

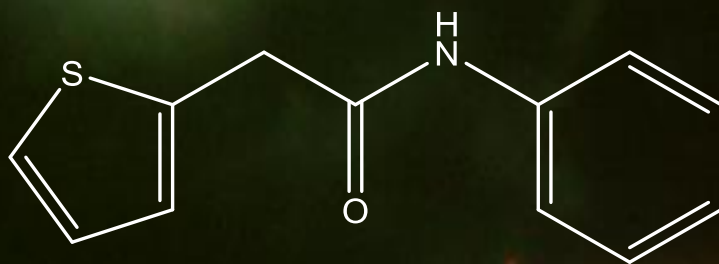
Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FÁTIMA MARIA FIGUEROA VERGARA

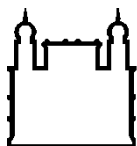
**Avaliação da ação antimicrobiana e imunomoduladora do
tiofenoacetamida na infecção causada por *Mycobacterium* sp.**



Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FÁTIMA MARIA FIGUEROA VERGARA

**Avaliação da ação antimicrobiana e imunomoduladora do tiofenoacetamida
na infecção causada por *Mycobacterium* sp.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques

RIO DE JANEIRO

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

V494 Vergara, Fátima Maria Figueroa

Avaliação da ação antimicrobiana e imunomoduladora do
tiofenoacetamida na infecção causada por *Mycobacterium* sp. / Fátima
Maria Figueroa Vergara. – Rio de Janeiro, 2014.

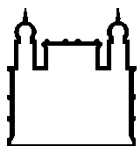
xiv, 179 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 164-179

1. Tuberculose. 2. Tiofenoacetamida. 3. Macrófago. 4. Novas
drogas. I. Título.

CDD 614.542



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FÁTIMA MARIA FIGUEROA VERGARA:

**Avaliação da ação antimicrobiana e imunomoduladora do tiofenoacetamida
na infecção causada por *Mycobacterium* sp.**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Müller de Oliveira Henriques

Aprovada em: 02/10/2014

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Vidal Pessolani - Presidente

Prof^a. Dr^a. Clarissa Menezes Maya Monteiro

Prof^a. Dr^a. Heloisa D'Avila da Silva Bizarro

Prof. Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

Prof. Dr. André Luis Peixoto Candéa

Rio de Janeiro, 02 de Outubro de 2014.

Dedico este trabalho ao meu amado pai- Rafael Eduardo (*in memoriam*) e ao meu querido filho- Rafa, que compartilham não só do mesmo nome mas também da mesma brilhante inteligência e acalentador amor. Que mesmo sem quererem e sem saberem foram, e sempre serão minha maior fonte de inspiração.

Agradecimentos

- Agradeço à minha orientadora Dr^a Graça, pelos ensinamentos, pela dedicação, e pela confiança na minha capacidade intelectual não só por esses 4 anos de doutorado mas também por esses 10 anos em que faço parte da sua equipe.

- À minha orientadora durante meu estágio de doutorando Dr^a Tanya Parish por ter me recebido em seu laboratório de forma tão generosa, ter confiado em meu potencial, por ter me dado a oportunidade de conhecer importantes cientistas na área, e por sempre instigar minha curiosidade.

- À toda equipe do laboratório de farmacologia aplicada que de alguma forma (direta ou indiretamente) participaram do desenvolvimento deste trabalho. Agradeço em especial à Dr^a Elaine Rosas, à Dr^a Mariana Souza, à Dr^a Carmen Penido, à Dr^a Maria Fernanda Costa, ao Thadeu Costa e ao André Salles, por sempre estarem dispostos a me ajudar, fosse na bancada, na discussão científica ou na descontração que traz uma boa gargalhada.

- À todos da equipe do Tuberculosis Drug Discovery laboratory, mais conhecido como TBDisco, que me receberam de braços abertos e que me ajudaram, me ensinaram, me incentivaram, aprenderam comigo, torceram e torcem por mim. E que ao fim de um ano se tornaram muito mais que apenas colegas de trabalho, se tornaram amigos para toda a vida. Em especial à Dr^a Theresa O'Malley pelos ensaios de mutantes resistentes, à Mai Bailey pelos MICs e ensaios de fluorescência, ao Dr David Roberts pelo treinamento no BSL3, ao Dr Joshua Odingo pelos novos análogos do TAA e especialmente ao Dr Edison Zuniga pela síntese dos novos análogos e essenciais discussões e correções do paper.

- À todos os cientistas e seus respectivos alunos, com os quais estabeleci colaboração, e que de uma maneira concreta, na forma de resultados, ou mais abstrata, na minha formação como cientista, participaram e contribuíram no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço à Dr^a Leila Mendonça e à Paloma Resende pela ajuda e ensinamentos em microbiologia micobacteriana, ao Dr Milton Ozório e ao Thiago Gomes pelos ensaios de expressão gênica e ao Dr. Ernesto Caffarena pelos ensinamentos em bioinformática, ao Dr Marcus Nora pela síntese do TAA e discussão de química farmacêutica, à Dr^a Patrícia Bozza e à Natália Roque

pela marcação dos corpúsculos com ADRP e discussão do assunto, à Dr^a Patrícia Pacheco pelo nocaute de MyD88 e discussão das vias de sinalização.

- Ao Dr André Candéa, pela co-orientação na iniciação científica, pela ajuda na bancada e discussão científica, pela ajuda fora do laboratório quando muito precisei, mas especialmente por enxergar em mim, a 10 anos atrás, meu potencial de “aprendiz de feiticeiro”, quando nem eu mesmo o sabia, e que possibilitou hoje a defesa deste trabalho.

- Ao Dr Rubem Menna-Barreto pela excelente revisão e comentários que contribuíram para a melhora significativa da escrita deste trabalho.

- À Daniele Lobato não só pelo excelente trabalho na secretaria da BCM mas especialmente pela sua amizade e carinho.

- Aos meus pais, Rafael e Ximena, pelo incentivo e ajuda e por serem os maiores exemplos de coragem, luta e determinação.

- Ao meu filho, Rafa, por me acompanhar e apoiar nesta aventura de vida de doutoranda e que não me abandonou nem na hora de ir morar na cidade que chove 350 dias por ano, durante meu doutorado sanduíche. E, ainda, ser capaz de fazer daquele e de todos os momentos que vivemos juntos os melhores da minha vida.

- Aos meus queridos irmãos e irmã- Garcia, Fernán, Amina e Eloy- por serem minha família, minha fortaleza, minha referência, minha fonte de amor. E por sempre acreditarem em mim.

- Aos meus amigos-irmãos, Luíz, Dani e Cris. Pelas palavras certas, pelo silêncio oportuno, pela paciência nos meus momentos de confusão, pela ajuda que transforma minha vida e por me amarem e estarem sempre do meu lado independente dos caminhos que a vida nos leva.

- À Deus, por ter serenado meu coração nos momentos de angústia, por ter me dado forças nos momentos de fraqueza e principalmente, por me nunca me abandonar.

- Ao apoio financeiro do CsF/CNPq, da CAPES, da PGBCM, de FarManguinhos e do IDRI.

“Not only does man lack the power to create life but his
ability to destroy it, at least at the microbial level, is
sharply limited.”

Walsh McDermott, 1959

Lista de Abreviações:

AA – Ácido araquidônico

AAS – Ácido acetil salicílico

AC – Adenililciclase

ACAT – “Acyl-CoA cholesterolacyltransferase” (Acil- CoA acil transferase colesterol)

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais

ATP – Adenosina trifosfato

BAAR – Bacilo álcool ácido resistente

BCG – Bacilo de Calmette-Guérin

BK – Bacilo de Koch

BSA – “Bovine serum albumin” (Albumina de soro bovino)

cAMP – Adenosina monofosfato cíclica

Con-A – Concavalina A

CD14 – “Cluster of differentiation 14” (Grupo de diferenciação 14)

CL – Corpúsculo lipídico

COX – Ciclooxigenase

DMSO – Dimetil Sulfóxido

DNA – “Deoxyribonucleic acid” (ácido desoxirribonucléico)

ELISA – “Enzyme linked immunosorbent assay” (Ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas)

EIA – Ensaio imunoenzimático

EMA – Agência europeia do medicamento

eNOS – “Endothelial nitric oxide synthase” (óxido nítrico sintase endotelial)

FDA – “Food and drugs administration” (Administração de medicamentos e alimentos)

FITC – “Fluorescein isothiocyanate” (Isotiocianato de fluoresceína)

g – aceleração da gravidade na superfície da terra

HIV – “Human Immunodeficiency Virus” (Vírus da imunodeficiência humana)

HTS – “High throughput screening” (Triagem de alto rendimento)

HSL – “Hormone-sensitive lipase” (Hormônio lipase sensível)

i.t – intra-torácica

IL – Interleucina

ImageJ – “Image Processing and Analysis in Java” (análise e procesamento de imagens em Java)

INF- γ – Interferon-gama

iNOS – “Inducible Nitric Oxide Synthase” (óxido nítrico sintase induzida)
JNK – “c-Jun N-terminal Kinase” (c-Jun N-terminal quinase)
LAM – Lipoarabinomanana
LB – Luria-Bertani
LJ – Lowenstein-Jensen
LPS – Lipopolissacarídeo
LXA4 – Lipoxina A4
MDP – Dipeptídeo de muramilo
MDR – “Multi drug resistant” (Resistência a multi medicamentos)
MIC – Mínima concentração inibitória
MmPL3 – “Mycobacterial membrane protein large-3” (Grande Proteína de membrana micobacteriana-3)
MTC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
MTT – “Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt” (Sal de dimetil-tiazol-fenil brometo de tetrazólio)
NF-κB – “Nuclear factor κB” (Fator nuclear κB)
NOD – Domínio de nucleotídeos por oligomerização
nNOS – “Neuronal nitric oxide synthase” (óxido nítrico sintase neuronal)
NO – “Nitric oxide” (Óxido Nítrico)
OADC – “Oleic acid-albumin-dextrose-catalase” (ácido-oleico, albumina, dextrose e catalase)
OMS – Organização mundial da saúde
OPD – Orto-fenilenodiamino
PAMP – padrões moleculares conservados associados a patógenos
PAS – ácido paraamino salicílico
PBS – “Phosphate buffered saline” (Tampão salina fosfato)
PGE2 – Prostaglandina E2
RNA – “Ribonucleic acid” (ácido ribonucléico)
RNI – “Reactive nitrogen intermediates”(espécies intermediárias de nitrogênio)
SFB – Soro fetal bovino
SNP – “Single nucleotide polymorphism” (Polimorfismo único de nucleotídeo)
TAA – Tiofenoacetamida
TAG – Triacilglicerol
TB – Tuberculose
TCH – Tiocarbohidrazida

TDR – “Totally drug resistant” (totalmente resistente a medicamentos)

TLR – “Toll Like Receptor” (receptor do tipo toll)

TNF- α – “Tumor necrosis factor alpha” (Fator de necrose tumoral alfa)

UFC – Unidade formadora de colônia

v.o. – via oral

UDP – Uraciladifosfato

XDR – “Extensive Drug Resistant” (Extremamente resistente a medicamentos)

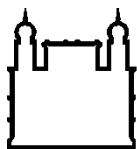
ZN – Ziehl-Neelsen

Índice

Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	1
1.1. A tuberculose	1
1.2. A imunopatogênese da TB	2
1.2.1. O reconhecimento do <i>M. tuberculosis</i> pelo hospedeiro	2
1.2.2. A resposta imune do hospedeiro contra o <i>M. tuberculosis</i>	5
1.3. O tratamento contra a TB	9
1.3.1. Período pré antibioticoterapia	9
1.3.2. Desenvolvimento dos primeiros antibióticos	10
1.3.3. Tratamento atual	11
1.3.4. Perspectivas de novos tratamentos	12
1.3.4.1. Fluorquinolonas	13
1.3.4.2. Nitroimidazóis	14
1.3.4.3. Diarilquinolinas	15
1.3.4.4. Rifamicinas	16
1.3.4.5. Oxazolidinonas	17
1.3.4.6. Etilenodiaminas	18
1.3.4.7. Substâncias aromáticas heterocíclicas	19
1.3.4.7.1. Anéis furânicos	19
1.3.4.7.2. Anéis tiofênicos	20
1.3.4.8. Tratamentos complementares	21
2. Justificativa	22
3. Objetivos	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23

