-infected mice suggests that it represents a good candidate for clinical development as a new antimycobacterial agent.

### **Acknowledgments**

This work was supported by Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES/FUNTEC) and National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDTC-CAPES), Brazil. D. S. Santos and L. A. Basso also acknowledge grants awarded by FINEP and FAPERGS-CNPq-PRONEX-2009. D. S. Santos, J. B. Calixto, L. A. Basso, L. G. F. Lopes, A. A. Souto and M. M. Campos are research career awardees of the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq).

## References

- [1] Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* 2011;469:483-490.
- [2] WHO. Global Tuberculosis Control: A Short Update to the 2009 Report. 2010.
- [3] Yew WW, Leung CC. Management of multidrug-resistant tuberculosis: Update 2007. *Respirology* 2008;13:21-46.
- [4] Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR, Ibrahim TA, Tabarsi P, Haroun RZ et al. Totally drug-resistant tuberculosis strains: Evidence of adaptation at the cellular level. *Eur Respir J* 2009;34:1202-1203.
- [5] Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, ZiaZarifi AH 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* 2009;136:420-425.
- [6] Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T et al. *Inha*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994;263:227-230.
- [7] Basso LA, Zheng RJ, Blanchard JS. Kinetics of inactivation of wt and C243S mutant of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase by activated isoniazid. *J Am Chem Soc* 1996;118:11301-11302.
- [8] Aouam K, Chaabane A, Loussaïef C, Ben Romdhane F, Boughattas NA, Chakroun M. Adverse effects of antitubercular drugs: epidemiology, mechanisms, and patient management. *Med Mal Infect* 2007;37:253-261.
- [9] Oliveira JS, de Sousa EHS, de Souza ON, Moreira IS, Santos DS, Basso LA. Slow-onset inhibition of 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex. *Curr Pharm Design* 2006;12:2409-2424.
- [10] Oliveira JS, de Sousa EHS, Basso LA, Palaci M, Dietze R, Santos DS et al. An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Commun* 2004;3:312-313.
- [11] Vasconcelos I, Meyer E, Sales F, Moreira I, Basso LA, Santos DS. The mode of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* wild-type and isoniazid-resistant 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) reductase enzymes by an inorganic complex. *Antiinfect Agents Med Chem* 2008;7:50-62.



- [12] Basso LA, Schneider CZ, dos Santos AJB, dos Santos Jr AA, Campos MM, Souto AA et al. An inorganic complex that inhibits *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase as a prototype of a new class of chemotherapeutic agents to treat tuberculosis. *J Braz Chem Soc* 2010;21:1384-1389.
- [13] Popova NA, Krasovitsky BM, Pivnenko NS, Surov YN. Synthesis and spectral properties of 2-methyl-5-aryl-1,3,4-oxadiazoles. *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinenii* 1997;6:816-821.
- [14] Cynamon MH, Klemens SP, Sharpe CA, Chase S. Activities of several novel oxazolidinones against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1189-1191.
- [15] Klemens SP, Grossi MA, Cynamon MH. Activity of KRM-1648, a new benzoxazinorifamycin, against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2245-2248.
- [16] De Groote MA, Gilliland JC, Wells C, Brooks EJ, Woolhiser LK, Gruppo V et al. Comparative studies evaluating mouse models used for efficacy testing of experimental drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1237-1247.
- [17] Jia J, Tomaszewski JE, Hanrahan C, Coward L, Noker P, Gorman G et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of SQ109, a new diamine-based antitubercular drug. *Br J Pharmacol* 2005;144:80-87.
- [18] Tyagi S, Nuermberger E, Yoshimatsu T, Williams K, Rosenthal I, Lounis N et al. Bactericidal activity of the nitroimidazopyran PA-824 in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2289-2293.
- [19] Dover LG, Coxon GD. Current status and research strategies in tuberculosis drug development. *J Med Chem* 2011;54:6157-6165.
- [20] Russell DG, Barry III CE, Flynn JL. Tuberculosis: What we don't know can, and does, hurt us. *Science* 2010;328:852-856.
- [21] Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* 2003;57:641-676.
- [22] Martins de Sousa E, Bonfim de Bortoli F, Amaral EP, Batista AC, Liberman Kipnis T, Marques Cardoso A et al. Acute immune response to *Mycobacterium massiliense* in C57BL/6 and BALB/C mice. *Infect Immun* 2010;78:1571-1581.