4. Material e Métodos	24
4.1. Materiais	24
4.2. Metodologia	24
4.2.1. Cultivo do <i>M. bovis</i>-BCG	24
4.2.2. Irradiação de <i>M. bovis</i>-BCG	25
4.2.3. Cultivo do <i>M. smegmatis</i>	25
4.2.4. Cultivo da <i>E. coli</i>	25
4.2.5. Método de azul de Alamar	25
4.2.6. Método de espalhamento (“spread plate”)	26
4.2.7. Preparo de meio condicionado	26
4.2.8. Cultura de macrófagos J774A1	26
4.2.9. Cultura de macrófagos murinos selvagens e nocautes para MyD88	26
4.2.10. Avaliação da citotoxicidade do tiofenocetamida em macrófagos infectados com o <i>M. bovis</i>-BCG	27
4.2.11. Avaliação da atividade antimicobacteriana do TAA <i>in vitro</i>	27
4.2.12. Avaliação da atividade imunomoduladora do TAA <i>in vitro</i>	27
4.2.13. Dosagem de citocinas pelo método de ELISA de captura	28
4.2.14. Dosagem de nitrito pelo método de Griess	28
4.2.15. Dosagem de PGE2 pelo método de EIA	29
4.2.16. Avaliação da translocação de NF-κB	29
4.2.17. Quantificação de CL	30
4.2.18. Imunofluorescência: marcação de ADRP em CL	30
4.2.19. Animais	31
4.2.20. Pleurisia induzida pelo <i>M. bovis</i>-BCG	31
4.2.21. Tratamento com TAA <i>in vivo</i>	31
4.2.22. Descontaminação do lavado pleural	32
4.2.23. Análise estatística	32
5. Resultados	33
5.1. Avaliação da ação antimicobacteriana direta do TAA sobre o <i>M. bovis</i>-BCG	33
5.2. Avaliação da ação do TAA sobre o <i>M. smegmatis</i> ou <i>E. coli</i>	33
5.3. Avaliação da ação do TAA sobre macrófagos infectados com o <i>M bovis</i>-BCG	35
5.3.1. Avaliação da citotoxicidade do TAA	35
5.3.2. Avaliação da atividade antimicobacteriana do TAA em macrófagos	

infectados com o <i>M bovis</i> -BCG	35
5.3.3. Efeito do tratamento com o TAA na quantificação de UFC no lavado pleural de camundongos infectados com o <i>M. bovis</i> - BCG	36
5.4. Avaliação da ação imunomoduladora do TAA sobre macrófagos infectados com <i>M. bovis</i> -BCG	38
5.5. Avaliação do tratamento com TAA sobre a translocação de NF-κB para o núcleo de macrófagos infectados com <i>M. bovis</i> -BCG	41
5.6. Efeito imunomodulador do tratamento com TAA na infecção pleural causada por <i>M. bovis</i> -BCG em camundongos	44
5.7. Avaliação do tratamento com TAA sobre a liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos estimulados por antígenos bacterianos	48
5.8. Avaliação do tratamento com o TAA sobre a formação de CL em macrófagos	50
5.9. Avaliação do tratamento com TAA sobre a formação de CL em macrófagos estimulados <i>M. bovis</i> -BCG irradiado.	54
5.10. Avaliação da formação de CL e produção de PGE2 em macrófagos MyD88 nocautes infectados com <i>M. bovis</i> -BCG	59
6. Resultados Complementares	60
7. Discussão	61
8. Conclusões	75
9. Referências bibliográficas	77



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

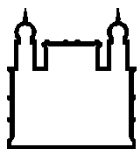
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA E IMUNOMODULADORA DO TIOFENOACETAMIDA NA INFECÇÃO CAUSADA POR *Mycobacterium* sp.

TESE DE DOUTORADO

Fátima Maria Figueroa Vergara

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) que acomete, principalmente, as vias aéreas. De acordo com a organização mundial da saúde (OMS) foram registrados cerca de 8,6 milhões de novos casos de TB no mundo em 2012. Atualmente o tratamento da TB se dá basicamente com medicamentos desenvolvidos na década de 60 que não vem se mostrando eficaz no tratamento de TB multidroga resistente (MDR-TB) e em indivíduos imunodeprimidos. Considerando esses fatos, a busca pelo desenvolvimento de novos fármacos capazes de atuar com eficácia, rapidez e baixa toxicidade, se faz urgente. O objetivo geral deste trabalho consistiu em comprovar a eficácia do derivado tiofenólico, tiofenoacetamida (TAA) contra micobactérias. Mais especificamente avaliamos a atividade bactericida direta e indireta do TAA sobre micobactérias do MTC e ainda sua habilidade em modular a resposta gerada pela célula hospedeira- o macrófago e ainda a avaliação experimental *in vivo* em camundongos infectados. E finalmente, propomos possíveis alvos de atuação do TAA sobre macrófagos infectados, que auxiliam na resolução da infecção e da inflamação. Avaliamos a ação bactericida do TAA- e seus análogos sobre o *M. tuberculosis* e o *M. bovis*-BCG. Avaliamos sua ação antimicobacteriana e imunomoduladora sobre macrófagos murinos e camundongos C57Bl/6 infectados. Primeiramente determinamos o MIC contra *M. tuberculosis* e *M. bovis*-BCG. O MIC contra *M. bovis*-BCG foi extremamente baixo (5,0 pM) entretanto contra o *M. tuberculosis* observamos uma diminuição na potência (70µM) por esta razão novos análogos foram sintetizados e avaliados, e foi observada melhora na potência (0.1µM). Em seguida demonstramos que o TAA não é citotóxico em macrófagos J774A.1 ou células Vero. A capacidade bactericida indireta sobre os macrófagos infectados com o *M. bovis*-BCG ou infectados com *M. tuberculosis* foi avaliada pela contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC), e o tratamento com TAA foi eficaz em diminuí-las. O modelo *in vivo* no modelo de pleurisia induzida por *M. bovis*-BCG, a administração oral de TAA (50 mg/kg) foi capaz de inibir o crescimento da micobactéria, a partir de 6 horas após a infecção e se manteve por 15 dias. Analisamos também se o TAA teria uma ação imunomoduladora sobre o macrófago infectado. Observamos que macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG e tratados com o TAA apresentam aumento na formação de corpúsculos lipídicos (CL). Entretanto o TAA ao ser utilizado no tratamento de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* promove uma diminuição no acúmulo de CL. Observou-se que no sobrenadante destas células houve uma diminuição da liberação de óxido nítrico (NO), PGE2, TNF- α , IL-6 e um aumento significativo na liberação de IL-10. Realizamos uma avaliação qualitativa da translocação nuclear de NF- κ B e foi observado que o TAA foi capaz de inibir a translocação. Apesar do TAA haver apresentado uma ação predominantemente anti-inflamatória *in vitro*, no modelo *in vivo* foi observado que alguns dos mediadores pro-inflamatórios, como NO e IL-6 estavam aumentados após o tratamento com TAA, concordando com a morte da micobactéria. Tomados em conjunto nossos dados indicam que o TAA é capaz de diminuir a viabilidade micobacteriana *in vitro* e *in vivo* e promove uma modulação da resposta inflamatória decorrente da infecção.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANTIMICROBIAL AND IMMUNOMODULATORY EFFECT OF THIOPHENEACETAMIDE ON *Mycobacterium* sp. INFECTION

TESE DE DOUTORADO

Fátima Maria Figueroa Vergara

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by mycobacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) which affect mainly the airways. According to the world health organization (WHO) about 8.6 million new cases of TB worldwide were recorded in 2012. Currently the treatment of TB occurs primarily with drugs developed in the 60s however has not been effective in the treatment of multidrug resistant TB (MDR-TB) neither in immunocompromised individuals. Considering these facts, the development of new drugs that can act with effectiveness, faster than the old ones with fewer side effects is urgent. The aim of this work was to prove the effectiveness of the thiophenolic derivative, thiopheneacetamide (TAA) against mycobacteria. More specifically we aimed to evaluate the direct and indirect TAA's bactericidal activity against mycobacteria of MTC also its ability to modulate the host response- in infected macrophages and infected mice. Finally, we propose possible targets of TAA action in infected macrophages, leading to the infection and inflammatory processes resolution. For this we evaluated the bactericidal action of TAA- and its analogues against *M. tuberculosis* and *M. bovis*-BCG. We evaluated the antimicrobial and immunomodulatory action on infected murine macrophages and C57Bl/6 mice. First we determined the MIC against both *M. tuberculosis* and *M. bovis*-BCG. The MIC against *M. bovis*-BCG was extremely low (5 pM) however against *M. tuberculosis* we observed a decrease in potency (70 µM) for that reason we synthesized and tested new analogs that had shown increased potency against *M. tuberculosis* (0.1 µM). Secondly we demonstrated that TAA is not cytotoxic in J774A.1 macrophages or Vero cells. The indirect bactericidal activity of the macrophages infected with *M. bovis*-BCG or infected with *M. tuberculosis* was analyzed by counting the number of colony forming units (CFU), treatment with TAA was effective in reducing them. In the *in vivo* model of BCG-induced pleurisy the oral administration of TAA (50 mg / kg) was able to inhibit the growth of *M. bovis*-BCG, 6 hours after infection maintained for 15 days. We also analyzed whether the TAA would have an immunomodulatory action on the infected macrophage. We observed that macrophages infected with *M. bovis*-BCG and treated with TAA exhibit increased formation of lipid bodies (LB). However when macrophages infected with *M. tuberculosis* were treated with TAA it had a decreased in the accumulation of LB. It was observed in the supernatant of these cells a decreased in the release of nitric oxide (NO), PGE₂, TNF- α , IL-6 and a significant increase in the release of IL-10. We conducted a qualitative assessment of the nuclear translocation of NF- κ B and observe that the TAA was able to inhibit nuclear translocation of this factor. Even though TAA has shown an anti-inflammatory action *in vitro* consistent with the diminished of CFU in the *in vivo* model we observed that some of the pro-inflammatory mediators were increased as NO and IL-6 which are also in agreement with the mycobacteria killing observed. Our data taken together indicate that TAA is capable of reducing the mycobacterial viability *in vitro* and *in vivo*. In addition promotes reduction of inflammatory response caused by the infection.

1. Introdução

1.1. A tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecto contagiosa causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) e pode acometer seres humanos ou outras espécies de animais. Este complexo é formado por micobactérias que já foram descritas como causadoras da TB: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canetti* e *M. africanum* (van Soolingen et al. 1997, Tsukamura, Mizuno, and Toyama 1985). A transmissão é de indivíduo para indivíduo e acomete, principalmente, as vias aéreas. O contágio se dá através de micobactérias presente em gotículas, expelidas pelo indivíduo infectado ao tossir, que são inaladas por indivíduos sãos (WHO 2014). As micobactérias, apesar de serem classificadas como Gram positivas, possuem propriedade álcool-ácido-resistente após a coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN) sendo também classificadas como bacilo álcool ácido resistente (BAAR). Esta resistência deve-se principalmente à espessa parede composta de ácidos graxos, rica em glicolipídios como as lipoarabinomananas e ácidos micólicos de natureza hidrofóbica (Ellis and Zabrowarny 1993).