- [23] Lu J, Yue J, Wu J, Luo R, Hu Z, Li J et al. *In vitro* and *in vivo* activities of a new lead compound I2906 against *Mycobacterium tuberculosis*. *Pharmacology* 2010;85:365-371.
- [24] Cynamon MH, Zhang Y, Harpster T, Cheng S, DeStefano MS. High-dose isoniazid therapy for isoniazid-resistant murine *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2922-2924.

## Tables

Table 1: CFU counts in organ homogenates from mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and treated for 28 or 56 days with INH, IQG-607 or IQG-639

Treatment (mg/kg)	Mean log <sub>10</sub> CFU/organ ± SEM			
	28 days of treatment		56 days of treatment	
	Lungs	Spleen	Lungs	Spleen
Untreated	5.73 ± 0.23	5.84 ± 0.07	6.37 ± 0.05	5.34 ± 0.21
INH (25)	3.36 ± 0.08***	4.07 ± 0.20***	3.37 ± 0.36 ***	3.13 ± 0.23 ***
IQG-607 (250)	3.36 ± 0.27***	4.44 ± 0.17***	3.17 ± 0.20 ***	3.18 ± 0.12 ***
IQG-639 (250)	5.72 ± 0.25	5.65 ± 0.08	6.35 ± 0.09	5.38 ± 0.24

\*\*\*  $P < 0.001$  compared to the untreated group. Results represent the means ± SEM of 4 to 5 mice per group.

Table 2: CFU counts in organ homogenates from mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and treated with INH or different doses of IQG-607 for 28 days

Treatment (doses at mg/kg)	Mean log <sub>10</sub> CFU/organ ± SEM	
	Lungs	Spleen
Untreated	7.03 ± 0.11	6.10 ± 0.15
INH (25)	3.42 ± 0.15 ***	5.03 ± 0.07 ***
IQG-607 (5)	6.46 ± 0.12	5.98 ± 0.06
IQG-607 (10)	4.44 ± 0.08 ***	5.31 ± 0.08 ***
IQG-607 (25)	4.25 ± 0.08 ***	5.34 ± 0.11 ***
IQG-607 (50)	4.11 ± 0.32 ***	5.07 ± 0.14 ***
IQG-607 (100)	3.74 ± 0.23 ***	5.15 ± 0.09 ***
IQG-607 (200)	3.67 ± 0.27 ***	5.16 ± 0.07 ***
IQG-607 (250)	3.76 ± 0.18 ***	5.26 ± 0.14 ***

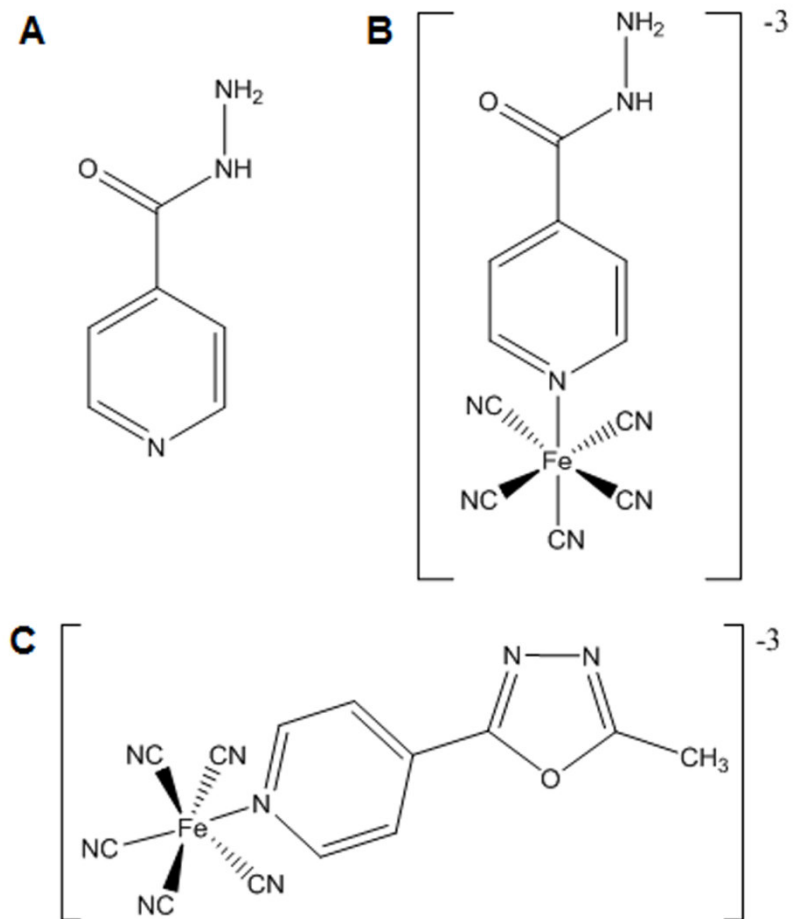
\*\*\*  $P < 0.001$  compared to the untreated group. Results represent the means ± SEM of 5 to 6 mice per group.

Table 3: CFU counts in organ homogenates from mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and treated with INH or IQG-607 for 28 days, showing data on early and late controls of infection

Treatment (doses at mg/kg)	Mean log <sub>10</sub> CFU/organ ± SEM	
	Lungs	Spleen
Early control	5.32 ± 0.13	7.34 ± 0.12
Late control	6.88 ± 0.16	5.88 ± 0.09
INH (25)	3.11 ± 0.12 ### ***	5.03 ± 0.13 ### ***
IQG-607 (150)	3.28 ± 0.35 ### ***	4.86 ± 0.14 ### ***

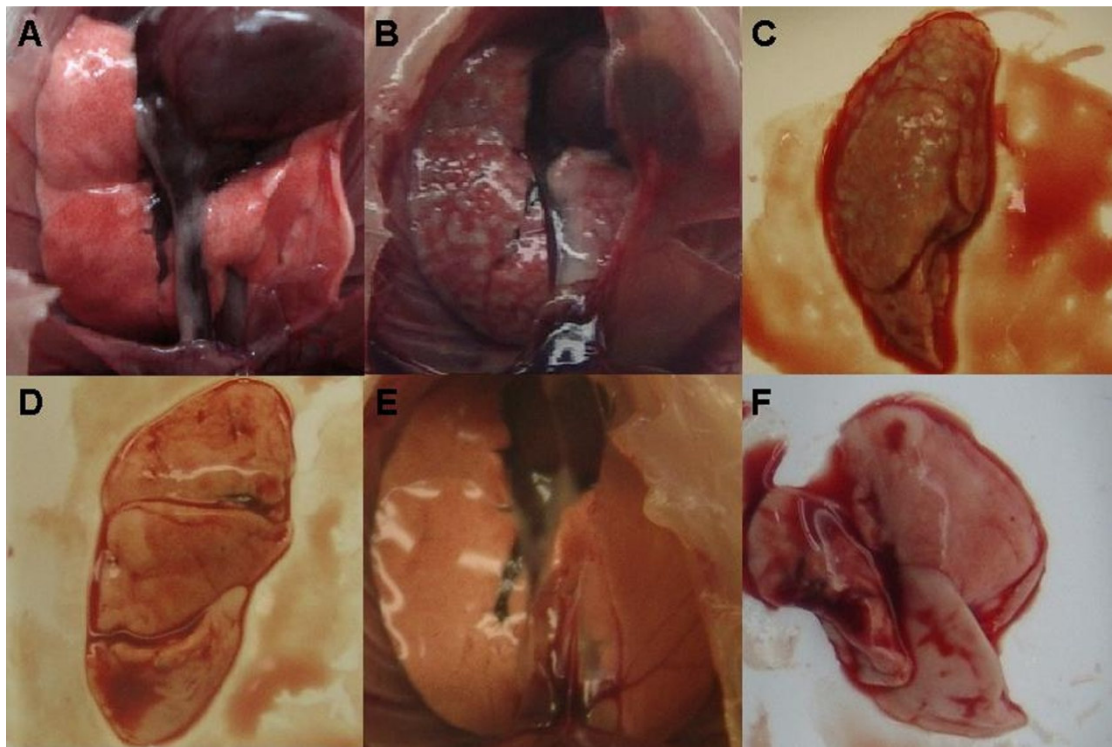
###  $P < 0.001$  compared to Early control; \*\*\*  $P < 0.001$  compared to the Late control group. Results represent the means ± SEM of 4 to 6 mice per group. Early control represents mice sacrificed at the start of treatment and Late control represents mice sacrificed at the end of the treatment.