O primeiro relato da ocorrência de TB em humanos e animais, e conseqüentemente a data que a micobactéria foi descrita como a causadora da TB em humanos não é consenso entre os especialistas. A primeira hipótese formulada sugere que o *M. bovis* é o ancestral provável e que a transmissão se deu do gado para os seres humanos durante a domesticação. Outras teorias supõem que um ancestral evoluiu do *M. africanum* e que o atual *M. tuberculosis* e o *M. bovis* desenvolveram-se em paralelo, já que, isolados revelam a ausência de variação alélica. Independente da teoria evolutiva considerada para a aparição da forma do *M. tuberculosis* atual é sugerido que a sua origem é de 15.000 a 20.000 anos atrás (Zink et al. 2003). Pesquisadores britânicos e israelenses identificaram a presença de micobactérias responsáveis pelo desenvolvimento da doença, nos esqueletos de uma mulher e seu bebê mortos há 9 mil anos em Alit-Yam, um antigo vilarejo neolítico localizado na costa de Israel (Hershkovitz et al. 2008).

A TB disseminou-se na Europa com a urbanização crescente durante a revolução industrial, sendo conhecida em meados do século XVIII como “peste branca”. No ano de 1882, Robert Koch anunciou a descoberta do agente causador da TB, que ficou conhecido como bacilo de Koch (BK). Esta descoberta foi o marco fundamental para o início do conhecimento da doença (Koch 1891). Estima-se que cerca de 8,6 milhões de novos casos de TB ocorreram em todo o mundo e que 1,3 milhão de pessoas morreram devido à doença

durante o ano de 2012. Destes, cerca de 60% dos casos ocorreram na região do pacífico ocidental e no sudoeste da Ásia especialmente na Índia. China e Índia somam juntas 12% do total de novos casos. As Américas não figuram mais entre os continentes de maior incidência da doença, o Brasil, entretanto, é um dos 22 países priorizados pela organização mundial da saúde (OMS) que concentram 80% da carga mundial de TB, ocupando a posição 17 no ranking de incidência de casos no ano de 2012. Ano em que 92 mil novos casos da doença foram notificados (WHO 2014). O Estado do Rio de Janeiro é o que concentra a maior quantidade de indivíduos infectados e o grande Rio a área de maior concentração do Estado. Os dados mais recentes da epidemiologia de TB na cidade do Rio de Janeiro são de 2009 e mostram uma incidência de 95,3 casos por 100.000 habitantes. O estudo avaliou ainda as áreas com maior incidência e indicou a área de Manguinhos/Bonsucesso a terceira de maior índice com 313 casos por 100.000 habitantes (totalizando 174 casos) (Dowdy et al. 2012).

1.2. A imunopatogênese da TB

A infecção do hospedeiro pelo *M. tuberculosis* segue uma sequência bem definida de eventos. O processo se inicia quando o indivíduo inala o bacilo contido em aerossóis presentes no ar, ao alcançar os pulmões, a micobactéria é fagocitada, principalmente, por macrófagos alveolares. As células infectadas são ativadas e produzem diversos mediadores, com o intuito de eliminar a micobactéria promovendo um processo inflamatório local. A produção de citocinas e outros mediadores quimiotáticos induzem a migração de neutrófilos e células mononucleares para o foco infeccioso. As células recrutadas para o local iniciam o processo de formação do granuloma (Russell 2001). A reação inflamatória granulomatosa tem como intuito conter e prevenir a propagação da micobactéria, entretanto gera um comprometimento funcional dos pulmões devido à necrose tecidual e fibrose (Abbas, Lichtman, and Pillai 2008).

1.2.1. O reconhecimento do *M. tuberculosis* pelo hospedeiro

Para que a resposta imune inata obtenha sucesso na defesa contra patógenos, o primeiro evento é a detecção do invasor e, em seguida, montagem da resposta antimicrobiana adequada. As células que compoem a resposta imune inata, realizam o reconhecimento de patógenos através dos receptores de reconhecimento de padrões moleculares conservados associados a patógenos (PAMPs). A micobactéria é reconhecida por ativar pelo menos duas famílias diferentes destes receptores: os receptores do tipo “toll” (TLR) e os receptores do

tipo de domínio de nucleotídeos por oligomerização (NOD). Esta interação entre micobactéria e célula hospedeira se dá, principalmente, através de componentes da parede micobacteriana e dos receptores extra membranares de células da resposta imune inata. Comumente esse contato é feito entre manose e lipoarabinomanana, da micobactéria, e de manose ou de complemento ou ainda via TLR2 ou TLR4 de maneira CD14 dependente ou independente. O heterodímero TLR2 e TLR1 reconhece uma lipoproteína triacetilada derivada de *M. tuberculosis*, que resulta na ativação de NF- κ B que conduz à produção de citocinas pró-inflamatórias e a atividade antimicrobiana direta. O reconhecimento do dipeptídeo de muramilo (MDP), um peptidoglicano, também presente em *M. tuberculosis*, é reconhecido por NOD2 e leva, similarmente, a translocação de NF- κ B iniciando a resposta inflamatória. É interessante notar que em contraste com TLR, NOD2 também resulta na ativação do inflamossoma. Há aumento na transcrição de diversos mediadores pró e anti-inflamatórios como o óxido nítrico (NO), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), IL-12, prostaglandina E2 (PGE2), lipoxina A4 (LXA4) e IL-10 (Blackwell and Christman 1997, Denis, Wedlock, and Buddle 2005, Ernst 1998, Heldwein and Fenton 2002, Velasco-Velázquez et al. 2003, Doherty and Arditi 2004, Liu and Modlin 2008).

Os ácidos micólicos se destacam dentre os diversos PAMPs encontrados nas micobactérias do MTC, devido a sua especificidade relativa ao gênero *Mycobacterium* e a sua peculiaridade estrutural, fisiológica e patológica. Os ácidos micólicos são α -alquil, β -hidroxi ácidos graxos, de cadeia longa, encontrados exclusivamente em bactérias da ordem das *Corynebacterium*, que inclui as bactérias do MTC. Sua estrutura química geral é $R_1\text{-CH(OH)-CH(R}_2\text{)-COOH}$, onde R_1 é uma cadeia de meromicolatos constituída de 50 a 56 carbonos e R_2 , uma cadeia consideravelmente menor, constituída de 22 a 26 carbonos (Bhakta et al. 2004). Micobactérias do MTC possuem 3 principais variantes na cadeia principal, de ácidos graxos, são elas as α -; methoxi- e ceto- micolatos. Os ácidos micólicos encontram-se essencialmente na parte interior da parede celular micobacteriana e são os lipídios mais abundantes da mesma, é interessante notar que dentro de uma espécie o de perfil de ácidos micólicos é altamente preservado, e pode ser um utilizado como um *fingerprint* da cepa (Portevin et al. 2014). Além das funções normais de barreira, proporcionadas pelo esqueleto da parede celular, como a manutenção de uma forma de célula rígida e da pressão de turgescência contra a osmolaridade variável do ambiente, as micobactérias possuem diversas características que são diretamente atribuídas à presença dos ácidos micólicos na sua parede celular. As características mais importantes conferidas por esta estrutura incluem, resistência a lesões químicas, baixa permeabilidade a substâncias antibióticas hidrofóbicas, resistência à desidratação e a capacidade de persistir e prosperar dentro do ambiente hostil do

fagolisossoma de macrófagos (Barry Iii et al. 1998). Linfócitos T também são capazes de reconhecer micobactérias, através da ligação entre ácidos micólicos e CD1b (Rao et al. 2005). Mais recentemente foi demonstrado, de forma interessante, que a proporção de ácidos micólicos livres está diretamente associada à ativação ou inibição da resposta imune inata via TLR2, em células epiteliais e em macrófagos. E que a maior produção de ácidos micólicos está relacionada à fase fisiológica e de estresse em que o *M. tuberculosis* se encontra, como por exemplo, se está intra ou extracelular (Sequeira, Senaratne, and Riley 2014).

Após o reconhecimento dos PAMPs, cada TLR recruta um conjunto de moléculas adaptadoras que ancora ao domínio TIR, como o MyD88 e o TRIF. Iniciando a cascata de sinalização que culmina na secreção de diversos mediadores inflamatórios (Kawai and Akira 2011). As vias de sinalização ativadas por TLR podem ser classificadas como compartilhadas ou específicas. As vias compartilhadas podem ser induzidas por todos os tipos de TLR e pela família das IL-1R. As vias específicas podem ser ativadas por alguns TLR, mas não todos, e não são ativadas pelos IL-1R (Medzhitov 2001).

O MyD88 é utilizado por todos os TLR, com exceção do TLR3, e ainda pelos IL-1R, ativando uma cascata de fosforilação que culmina na translocação do NF- κ B para o núcleo e indução da transcrição de mediadores inflamatórios (Kawai and Akira 2011). O MyD88 contém dois domínios de interação, um amino terminal morto e um carboxy-terminal TIR. O MyD88 se associa ao TLR através do domínio TIR de ambos enquanto o domínio amino-terminal se associa ao domínio morto da IRAK, recrutando a para o complexo (Medzhitov 2001). A ativação da via dependente de MyD88 resulta na indução de diversos genes, sendo alguns críticos na modulação da transcrição dependente de NF- κ B (Kawai and Akira 2010). A regulação negativa da via se dá através de diversas proteínas, como o MyD88 solúvel (MyD88s), IRAKM, SOCS1, NOD2, PI3K e TOLLIP, evitando assim uma superativação da resposta que pode ser prejudicial ao hospedeiro (Liew et al. 2005).

A participação do MyD88 vem sendo descrita como essencial na contenção inicial das infecções micobacterianas, pelo hospedeiro. Foi demonstrado que macrófagos e células dendríticas nocautes para MyD88 são incapazes de formar uma resposta imunológica eficiente contra o *M. tuberculosis* sucumbindo a infecção (Fremond et al. 2007). Além da participação da indução da inflamação com o intuito de conter a infecção, o MyD88 tem importante participação na contenção da micobactéria no interior do fagolisossomo (Rahman et al. 2014).

1.2.2. A resposta imune do hospedeiro contra o *M. tuberculosis*

Considerando que algumas cepas são capazes de evadir a resposta imune inata, podendo sobreviver e replicar dentro dos chamados macrófagos em repouso, a exposição de macrófagos à citocinas e outros moduladores específicos são de suma importância para a morte intracelular do *M. tuberculosis*.

Estudos mostram a indução de secreção de citocinas por certas cepas de *M. tuberculosis*, como o TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por macrófagos ativados. O TNF- α provoca uma reação inflamatória local com recrutamento de neutrófilos e células mononucleares prevenindo a disseminação da infecção. Durante o processo infeccioso esta citocina atua auxiliando na contenção da infecção e do crescimento bacteriano através da indução de formação do granuloma (Flynn et al. 1995, Smart and Casale 1994, Bekker et al. 2001, Bean et al. 1999, Kisich et al. 2002). O TNF- α é essencial para o controle da TB em seres humanos e em animais experimentais; embora o TNF- α tenha um efeito pleiotrópico, suas ações predominantes durante o processo infeccioso contribuem para a ativação de macrófagos e consequente morte de micobactérias intracelulares. Induz, ainda, ativação da apoptose de células infectadas, auxiliando na contenção da infecção (Solovic et al. 2010, Balcewicz-Sablinska et al. 1998, Clay, Volkman, and Ramakrishnan 2008).

Entretanto um dos mecanismos de evasão utilizados pelo *M. tuberculosis* na subversão das defesas do hospedeiro consiste na manipulação da produção de TNF- α a seu favor. Isso se dá, principalmente, pela habilidade da micobactéria em expressar e secretar uma adenilato ciclase que modula a produção de TNF- α por macrófagos. Há, então, um aumento nos níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e consequentemente de TNF- α com agravamento da imunopatologia levando a um aumento da sobrevivência micobacteriana (Agarwal et al. 2009). Além disso, em infecções graves onde o estímulo é muito intenso e constante, o TNF- α passa a ser produzido e liberado em altíssimas concentrações que geram respostas anômalas como caquexia (perda de células musculares e adiposas) e perda de apetite, gerando distúrbios metabólicos, como hipoglicemia e indução de febre (Bean et al. 1999, Kindler et al. 1989, Tramontana et al. 1995).

Uma importante citocina envolvida neste processo é a IL-6 que atua na resposta inicial as micobactérias auxiliando no estabelecimento da inflamação aguda, na hematopoese e na diferenciação de linfócitos (Raja 2004). A IL-6 é uma citocina pluripotente que atua tanto na imunidade natural, estimulando a produção de neutrófilos na medula, quanto na imunidade adquirida, estimulando a maturação de linfócitos B. É sintetizada por fagócitos, células endoteliais e fibroblastos, em respostas a microrganismos e a outros mediadores como TNF- α ,

IL-1 β e PGE2, e indiretamente pela translocação nuclear do NF- κ B. Evidências indicam que a IL-6 está relacionada à exacerbação da resposta inflamatória, na cronificação e no desenvolvimento de doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, através da ativação de linfócitos Th17 e supressão de linfócitos T reguladores (Kishimoto 2010).

A IL-12 liberada por macrófagos ativados atua na diferenciação e expansão da população de linfócitos Th1, induzindo a liberação de IFN- γ por essas células. Os linfócitos T ativados liberam IFN- γ que exerce inúmeras funções na resolução da infecção, tem papel na indução do processamento do antígeno, bem como na ativação de macrófagos (Collins and Kaufmann 2001). O IFN- γ é absolutamente essencial para o controle da infecção em humanos e camundongos. Após o aparecimento da imunidade adquirida, os macrófagos são ativados por IFN- γ , principalmente a partir de linfócitos T, que, entre outros efeitos, ativa os mecanismos antimicrobianos de macrófagos. O tratamento de macrófagos murinos com IFN- γ antes da infecção com *M. tuberculosis* induz a ativação das células e leva a um aumento significativo na morte das bactérias, seguido pela ativação da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e produção de espécies intermediárias de nitrogênio (RNI) (Tailleux et al. 2008).

Além das citocinas, propriamente ditas outros mediadores tem importante atuação no processo inflamatório gerado pela infecção, tais como mediadores e estruturas lípidicas e ainda a liberação de NO.

As ações da iNOS e a liberação de NO representam um mecanismo de defesa antimicobacteriana poderoso e necessário. Macrófagos ativados liberam NO que tem ação micobactericida direta (Liu and Modlin 2008). O NO é um gás formado pelo oxigênio molecular e a L-arginina numa reação catalisada pela NOS. Existem três isômeros dessa enzima, encontrada em tipos celulares distintos. A iNOS é expressa por macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e outros tipos celulares em resposta a estímulos patológicos, como micobactérias do MTC. Há, ainda, outros dois tipos da enzima, que são constitutivas e que respondem a estímulos fisiológicos, a NOS endotelial (eNOS) e a NOS neuronal (nNOS), presentes, predominantemente, no endotélio e nos neurônios, respectivamente (Moncada, Palmer, and Higgs 1991, Rang et al. 2003). O NO atua no controle do crescimento e sobrevivência de micobactérias tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular de macrófagos, neutrófilos e outras células (Chan et al. 1992, MacMicking, Xie, and Nathan 1997). O aumento de NO tem sido bem descrito como um fenômeno característico de infecções micobacterianas, incluindo o ensaio de pleurisia induzida pelo *M. bovis*-BCG (Chan et al. 2001).

Lipídios apresentam-se como principal componente estrutural das membranas celulares, atuando como barreiras físicas de entrada e saída da célula. Por muito tempo, acreditou-se que lipídios teriam apenas um papel estrutural e no armazenamento de energia. Nos últimos anos, sua importância vem sendo elucidada, foi comprovada a importância dos lipídios na sinalização celular, micro organização e dinâmica do domínio de membrana, e ainda nos processos inflamatórios (van der Meer-Janssen et al. 2010).

Os corpúsculos lipídicos (CL) vêm sendo reconhecidos como organelas funcionalmente ativas vinculadas a diversas funções biológicas e doenças humanas (Melo et al. 2011). Participam na regulação do metabolismo lipídico, do tráfego membranar e na produção de mediadores inflamatórios a partir do ácido araquidônico (AA) atuando na regulação da inflamação. Estímulos extracelulares como o aumento do colesterol extracelular, alterações nas reservas de AA e durante processos infecciosos levam a indução da formação de CL (D'Avila et al. 2006).

Estruturalmente, os CL consistem de um núcleo de lípidos neutros (triacilglicerol e colesterol éster), envoltos por uma monocamada de fosfolípidos (Tsuchi-Sato et al. 2002, Ozeki et al. 2005). Os CL apresentam uma composição proteica peculiar denominada proteínas da família PAT, que dentre outras inclui a perilipina. Além das proteínas PAT duas outras proteínas, em mamíferos estão diretamente relacionadas aos CL. A proteína relacionada com a diferenciação do tecido adiposo (ADRP), e a proteína de interação com a cauda de 47 kDa (TIP 47) que estão implicadas na montagem e biogênese dos CL (Bozza, Magalhães, and Weller 2009, Tansey et al. 2004). A perilipina é encontrada exclusivamente na superfície exterior de CL, enquanto a ADRP é encontrada tanto em CL quanto em ER, a TIP47 é estável tanto como uma proteína citosólica solúvel e quanto associada com CL (Robenek et al. 2006, Tansey et al. 2004).

Um dos mecanismos fisiológicos de formação e degradação de CL depende do equilíbrio entre perilipina, uma proteína encontrada apenas em CL, e o hormônio lipase sensível (HSL). O mecanismo desta reação lipolítica está relacionado com a ativação da adenilil-ciclase (AC), o que leva a um aumento do cAMP e a fosforilação tanto da HSL quanto da perilipina (Tansey et al. 2004). A mudança conformacional da perilipina fosforilada permite a adesão do HSL fosforilado à membrana do CL. Estes eventos são seguidos por um aumento de triacilglicerol (TAG), lipólise e, conseqüentemente, uma diminuição no número de CL (26). A autofagia também poderia desempenhar um papel na manutenção e degradação de CL. Em resposta a uma diminuição, em curto prazo, da disponibilidade de lipídios ou durante a fome, a autofagia é aumentada, conduzindo a um consumo de lipídios armazenados em diversas formas no interior da célula, inclusive CL. A inibição da autofagia aumenta os

níveis de lipídios celulares, bloqueando este processo de degradação e promovendo o acúmulo de lipídios (aumento do tamanho dos CL) (Singh et al. 2009).

Tem sido relatado que a infecção por micobactérias pode induzir e aumentar o número de CL na célula hospedeira. Em macrófagos, o aumento da acumulação de lipídios, conduz à formação de macrófagos espumosos que participam num processo mais tardio na formação do granuloma e consequente manutenção da infecção. De maneira interessante, macrófagos infectados com cepas virulentas demonstraram maior número de CL do que quando infectados com uma cepa avirulenta (Singh et al. 2012) sugerindo uma relação entre a acumulação de CL e a evasão ao hospedeiro. O *M. tuberculosis* é conhecido pela sua capacidade em evadir e manipular o sistema imune do hospedeiro (Tanigawa et al. 2012, Russell et al. 2009) foi demonstrado por microscopia eletrônica, que o fagossoma contendo o bacilo migra em direção ao CL englobando-o; a organela hospedeira é usada como fonte lipídica pelas micobactérias, que sob estresse no interior de células, induz necrose favorecendo a disseminação. Em estudos experimentais com *M. bovis*-BCG verificou-se que este patógeno é capaz de induzir aumento na formação de CL dentro dos macrófagos dose-tempo-dependentes. E que a presença de CL nos macrófagos ativados está associada a liberação de citocinas como IL-10 e TNF- α e ainda a PGE2 (Anes et al. 2006, Russell et al. 2010, D'Avila et al. 2006).

A PGE2 é um derivado eicosanoide sintetizado a partir do AA pela ação da enzima cicloxigenase do tipo 2 (COX-2). A produção de PGE2 pode ocorrer no interior de CL, evitando a ruptura de membranas celulares para obtenção do AA, que está armazenado na forma de éster no interior dessas organelas. A síntese de PGE2 foi diretamente relacionada ao aumento na formação de CL no interior de macrófagos infectados pelo *M. bovis*- BCG. O aumento de PGE2 relaciona-se também ao aumento de IL-10 e na inibição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , MCP-1 e MIP-1 α (Mancini and Di Battista 2011, D'Avila et al. 2006).

A IL-10 é uma citocina multifuncional com efeitos diversos sobre a maioria dos tipos celulares hematopoiéticos. Entretanto esta citocina é, principalmente, reconhecida pela sua capacidade de limitar e, finalmente, encerrar as respostas inflamatórias, através da supressão de células T efetoras, monócitos e macrófagos. Além destas atividades, a IL-10 regula o crescimento e a diferenciação de células B, NK, linfócitos T auxiliares e citotóxicos, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais. A IL-10 ainda desempenha um papel fundamental na diferenciação de linfócitos T reguladores, estando, portanto indiretamente associada ao controle da resposta imune e da tolerância (Moore et al. 2001). As conseqüências imunológicas do aumento/diminuição de IL-10 durante

a TB são controversas. Nos seres humanos, a IL-10 pode ser encontrada no soro e no lavado broncoalveolar de pacientes com tuberculose ativa e pode ser considerado um importante biomarcador de progressão da doença (Moore et al. 2001). Dados experimentais em camundongos CBA/J infectados com *M. tuberculosis* mostraram que ao se bloquear a ação de IL-10 *in vivo* na infecção crônica, a carga bacteriana pulmonar é estabilizada e há aumento da sobrevivência dos animais (Beamer et al. 2008). Embora a IL-10 tenha sido implicada na reativação de TB nos seres humanos e em camundongos, a inibição de uma citocina que além de ser anti-inflamatória possui outras importantes ações sobre o sistema imune pode acarretar um aumento incontrolável da resposta imune levando a um imenso dano ao hospedeiro (Moore et al. 2001).

1.3. O tratamento contra a TB

1.3.1. Período pré antibioticoterapia

Anteriormente ao desenvolvimento da terapia antibiótica contra a TB, o tratamento se fundamentava apenas na atenuação dos sintomas. Em 174 d.C. o médico grego Clarissimus Galen, que assistia ao imperador romano Marco Aurélio, escreveu que o tratamento adequado para a cura da TB seriam ar fresco, leite e viagens ao mar. No início do século XIX houve o surgimento dos sanatórios para tuberculosos. Os doentes se retiravam da sociedade para um local com ar fresco onde pudessem repousar e aguardar a “melhora” da doença. Em 1859 Herman Brehmer, na época um estudante de medicina, que havia se curado da doença, abriu o primeiro sanatório no vilarejo de Gomersdorf, na Alemanha (Daniel 2006). No Brasil um importante sanatório, que abrigava pacientes com TB foi o sanatório naval de Nova Friburgo no Rio de Janeiro, fundado em 1935, e que seguia a mesma linha de “tratamento” dos sanatórios europeus (Alvarez 2010).

Uma das técnicas utilizadas nos sanatórios, como tentativa de melhorar o estado dos pacientes, era a indução de pneumotórax. A técnica consistia na retirada de ar dos pulmões, a falta de oxigênio levava à morte da micobactéria. Cirurgiões injetavam ar através de uma incisão na cavidade torácica, gerando o acúmulo de ar entre as duas faces da pleura. Este acúmulo de ar no espaço pleural comprime o pulmão, que fica sem ar. É provável que o pneumotórax fosse uma terapia útil, principalmente porque em muitos pacientes era observado o fechamento da cavidade acompanhado de conversão negativa do escarro. O primeiro relato desse procedimento data de 1834, realizado com sucesso por Ramadge, em Londres (Daniel 2006).