## Figures

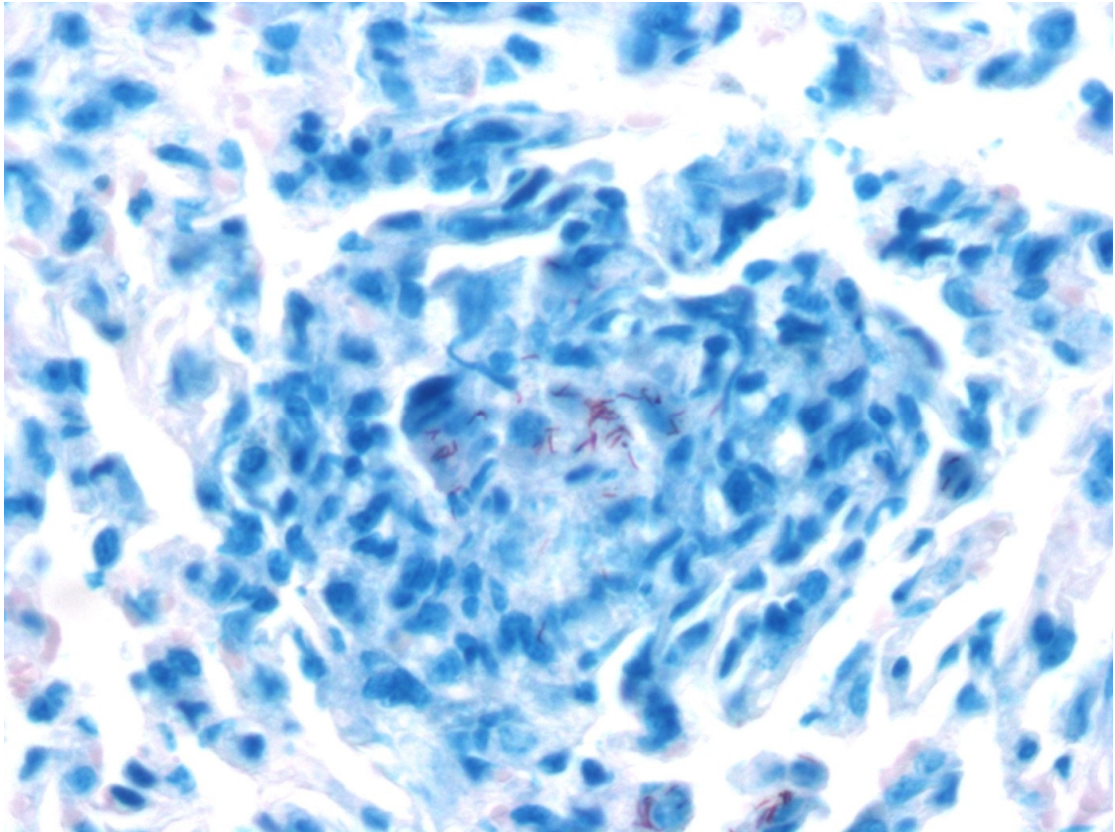


**Figure 1:** Chemical structures of isoniazid (A), IQG-607 (B), and IQG-639 (C).

## Supplementary data



**Supplementary Figure 1:** Representative images of lungs from uninfected Swiss mice (A), *M. tuberculosis* H37Rv-infected and untreated (B and C), infected mice treated with INH at 25 mg/kg (D), and infected mice treated with IQG-607 at 250 mg/kg (E and F), after 28 days of treatment.



**Supplementary Figure 2:** Representative image showing granulomatous lesions in the lung of *M. tuberculosis* H37Rv-infected Swiss mice at 28 days post-infection. Lung slices were submitted to acid-fast staining. It is possible to observe the characteristic structure of granulome formation, with acid-fast-staining bacilli within the center of the lesion, surrounded by a mantle of lymphocytes. Magnification: X 40.



---

# Anexo C

---

Optimization of Intercalating Dye-Based Discrimination of Viable *Mycobacterium tuberculosis* in Real-Time PCR-Assisted Absolute Quantification of DNA from Sputum

---

T.M. de Assunção, C. Deves, V.S. Rodrigues-Junior, A.C.O. Dias, L.A. Basso, D.S. Santos, E.L. Batista Jr.

---

Manuscrito submetido ao periódico *Journal of Clinical Microbiology*, 2011.

---

**Optimization of Intercalating Dye-Based Discrimination of Viable  
*Mycobacterium tuberculosis* in Real-Time PCR-Assisted Absolute Quantification  
of DNA from Sputum.**

Running Title: Absolute quantification of *M. tuberculosis*

Thiago Milech de Assunção<sup>1</sup> Candida Deves<sup>1</sup>, Valnês da Silva Rodrigues-Junior<sup>1</sup>,  
Ana Cristina de Oliveira Dias<sup>1</sup>, Luiz Augusto Basso<sup>1</sup>, Diógenes Santiago Santos<sup>1\*</sup>,  
Eraldo L. Batista Jr.<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose – INCTB and Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional – CPBMF; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Avenida Ipiranga, 6681 – 92A TECNOPUC