Em 1890, Koch foi capaz de isolar substâncias do bacilo que chamou de tuberculina. Acreditava-se que injeções de tuberculina poderiam vir a ser um tratamento contra a TB, atenuando a patogenicidade da bactéria caso entrasse em contato com o hospedeiro. Como teste, Koch injetava o concentrado em si mesmo, mas observava apenas um grande aumento da temperatura corporal (em torno de 39°C) (Koch 1891), mais tarde a tuberculina passou a ser utilizada como teste diagnóstico para confirmação da TB. No ano de 1921, Albert Calmette e Camille Guérin desenvolveram a primeira vacina contra a TB a partir de cepas atenuadas de um bacilo encontrado em bovinos, dando início ao controle da doença em todo o mundo (Calmette 1928). A vacina ficou mundialmente conhecida como Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) e ainda é utilizada nos dias atuais em diversos países onde a TB é endêmica.

1.3.2. Desenvolvimento dos primeiros antibióticos

A penicilina foi descoberta por Alexander Fleming, em 1928, quase quatro décadas desde que Robert Koch, em 1882, havia isolado o agente etiológico da TB. A penicilina é produzida por um fungo do gênero *Penicillium* sp., e possui um amplo espectro de ação contra várias bactérias Gram negativas e positivas. A viabilização do seu uso pela população, só ocorreu 13 anos depois de sua descoberta, no ano de 1941, em soldados durante a Segunda Guerra Mundial. Esta passou a ser utilizada no tratamento de inúmeras doenças de origem infecciosa obtendo sucesso na cura da maioria delas. Muitos autores consideram que, apesar da penicilina não ter ação sobre o *M. tuberculosis*, sua descoberta é o início de uma nova era no tratamento da doença (Fleming 1929, Abraham et al. 1992).

Em 1943, Jorgen Lehmann descobriu o ácido paraamino salicílico (PAS) e em 1945 Gerhard Domagk descobriu a tiosemicarbazona que, juntos, tornaram-se o primeiro tratamento eficaz contra a TB, sendo ambos apenas bacteriostáticos. A estreptomicina, produzida pelo fungo *Streptomyces griseus*, descoberta por Selma Walk em 1944, foi o grande marco no tratamento desta patologia tendo apenas o inconveniente de ser administrada por via intravenosa. Após a estreptomicina, foi desenvolvida em 1952 a isoniazida que veio a ser o primeiro medicamento micobactericida administrado por via oral. Subsequentemente, foram desenvolvidas a rifampicina em 1957, o etambutol em 1960 e a pirazinamida em 1970 (de Souza and Vasconcelos 2005). Portanto, quase 100 anos após a descoberta do agente etiológico da TB por Koch, foram desenvolvidos tratamentos eficazes com medicamentos capazes de matar a micobactéria, promovendo a cura da doença.

1.3.3. Tratamento atual

Na década de 80, a TB havia sido controlada nos países desenvolvidos. No início da década de 90, com o grande aumento do número de indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), a TB volta ao cenário mundial como uma doença re-emergente. Tal fato levou a OMS a declarar estado de emergência, criando, posteriormente, o programa “Stop TB”, constituído por instituições de alto nível científico e poder econômico. Outros fatores contribuem para o aumento global da TB principalmente nos países subdesenvolvidos. Encontram-se entre eles: o aumento da pobreza, a falta de saneamento básico, moradias superlotadas, falta de informação e ausência de programas eficazes no tratamento e prevenção da doença (Ruffino-Netto 2002, de Souza 2006). O tratamento atual recomendado pela OMS e utilizado pelo Ministério da Saúde do Brasil consiste no uso concomitante da rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol durante os dois primeiros meses de tratamento seguidos de quatro meses de uso da rifampicina conjugada à isoniazida (Arakaki-Sanchez and Brito 2011).

O surgimento de cepas resistentes ao tratamento padrão está relacionado ao tratamento da TB. Teoriza-se que o surgimento dessas cepas ocorra principalmente, pelo abandono ao tratamento antes da eliminação completa da micobactéria, impossibilitando a cura destes indivíduos. O abandono do tratamento, antes da esterilização completa do *M. tuberculosis* é creditado ao longo tempo de duração do tratamento associado a um grande número de comprimidos a serem administrados diariamente, e ainda a presença de inúmeros e desagradáveis efeitos colaterais. As cepas resistentes foram classificadas em dois tipos, segundo a OMS: MDR, cepas multi droga resistente, e XDR, cepas extremamente resistente. Existe ainda, um terceiro tipo de cepa resistente, que não é reconhecido pela OMS, são as TDR, cepas totalmente resistentes (Organization 21-22 March 2012, WHO 2014)

São consideradas cepas MDR-TB aquelas em que o *M. tuberculosis* é resistente a pelo menos rifampicina ou isoniazida ou quando ao final do tratamento a baciloscopia se mantém positiva. O tratamento a ser seguido no caso de MDR-TB compreende medicamentos injetáveis. Faz-se inicialmente uso concomitante de estreptomicina, etambutol, levofloxacina, pirazinamida e terizidona, durante seis meses e de estreptomicina, etambutol e levofloxacina por um ano (Arakaki-Sanchez and Brito 2011). Segundo a OMS, 94 mil novos casos de TB causada por cepas MDR foram notificadas no ano de 2012 e o maior aumento na incidência ocorreram na Índia, África do Sul e Ucrânia (WHO 2014).

As cepas XDR-TB são aquelas que mostram resistência ao tratamento com rifampicina e isoniazida associadas a uma fluorquinolona que pode ser o ciprofloxacino ou o

orfloxacino e ainda a um dos três fármacos injetáveis de segunda linha, amicacina, kanamicina ou capreomicina. O tratamento nesses casos é realizado de acordo com características individuais do paciente e prescrito por médicos experientes no tratamento de TB (Arakaki-Sanchez and Brito 2011). Em 2012, foi registrada a ocorrência de ao menos 1 caso por XDR em 92 países. Em média 9,6% dos casos de MDR-TB são XDR-TB (WHO 2014).

O primeiro relato de TDR-TB foi realizado no Irã em 2009, e o termo foi cunhado pelo grupo que fez a descoberta, após o isolamento de cepas resistentes ao tratamento utilizado, entre pacientes com MDR-TB ou XDR-TB. Segundo os autores as cepas isoladas de material coletado de pacientes apresentaram resistência a todos os medicamentos de segunda linha- aminoglicosídeos, fluorquinolonas, tioamidas, derivados de ácido salicílico, análogos de serina e polipeptídios cíclicos (Velayati et al. 2009). Após o relato da ocorrência de casos de TDR-TB em pacientes no Irã, outros países como Índia (Udwadia et al. 2007) e África do Sul (Klopper et al. 2013), também relataram a ocorrência de cepas resistentes a todos os medicamentos de segunda linha. Apesar das evidências clínicas e microbiológicas o termo TDR, não é reconhecido pela OMS. Segundo a organização, o isolamento e identificação de cepas resistentes demandam mão de obra extremamente especializada e metodologia acurada, o que dificultaria a comprovação de que estas cepas são resistentes a todos os antibióticos disponíveis para o tratamento da TB. Portanto as cepas descritas como TDR-TB, segundo recomendação da OMS, devem ser classificadas como XDR-TB (Organization 21-22 March 2012).

1.3.4. Perspectivas de novos tratamentos

A eficácia de um medicamento é o principal objetivo almejado no desenvolvimento de novos fármacos, entretanto outras propriedades devem ser consideradas para a obtenção de um medicamento verdadeiramente eficiente contra a TB. Um novo regime que fosse considerado ideal deveria ser rapidamente bactericida e possuir atividade de esterilização potente para alcançar a cura estável em um período de tempo mais curto do que os atuais seis meses necessários para o tratamento de TB sensível. Para se atingir tal tratamento, deve-se desenvolver um regime capaz de matar todas as subpopulações de *M. tuberculosis*. Para tanto há necessidade de se incluir medicamentos que apresentem novos mecanismos de ação garantindo a eliminação de cepas resistentes aos tratamentos atuais. Além disso, os novos tratamentos devem ser bem tolerados e não apresentarem incompatibilidade farmacológica

e/ou farmacocinética quando coadministrados com medicamentos anti-HIV (Mdluli, Kaneko, and Upton 2014).

Depois de 50 anos sem o desenvolvimento de drogas anti-TB, um promissor “pipeline” é formado por estudos que focam a reengenharia e o reaproveitamento de medicamentos antibacterianos existentes, além da descoberta de novas substâncias. Nos últimos 10 anos, graças ao alto investimento realizado por cientistas, organismos de financiamento e de outras organizações como “Stop TB” e OMS, têm levado a um renascimento da atividade na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos contra a TB. Estes esforços culminaram em avanços históricos na terapêutica da TB, incluindo a recente aprovação, por as agências reguladoras, do uso de duas drogas: delamanida (anteriormente conhecido como OPC67683) e bedaqualina (também conhecido como TMC207 ou R207910) (Zumla, Nahid, and Cole 2013, Zumla et al. 2014).

Uma série de novas substâncias anti-TB estão em desenvolvimento pré-clínico, e vários estudos clínicos em fase 2 e 3 de testes estão em andamento, além disso o uso de terapias complementares também vem sendo explorado. Combinações entre medicamentos novos e existentes estão sendo avaliados para encurtar a duração da terapia e para o tratamento da MDR-TB (Zumla, Nahid, and Cole 2013). Dez substâncias encontram-se em estudo clínico de desenvolvimento, sendo destas, seis novas substâncias que atuam especialmente contra a TB e quatro são substâncias já utilizadas para o tratamento de outras infecções bacterianas, e que atualmente estão tendo seu uso contra a TB reavaliado, como veremos a seguir (WHO 2014).

1.3.4.1. Fluorquinolonas

As primeiras fluorquinolonas foram desenvolvidas na década de 80. São antimicrobianos de amplo espectro, que apresentam atividade contra bactérias Gram negativas, como *Escherichia coli* e Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, bem como sobre micobactérias. Apresentam ainda potencial ação sobre microorganismos resistentes a aminoglicosídeos, penicilinas, cefalosporinas e tetraciclinas. Seu alvo de ação é a DNA girase e a topoisomerase IV, enzimas envolvidas na replicação bacteriana bem como no reparo e na decatenação do DNA (de Souza 2006, Mitscher 2005). As fluorquinolonas estudadas para o tratamento da TB, o gatifloxacino e o moxifloxacino, apresentam ação contra essas duas enzimas impedindo desta forma a proliferação bacteriana, diminuindo a probabilidade do surgimento de cepas resistentes. Estudos *in vitro* mostram que o gatifloxacino e o moxifloxacino tiveram ação mais potente contra o *M. tuberculosis*, quando comparada ao

ciprofloxacino, uma fluorquinolona mais antiga (Rodríguez et al. 2001). Estudo realizado em camundongos mostra que a substituição de alguns medicamentos de primeira linha por essas fluorquinolonas reduziram o tempo de cura da TB (Nuermberger et al. 2004).

Gatifloxacino e moxifloxacino encontram-se em estudo clínico de fase 3. O objetivo do estudo é avaliar a possibilidade da substituição do uso de etambutol por gatifloxacino ou moxifloxacino. Esta mudança acarretaria uma redução no tempo de tratamento para 4 meses (Dorman et al. 2009).

1.3.4.2 Nitroimidazóis

Os primeiros nitroimidazóis foram sintetizados a partir de modificações estruturais na azomicina, um produto natural isolado de um estreptomiceto em 1950. Tais modificações levaram a obtenção do metronidazol, que apresenta potente ação contra microrganismos anaeróbios (Korolkovas and de Albuquerque Carneiro de França 2009/2010). O uso do metronidazol no tratamento da Tb surgiu a partir da constatação que a micobactéria sobrevivente, no interior de granulomas estava sob hipóxia. Como era esperado, o metronidazol não é capaz de matar a micobactéria quando esta se encontra em condições aeróbicas, sendo eficaz apenas no tratamento da TB latente. Entretanto, estudo realizado em macacos mostra que o metronidazol quando administrado em conjunto à rifampicina e a isoniazida, diminui o tempo de cura dos macacos com TB ativa (Lin et al. 2012).

Em 2000, uma nova série de nitroimidazóis sintetizada para o tratamento do câncer, teve potente ação sobre o *M. tuberculosis*. Observou-se que estas substâncias agiam sobre cepas ativas e atenuadas de H37Rv e apresentaram baixa toxicidade em modelos murinos de TB (Stover et al. 2000). Os nitroimidazóis são pró drogas que necessitam do co-fator deazaflavina F₄₂₀ para ativação de seu núcleo farmacofórico. Após esta ativação há formação de radicais livres e inibição da síntese dos ácidos micólicos, integrantes majoritários da parede micobacteriana (Singh et al. 2008). O mais promissor dos nitroimidazóis estudados foi o PA-824, que atualmente encontra em estudo clínico de fase 2. Quando comparado com a isoniazida, em doses iguais, foi capaz de diminuir unidades formadoras de colônia (UFC). Camundongos BALB/c, infectados por via intravenosa (i.v.) com a cepa virulenta H37Rv e tratados com PA-824, tiveram contagem de UFC menores que os animais tratados com isoniazida (68). A forma des-nitroimidazol é a forma ativa e é responsável pela geração de RNI, incluindo NO. O acúmulo de NO seria o mecanismo pelo qual o PA-824 eliminaria a micobactéria em sua fase anaeróbia (Singh et al. 2008). Ainda não foi completamente elucidado o mecanismo pelo qual o PA-824 atua na fase aeróbica, é sugerido que seja através

da inibição da biossíntese de ácidos micólicos (Zumla, Nahid, and Cole 2013). É interessante, ressaltar que a própria isoniazida atua sobre a síntese de ácidos micólicos, inibindo sua síntese e levando a morte da micobactéria. Entretanto, esta possui uma enzima arilamina *N*-acetiltransferase capaz de inativar o fármaco e que a deleção de NAT em *M. bovis*- BCG leva a um aumento da morte de micobactérias intracelulares e deficiência na síntese de ácidos micólicos (Bhakta et al. 2004).

Delamanida também conhecido como OPC-67683 é um derivado nitro-dihidroimidazooxazol e assim como PA-824 (e o metronidazol) é uma pró-droga, sua forma nitro reduzida é a forma ativa. Inibe a biossíntese de ácidos micólicos e tem potente ação *in vitro* e *in vivo* contra cepas multi resistentes de TB. A inclusão da delamanida à quimioterapia padrão de tratamento de MDR-TB levou a um aumento significativo na conversão de escarro em apenas dois meses após o início do tratamento (Gler et al. 2012). Delamanida encontra-se em estudo clínico de fase 3, entretanto em 2013, foi concedida uma autorização especial de comercialização pela Agência Europeia do Medicamento (EMA). Seu uso está condicionado a indisponibilidade de outro medicamento eficaz no tratamento de determinadas cepas resistentes (Zumla et al. 2014).

1.3.4.3. Diarilquinolinas

Bedaqualina cujo nome comercial é sirturo, também conhecida como TMC-207 ou R207910, é atualmente, a mais conhecida diarilquinolona. Seu uso no tratamento de MDR-TB foi aprovado pelo FDA no fim de 2012. Entretanto seu uso é restrito a pacientes que não responderam a nenhum outro medicamento e sua administração só pode ser realizada quando associada a outros medicamentos anti-TB (61).

Bedaqualina tem um potente espectro de atividade antimicobacteriana *in vitro*. Sua ação bactericida não se restringe a cepas sensíveis atuando também contra isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistente à isoniazida, rifampicina, estreptomicina, etambutol, pirazinamida e moxifloxacino.

Estruturalmente e mecanicamente, diarilquinolonas são diferentes das fluoroquinolonas e outras classes de quinolinas, incluindo mefloquina e os seus análogos. Como consequência dessas diferenças estruturais moleculares observam-se mecanismo de ação distinto (Andries et al. 2005).

O alvo de ação da bedaqualina foi elucidado utilizando a técnica de isolamento de mutantes resistentes espontâneos e posterior sequenciamento do genoma total do mutante resistente. Esses mutantes apresentaram mutação na subunidade c da ATP sintase, indicando

ser este seu alvo, diferentemente das outras quinolonas em que o alvo de ação é a DNA girase bacteriana (Andries et al. 2005). A morte da micobactéria se dá pela ligação da substância à enzima o que acarreta a diminuição dos níveis de ATP intracelular (Haagsma et al. 2011).

A avaliação da eficácia, da farmacocinética e dos efeitos adversos do tratamento com bedaqualina foi realizada em pacientes portadores de MDR-TB. A eficácia desta substância foi analisada em relação à diminuição do número de UFC dos pacientes estudados. Além disso, foi observada a baixa ocorrência de efeitos colaterais e conseqüentemente, pequena desistência ao tratamento (Diacon et al. 2009). Outra interessante característica deste medicamento é sua atividade equipotente contra bacilos replicantes e dormentes de *M. tuberculosis*. Sua ação sobre bacilos dormentes também está relacionada a síntese *de novo* de ATP que é essencial para a viabilidade de micobactérias dormentes (Zumla, Nahid, and Cole 2013).

1.3.4.4. Rifamicinas

As rifamicinas são um grupo de antibióticos pertencentes à família das ansamisinas. São substâncias macrocíclicas produzidas pelo fungo *Amycolatopsis mediterranei*. O produto bruto, obtido da fermentação do fungo *A. mediterranei*, foi isolado pela primeira vez por Sensi e colaboradores em 1957. Em sua grande maioria as substâncias isoladas se apresentaram instáveis e tóxicas. A substância encontrada em maior quantidade, e mais estável, foi a Rifamicina B, que, entretanto, mostrou-se pouco eficaz. A rifamicina B foi modificada para rifamicina SV o precursor semi-sintético da rifampicina (Sensi 1983).

A rifampicina, o principal representante da classe das rifamicinas, é um dos medicamentos de primeira escolha para o tratamento da tuberculose (TB), porém seu uso excessivo vem promovendo o surgimento de cepas resistentes (de Souza 2006b). Seu principal mecanismo bactericida consiste na inibição da RNA polimerase de procariotos. Sua ação ocorre especialmente nas fases iniciais da síntese de RNA, uma vez ultrapassada esta fase inicial o processo de inibição pela rifampicina não é mais observado. Como potentes agentes inibidores da RNA polimerase bacteriana atuam tanto sobre bactérias Gram negativas quanto sobre Gram positivas, especialmente micobactérias (Floss and Yu 2005).

É descrito na literatura que alguns antibióticos apresentam ação não apenas sobre as bactérias, mas também tem importante efeito sobre as células eucarióticas, muitas vezes atuando na modulação da resposta imune. Além da bem descrita atividade antibacteriana o efeito imunomodulador da rifampicina vem sendo estudado. Na isquemia cerebral aguda e na neurodegeneração crônica a rifampicina mostrou uma importante atividade protetora cerebral,

através da inibição do processo inflamatório local (Yulug et al. 2014, Bi et al. 2011), também tem sido demonstrada sua ação supressora na hipersensibilidade tardia (Yuhas et al. 2009). Verificou-se ainda a capacidade de inibição da fagocitose por macrófagos e uma diminuição da liberação de TNF- α pelos mesmos (Mlambo and Sigola 2003). A rifampicina foi capaz de suprimir a quimiotaxia de neutrófilos e modular a liberação de citocinas por este tipo celular (Yuhas et al. 2009).

Entretanto o mecanismo molecular pelo qual a rifampicina modula a inflamação ainda não foi elucidado. É bem descrito que a rifampicina é um potente agonista do receptor pregnane X (PXR) (Moreau et al. 2008). O PXR é um receptor órfão da superfamília de receptores nucleares (NR) composto de reguladores da transcrição que controlam o equilíbrio do metabolismo basal, e que portanto podem afetar a função fisiológica das células (Mani, Dou, and Redinbo 2013).

Rifamicinas semi-sintéticas, mais recentes, vêm sendo avaliadas quanto a sua ação antituberculose. Seu análogo, a rifapentina, aprovada em 1998 para o tratamento da TB, tem o mesmo mecanismo de ação que a rifampicina, mas meia vida maior, possibilitando uma menor frequência na administração durante a realização do tratamento. Estudo realizado em camundongos BALB/c infectados por via intranasal com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv avaliou a ação micobactericida da associação de rifapentina com moxifloxacino. Neste trabalho, os autores avaliaram a diminuição no número de UFC nos pulmões de camundongos infectados. Observaram que em comparação ao tratamento de referência (rifampicina, isoniazida e pirazinamida) o tratamento com a associação de rifapentina e moxifloxacino foi capaz de diminuir o número de UFC mais rapidamente. Indicando que essa associação pode ser utilizada para um encurtamento do tempo de tratamento (Rosenthal et al. 2007).

1.3.4.5. Oxazolidinonas

A linezolida foi a primeira oxazolidinona a chegar ao mercado, em 1998. Apresentou atividade bacteriostática *in vitro* e bactericida *in vivo* contra bactérias Gram positivas. É um antibiótico de amplo espectro podendo ser administrada tanto por via oral quanto por via endovenosa. Atua sobre o ribossomo 70S impedindo a síntese proteica bacteriana (Zurenko et al. 2001).

Estudos *in vitro* mostraram baixa ação da linezolida sobre o *M. tuberculosis*. A linezolida vem sendo utilizada no tratamento da MDR-TB com alta eficácia. 82% dos pacientes com XDR-TB que receberam linezolida foram curados. Apesar da grande

capacidade da linezolida em matar a micobactéria pacientes apresentam graves efeitos adversos ao medicamento (Lee et al. 2012).

Um dos análogos da linezolida- a sutezolida, também conhecido como PNU-100480 encontra-se em estudo clínico de fase 2. A sutezolida foi desenvolvida especialmente para o tratamento da TB, quando testado *in vitro* apresentou um pequeno aumento na atividade bactericida por comparação a linezolida, entretanto a ação *in vivo* é bem melhor (Wallis et al. 2014). Foram realizados também estudos de associação da sutezolida a outros novos medicamentos que estão em fase clínica. Os dados demonstraram que a associação entre a sutezolida e a bedaqualina ou SQ109 tiveram efeitos aditivos, indicando que esses medicamentos podem ser combinados e às terapias que já são utilizadas atualmente (Wallis et al. 2012).

Atualmente, estudos de fase 1 estão sendo realizados para outro análogo da linezolida, o AZD5847, que vem se apresentando como promissor medicamento anti-TB. Assim como a linezolida, o AZD5847 é bactericida e apresenta o mesmo mecanismo de ação, entretanto mostrou-se eficiente contra mutantes resistentes à linezolida. Além disso, seu uso é compatível com outros medicamentos anti-TB (Balasubramanian et al. 2014).