90619-900 Porto Alegre – RS – Brazil, Fone/ Fax: (51) 3320-3629

<sup>2</sup> Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS; Avenida Ipiranga, 6681 – Bld. 06, 90619-900, Porto Alegre – RS - Brazil  
Phone/ Fax: (51) 3320-3538

Correspondence: Eraldo L. Batista Jr. [eraldo.junior@puers.br](mailto:eraldo.junior@puers.br)

Diógenes Santiago Santos [diogenes@puers.br](mailto:diogenes@puers.br)

---

# Anexo D

---

Implication of Purinergic P2X7 Receptor in *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Host Interaction Mechanisms: a Mouse Model Study

---

A.A. Santos Jr., V.S. Rodrigues-Junior, R.F. Zanin, T.J. Borges, C. Bonorino, R. Coutinho-Silva, C.M. Takyia, D.S. Santos, M.M. Campos, F.B. Morrone

---

Manuscrito submetido ao periódico *Immunobiology*, 2012.

---

**Implication of purinergic P2X7 receptor in *M. tuberculosis* infection and host interaction mechanisms: a mouse model study**

<sup>1,2</sup>André A. Santos Jr, <sup>1,3</sup>Valnês Rodrigues-Junior, <sup>4</sup>Rafael F. Zanin, <sup>4</sup>Thiago J. Borges, <sup>4</sup>Cristina Bonorino, <sup>7</sup>Robson Coutinho-Silva, <sup>7</sup>Christina M. Takyia, <sup>1</sup>Diogenes S. Santos, <sup>5,6</sup>Maria M. Campos, <sup>2,5</sup>Fernanda B. Morrone

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB); Programa de Pós Graduação em <sup>2</sup>Biologia Celular e Molecular, and <sup>3</sup>Medicina e Ciências da Saúde; <sup>4</sup>Instituto de Pesquisas Biomédicas; <sup>5</sup>Instituto de Toxicologia e Farmacologia; <sup>6</sup>Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. <sup>7</sup>Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ;

**Corresponding Author:** Fernanda B. Morrone, Faculty of Pharmacy /Institute of Toxicology and Pharmacology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone number: 55 51 3320 3512; Fax number: 5551 3320 3612.  
E-mail: fbmorrone@gmail.com; fernanda.morrone@pucrs.br

---

# Anexo E

---

Protective Effects of Resveratrol  
on Hepatotoxicity Induced by  
Isoniazid and Rifampicin via  
SIRT1 Modulation

---

N.F. Nicoletti, A.A. Santos Jr.,  
V.S. Rodrigues-Junior, C.E. Leite,  
M.M. Campos, A.C.O. Dias, E.L.  
Batista Jr., L.A. Basso, D.S.  
Santos, A.A. Souto

---

Manuscrito submetido ao  
periódico *Toxicology and Applied  
Pharmacology*, 2012.

---

**Protective Effects of Resveratrol on Hepatotoxicity Induced by Isoniazid and Rifampicin via SIRT1 Modulation**

Natália F. Nicoletti<sup>1,2</sup>, André A. dos Santos Jr<sup>1,2</sup>, Valnês Rodrigues-Jr<sup>1,3</sup>, Carlos E. Leite<sup>4</sup>, Maria M. Campos<sup>4,5</sup>, Ana C. O. Dias<sup>1</sup>, Eraldo L. Batista Jr.<sup>1,5</sup>, Luiz A. Basso<sup>1,2</sup>, Diógenes S. Santos<sup>1,2</sup>, André A. Souto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, <sup>4</sup>Instituto de Toxicologia, <sup>5</sup>Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, RS.

**Corresponding Author:** Dr. André A. Souto, Corresponding authors at: Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose(INCT-TB), Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681 – Tecnopuc – Predio 92-A, Porto Alegre 90619-900, RS, Brazil. Fax: +55 51 33203629. E-mail: arigony@puers.br

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R696a Rodrigues Junior, Valnês da Silva

Avaliação pré-clínica dos compostos IQG-607 e IQG-639 em um modelo de tuberculose em camundongos / Valnês da Silva Rodrigues Junior. – Porto Alegre, 2012.  
102 f.

Tese (Doutorado) – PUCRS. Faculdade de Medicina.  
Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.  
Área de concentração: Farmacologia Bioquímica e Molecular.  
Orientadora: Profa. Dra. Maria Martha Campos.  
Co-Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos.

1. Farmacologia Molecular. 2. Microbiologia. 3. Tuberculose.  
4. Medicamentos – Desenvolvimento. I. Campos, Maria Martha.  
II. Santos, Diógenes Santiago. III. Título.

**Bibliotecária Responsável: Dênira Remedi – CRB 10/1779**