1.3.4.6. Etilenodiaminas

Substâncias análogas ao etambutol vêm sendo estudadas com o intuito de aumentar a potência do mesmo e melhorar o tratamento da TB sensível. Foram sintetizados 26 análogos, dentre estes, o SQ109 foi a substância que apresentou mais potente ação micobactericida *in vitro* e *in vivo* (Protopopova et al. 2005). Utilizando modelo experimental de camundongos C57BL/6 infectados com H37Rv por via intravenosa avaliou-se a ação micobactericida do SQ109 na substituição do etambutol no esquema de tratamento (rifampicina, isoniazida e etambutol). Observou-se que a substituição do etambutol pelo análogo na associação aumentou significativamente a ação micobactericida. Posteriormente foi acrescentado à esta associação a pirazinamida, mimetizando o tratamento padrão utilizado, com substituição do etambutol pelo SQ 109 e observou-se que a morte bacteriana ocorreu com uma semana de antecedência (Nikonenko et al. 2007).

Foi demonstrado que o alvo de ação do SQ109 é uma proteína essencial de membrana micobacteriana, o MmpL3. Esta proteína atua principalmente, no transporte de trealose monomicolato para a parede celular. Ao inibir o MmpL3, o SQ109 inibe a biossíntese de ácido micólico, diferentemente do etambutol que atua na inibição da biossíntese de

arabinogalactona (Tahlan et al. 2012). Atualmente SQ109 encontra em estudo clínico de fase 2 (Zumla et al. 2014).

1.3.4.7. Substâncias aromáticas heterocíclicas

Metabólitos secundários de plantas e fungos são substâncias que contém núcleos aromáticos heterocíclicos que servem como base para a modelagem e síntese de substâncias sintéticas e semi sintéticas que vem sendo utilizadas no tratamento de diferentes doenças (Wade 1999). Dentre as quais destacam-se substâncias contendo anéis furânicos e tiofênicos.

1.3.4.7.1. Anéis furânicos

O furano é um anel aromático que contém quatro átomos de carbono e um heteroátomo, o oxigênio. Nessa estrutura o oxigênio possui um par de elétrons livres que faz ressonância com o restante do anel, gerando uma estrutura estável. Diversos trabalhos descrevem propriedades bactericidas e antifúngicas relacionadas aos anéis furânicos (Wade 1999). Os nitrofuranos são medicamentos utilizados no tratamento de doenças infecciosas e parasitárias do trato gastrointestinal e urinário. Uma delas é a furazolidona que é utilizada no tratamento contra *Giardia lamblia* e comercializada na forma de comprimidos ou suspensão oral. Seu mecanismo de ação consiste na formação de radicais livres intermediários, que destroem as células do parasito (Korolkovas and de Albuquerque Carneiro de França 2009/2010). Outro nitrofurano muito utilizado na clínica é a nifuroxazida que tem propriedade bactericida intestinal. Indicada no tratamento de infecções intestinais graves, causadas por *E. coli* e *Salmonella paratyphy*. Atua sobre as enzimas bacterianas ácido graxo sintetase (FAS) I e II, inibindo a formação da parede celular e conseqüentemente a proliferação bacteriana. Até o momento não há relatos quanto a cepas resistentes (Masunari and Tavares 2007, Korolkovas and de Albuquerque Carneiro de França 2009/2010). Uma série de nitrofurânilamidas foi sintetizada por Tangallapally (2004) como agentes contra TB. Após triagem *in vitro*, algumas das substâncias apresentaram propriedade inibitória sobre a enzima UDP-galactose mutase que é importante na biossíntese da parede micobacteriana. Estes dados indicam perspectivas favoráveis no desenvolvimento de medicamentos anti-TB (Tangallapally et al. 2004).

1.3.4.7.2. Anéis tiofênicos

O tiofeno é um composto similar ao furano, porém no lugar do oxigênio há um átomo de enxofre. Nessa estrutura, assim como o anel furânico, o enxofre possui um par de elétrons livres que faz ressonância com o restante do anel, gerando uma estrutura estável (Wade 1999). Dados da literatura descrevem uma ação bactericida relacionada ao anel tiofênico (Hudson et al. 1989, Marles et al. 1992, Masunari and Tavares 2007).

A tiolactomicina é um antibiótico obtido do actinomiceto do gênero *Nocardia* sp., e exibe amplo espectro de ação, atuando tanto contra bactérias Gram negativas quanto Gram positivas. Apesar de apresentar baixa atividade contra *M. tuberculosis*, atua sobre as enzimas KasA e KasB envolvidas no sistema FAS II, impedindo a síntese da parede micobacteriana. Apresentam alta solubilidade em água, boa absorção e baixa toxicidade (de Souza et al. 2008, Oishi et al. 1982). Uma série de análogos da tiolactomicina foi sintetizada visando aumentar sua potência. As análises comprovaram que a acetilação das cadeias laterais promoveram um grande aumento sobre a inibição da enzima β -cetoacil-ACP sintase. Esta enzima está diretamente relacionada ao processo de condensação dos ácidos micólicos, e consequentemente, da biossíntese da parede micobacteriana (Senior et al. 2004).

Dois recentes estudos revelaram interessante ação de derivados tiofenólicos sobre o *M. tuberculosis*. Uma nova série de derivados tiofenólicos, análogos da tiofenoacetamida (TAA), foi descrita em 2007. Sua síntese, e a de seus análogos, realiza-se em etapa única onde anilinas substituídas ou não, reagem com um cloreto de ácido de tiofenoacetil. Esta reação apresentou um rendimento que variou de 70 a 100%, totalizando a obtenção de 21 derivados. Destes derivados, 9 foram capazes de inibir o crescimento do *M. tuberculosis* H37Rv, quando avaliados pelo método de azul de Alamar. Sua menor concentração inibitória (MIC) variou de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$. As quatro substâncias que apresentaram MIC inferior a 100 $\mu\text{g/mL}$ foram avaliadas quanto a citotoxicidade em macrófagos murinos, pelo método de sal de dimetil-tiazol-fenil brometo de tetrazólio (MTT). Apenas uma destas substâncias, na concentração mais alta, mostrou-se citotóxica. A substância com menor MIC (25 $\mu\text{g/mL}$) e que não apresentou citotoxicidade para o macrófago foi a própria tiofenoacetamida (Silva Lourenço et al. 2007). Num segundo estudo uma distinta nova classe de tiofenos com habilidade de matar o *M. tuberculosis* foi descrita. Com o intuito de elucidar o alvo de ação desses tiofenos os autores realizaram a análise do genoma total de um mutante tiofeno-resistente. A análise demonstrou um único SNP no gene para Pks13 (Rv3800c) que leva a uma substituição de fenilalanina por serina (F79S). Este estudo demonstrou que esses tiofenos são capazes de atuar na inibição da

enzima Pks13- envolvida numa etapa crítica da biossíntese dos ácidos micólicos (Wilson et al. 2013) fato este que, provavelmente leva à morte da micobactéria.

1.3.4.8. Tratamentos complementares

O uso de uma imunoterapia complementar para o tratamento, principalmente de MDR-TB vem sendo discutido. Estes tratamentos consistem na administração direta de citocinas ou seus inibidores, e ainda outros imunomoduladores químicos e biológicos que podem ser utilizados como fármacos adjuvantes na melhora dos sintomas e efeitos colaterais e com isso encurtar a duração do tratamento e prevenir recaídas (Zumla et al. 2014).

IFN- γ e IL-2 são citocinas de extrema importância no processo de eliminação micobacteriano. Estudos preliminares sobre o tratamento de MDR-TB utilizando IFN- γ em aerosol mostraram resultados promissores. Foi demonstrado que a nebulização com IFN- γ em combinação com o tratamento padrão, leva a diminuição de sintomas, como suores noturnos e febre, e aumentam a taxa de conversão negativa no escarro. Entretanto estudos realizados com IL-2 intravenosa demonstraram resultado oposto ao esperado. Observou-se um ligeiro aumento no tempo de conversão negativa do escarro de pacientes tratados com a IL-2. Foi postulado que a IL-2 aumentou o número de células T reguladoras (T regs), resultando em efeito depressivo sobre a resposta imune anti-TB (Uhlen et al. 2012).

Além da terapia com citocinas alguns anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) vem sendo avaliados como possível tratamento complementar ao tratamento padrão. O tratamento anti-inflamatório é voltado para lesões pulmonares granulomatosas geradas por um grande influxo celular para o pulmão. Essas células, como monócitos, linfócitos e neutrófilos, *in situ* produzem PGEs e, por conseguinte, podem ser alvos para a ação de COX-1 e COX-2, principais alvos dos AINEs (Ivanyi and Zumla 2013).

Inúmeras são as possibilidades no que se refere às vantagens e possibilidades de modular o sistema imune hospedeiro auxiliando no combate a TB. Entretanto pontos importantes como a possível modulação exercida pelos antibióticos utilizados no tratamento da doença, reinfecções, infecção por diferentes cepas e TB latente, também devem ser considerados antes do uso de terapias adjuvantes (Zumla et al. 2014).

2. Justificativa

A TB é uma das doenças mais antigas que acomete a humanidade; atualmente, é a segunda doença, com maior taxa de incidência em todo o mundo causada por um agente infeccioso único. Apenas no ano de 2012 foram registrados cerca de 8,6 milhões de novos casos (WHO 2014), logo a busca por novas terapias se faz urgente.

Tiofenos são metabólitos secundários biologicamente ativos de muitas espécies de plantas da família Asteraceae (Champagne et al. 1986), que apesar do amplo espectro de atividades farmacológicas apresentam inúmeros efeitos colaterais em humanos (Marles et al. 1992). A síntese de derivados tiofenólicos tem representado um importante campo de investigação na busca de novos análogos mais seletivos e menos tóxicos ao hospedeiro (Silva Lourenço et al. 2007, Masunari and Tavares 2007, Wilson et al. 2013).

Nosso grupo participou do estudo no qual foi descrita uma nova classe de agentes antimicobacterianos, análogos do TAA. Neste estudo apenas o próprio TAA apresentou ação contra o *M. tuberculosis* e não foi citotóxico contra a célula hospedeira. Avaliando sua estrutura química (**Figura 2.1.**) observa-se a presença do anel tiofênico, que apresenta caráter anti-bacteriano (Mishra, Tomer, and Kumar 2012, Silva Lourenço et al. 2007, Masunari and Tavares 2007) e anti-viral (Hudson et al. 1989, Marles et al. 1992), e ainda um grupo acetamida que ligado ao anel benzênico pode conferir, caráter anti-inflamatório e analgésico à molécula (Casadio et al. 1965, Pala et al. 1965). O TAA apresenta ainda como grande vantagem a síntese, que ocorre em etapa única à temperatura ambiente com um rendimento próximo à 100%, a partir de reagentes de baixo custo e disponíveis comercialmente.

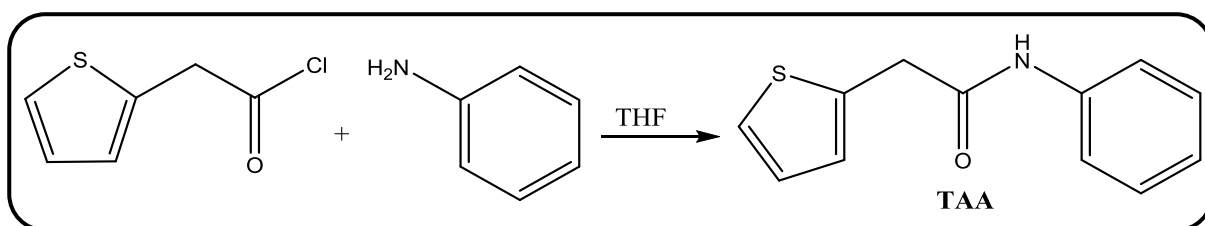


Figura 2.1. Síntese do TAA, a partir da anilina e do cloreto de ácido tiofenoacetil. A reação ocorre em única etapa à temperatura ambiente, em THF (tetrahidrofurano).

As características dos derivados tiofenólicos em especial o TAA descritas, somadas ao interesse mundial em se identificar novos fármacos para o tratamento da TB, nos impulsionaram a realização deste trabalho. Neste estudo avaliamos a ação micobactericida e imunomoduladora do TAA sobre o processo infeccioso e inflamatório gerado por micobactérias do MTC.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Investigar a ação micobactericida e imunomoduladora do TAA na infecção por micobactérias do MTC.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana do TAA sobre o *M. bovis*-BCG, o *M. smegmatis* e a *E. coli*.
- Avaliar a ação imunomoduladora do TAA sobre macrófagos e camundongos infectados com o *M. bovis*-BCG.
- Avaliar a atividade antimicobacteriana e imunomoduladora do TAA sobre macrófagos infectados com o *M. tuberculosis*.

4. Material e Métodos

4.1. Materiais

Os seguintes compostos, substâncias e reagentes foram utilizados: Meio RPMI 1640, SBF, meio DMEM com alta concentração de glicose (Hy Clone), BSA, gentamicina, solução de vitamina, PBS, OPD, α -Naftil-etilenodiamina, saponina, MTT, “Tween” 20, “Ttween” 80 (Sigma), ácido orto-fosfórico, TCH, tetróxido de ósmio, ácido cacodílico, rifampicina, dexametasona, AAS (Sigma-Aldrich), suplemento de meio OADC, estreptoavidina FITC, meio 7H9, meio Luria-Bertani (LB- Difco), azul de Alamar (Biosource/Invitrogen), anticorpos primários e biotinizados para IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-10, proteínas recombinantes de IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-10 (R&D Sistemas), citrato (Reagen), May-Grunwald-Giemsa, sulfanilamida (Merck), nitrito, DMSO (Vetec), macrófagos murinos da linhagem J774A.1 (ATCC TIB-67), anticorpo primário NF- κ B, anticorpo biotilado NF- κ B (Santa Cruz Biotechnology), paraformaldeído (Mallinckralt Chemical), immunomount (Thermo Shandon), Kit para dosagem de PGE2 (Cayman Chemical- item 514010), formalina (TEDIA), TAA (sintetizado pelo Dr. Marcus Vinícius Nora/ Far-Manguinhos - FIOCRUZ), meio Lowenstein Jensen (LJ- gentilmente cedido pela Dr^a. Cristina Lourenço, IPEC-FIOCRUZ), Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (cepa Moreau, cedido gentilmente pela Fundação Ataulpho de Paiva - RJ), *M. smegmatis* (cepa MC² 155), *E. coli* (cepa DH5- α ; cedido gentilmente pela Dr^a Leila Mendonça, IOC-FIOCRUZ), macrófagos murinos imortalizados (cepa selvagem e nocaute para MyD88- cedido gentilmente pela Dr^a Patrícia Pacheco).

4.2. Metodologia

4.2.1. Cultivo do *M. bovis*-BCG

O *M. bovis*-BCG na forma de vacina liofilizada foi reconstituído em salina estéril seguindo as instruções do fabricante, e cultivado em meio LJ por 30 dias a 37°C. Em seguida foi inoculado em meio líquido 7H9 suplementado com 10% de suplemento OADC, e cultivada sob agitação (120 rpm em plataforma oscilatória), à 37°C, por 5 dias. Adicionou-se 3 mL de PBS à suspensão bacteriana que foi centrifugada a 3645 x g, por 15 min. O sobrenadante foi descartado, o *M. bovis*-BCG ressuspendido em 1 mL de PBS e centrifugado

a 405 x g por 6 min. Recolheu-se o sobrenadante para contagem dos bacilos em câmara de Petroff-Hausser.

4.2.2. Irradiação de *M. bovis*-BCG

Cada frasco-ampola contendo *M. bovis*-BCG foi γ -irradiado por uma fonte de $^{137}\text{Césio}$ recebendo um total de 100.000 rads (Ramachandra et al. 2005, Zack et al. 1974). Seguida a irradiação da micobactéria avaliamos sua atividade metabólica pelo método de azul de Alamar.

4.2.3. Cultivo do *M. smegmatis*

Uma alíquota estoque de *M. smegmatis* foi descongelada e semeada em placas contendo meio LB-ágar. Foram incubadas por 3 dias à 37°C. Em seguida foi realizada a inoculação em meio líquido LB com 0,05% de “tween” 80. O cultivo se deu sob agitação (120 rpm em plataforma oscilatória), à 37°C, por 2 dias.

4.2.4. Cultivo da *E. coli*

Uma alíquota estoque de *E. coli* foi descongelada e inoculada em meio líquido LB. O cultivo se deu sob agitação (190 rpm em plataforma oscilatória), à 37°C, por 24 h.

4.2.5. Método de azul de Alamar

A suspensão micobacteriana foi distribuída em placa de fundo chato, com 96 poços, na concentração celular de 3×10^6 /poço, sendo em seguida adicionado em meio 7H9 contendo ou não TAA. A placa foi incubada em estufa, a 37°C, por 6 dias- *M. bovis*-BCG ou por 24 h- *M. smegmatis*. Após a incubação, 50 μL de azul de Alamar e 50 μL de “tween” 20 a 10% foram adicionados separadamente em todos os poços. O crescimento bacteriano faz com que o azul de Alamar seja reduzido e passe da coloração azul ao rosa. Após 24 h de incubação a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Spectra Max 190/Molecular Device) em dois diferentes comprimentos de onda, 570 e 600 nm.

4.2.6. Método de espalhamento (“spread plate”)

O TAA foi adicionado diretamente, em diferentes concentrações, ao meio de cultivo LB e vertido em placas de petri. Após a solidificação das do meio de cultivo foi realizada a semeadura das bactérias. Foram semeados por placa um volume de 100 µL de uma suspensão de *E. coli* numa OD= 0,5 (equivalente, a aproximadamente, 5×10^7 CFU/mL). As placas foram incubadas por 24 h em estufa a 37°C, após a incubação foi realizada a contagem das UFC.

4.2.7. Preparo de meio condicionado

A infecção por micobactérias de macrófagos *in vitro*, não é capaz per si de induzir grande liberação de NO. Portanto neste modelo experimental, utilizamos o meio condicionado como co-estímulo. Este meio apresenta em sua composição, diversa citocinas indutoras de NO, como IFN- γ e IL-2. O meio condicionado foi preparado a partir de baços de camundongos C57BL/6. Os baços foram retirados e macerados em meio RPMI. Após 10 min de centrifugação a 405 x g, o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se tampão de lise de hemácias às células que após nova centrifugação, foram plaqueadas em placas de 6 poços (Nunc™, Thermo Scientific, EUA) numa concentração de 10^6 /poço/mL. Em seguida foram estimuladas com Con-A (5,0 µg/mL) e incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante 48 h. Após esse período o sobrenadante foi recolhido, centrifugado e estocado a -20°C, para uso posterior.

4.2.8. Cultura de macrófagos J774A.1

As células foram descongeladas em banho maria a 37°C, e posteriormente adicionadas a RPMI suplementado com SFB 10% e gentamicina (100:1) aquecido. Cultivadas por 7 dias, em garrafas de 75 cm³, mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. A troca do meio ocorreu a cada 48 h.

4.2.9. Cultura de macrófagos murinos selvagens e MyD88 nocautes

As células foram descongeladas em banho maria a 37°C, e posteriormente adicionadas a DMEM com alta concentração de glicose, suplementado com SFB 10%, ciprofloxacino

(200 mg/mL) e piruvato de sódio (100 mM) aquecido. Cultivadas por 7 dias, em garrafas de 75 cm³, mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. A troca do meio ocorreu a cada 48 h.

4.2.10. Avaliação da citotoxicidade do TAA em macrófagos infectados com o *M. bovis*-BCG

A avaliação da citotoxicidade do TAA foi realizada pelo método de MTT (Mosmann 1983). Macrófagos foram plaqueados, em triplicata, na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/poço/100µL em placa de 96 poços. Após 24 h o sobrenadante foi recolhido. Foi feita a infecção com o *M. bovis*-BCG com MOI 1:1, a placa foi incubada por 6 h em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período os poços foram lavados, com RPMI suplementado sendo em seguida adicionado 100µL de TAA em distintas concentrações de amostra/poço. Como controles, foi adicionado tween 20 a 3%, ou apenas meio RPMI suplementado. A placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% CO₂, por 48 h. Após a incubação foram adicionados 22,5 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço. Após 4 h de incubação, a placa foi centrifugada por 2 min, a 1411 x g e o sobrenadante descartado. Após a adição de 150 µL/poço de DMSO, foi realizada leitura em espectrofotômetro (Spectra Max 190/Molecular Device) 540 nm.

4.2.11. Avaliação da atividade antimicobacteriana do TAA *in vitro*

Macrófagos foram distribuídos em placas de 24 poços (Nunc™, Thermo Scientific, EUA), na concentração de 10^5 células/poço/mL, por 24 h para adesão. Os poços foram lavados e os macrófagos infectados com o *M. bovis*-BCG com MOI 2,5:1. Após 6 h os poços foram lavados com RPMI suplementado e as células tratadas com TAA. Após 24 h, ambos os grupos, tiveram as células lisadas, com uma solução de saponina 0,1%, para quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) intracelular. Uma alíquota de 100 µL da suspensão foi semeada em meio LJ. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C por 30 dias e as colônias foram contadas com auxílio de lupa.

4.2.12. Avaliação da atividade imunomoduladora do TAA *in vitro*

Os macrófagos foram distribuídos em placas de 24 poços (Nunc™, Thermo Scientific, EUA), na concentração de 10^5 células/poço/mL, por 24 h para adesão. Os poços foram lavados e os macrófagos estimulados com *M. bovis*-BCG vivo ou com *M. bovis*-BCG irradiado ambos 10^5 UFC/poço/mL por 6 h; ou ainda estimulados com o LPS (10 ng/mL) por

1h. Após o estímulo os poços foram lavados com RPMI suplementado e as células tratadas com TAA.

Após 24 h, o sobrenadante de ambos os grupos, foi recolhido para avaliação da liberação de citocinas pelo método de ELISA, para a dosagem de nitrito pelo método de Griess, e para a dosagem de PGE2 pelo método de ensaio imunoenzimático (EIA). As células foram fixadas com formalina para coloração com tetróxido de ósmio e posterior contagem de CL.

4.2.13. Dosagem de citocinas pelo método de ELISA de captura

Placas de 96 poços (Nunc-Maxsorp™, Thermo Scientific, EUA) foram incubadas a 4°C com a concentração ótima de anticorpos monoclonais purificados contra IL-6, IL-10, IL-12, IL-1β, TNF-α e IFN-γ. Após 18 h os poços foram lavados com 200 µL de uma solução de tween 20 a 0,05% diluído em PBS-tween. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com 200 µL de PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA). Posteriormente foi plaqueado 100 µL das amostras e da curva padrão (0,23-15 ng/mL). Decorridos 24 h a placa foi lavada e incubada com anticorpo de detecção. Após lavagens a placa foi incubada com estreptoavidina peroxidase e a revelação foi realizada após a adição de tampão citrato/perborato de sódio contendo OPD (500 µg/mL). A reação foi bloqueada pela adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄), 2 M, a leitura realizada por espectrofotometria (Spectra Max 190/Molecular Device) a 490 nm. O resultado foi expresso em ng/mL.

4.2.14. Dosagem de nitrito pelo método de Griess

A quantificação de NO é realizada indiretamente através da dosagem de nitrito. A quantificação de nitrito no sobrenadante foi realizada utilizando o método de Griess. Este consiste na posterior adição de solução de Griess (100 µL/poço) às amostras (100 µL/poço) ou à curva padrão (100 µL/poço), para o desenvolvimento da reação colorimétrica. A curva padrão apresenta a solução de nitrito (100 µM) como primeiro ponto.

A solução de Griess é preparada pela adição de dois compostos numa relação 1:1, a sulfanilamida 1% diluída em ácido ortofosfórico (H₃PO₄) 5% e a α-Naftiletlenodiamina 0,1% diluída em água. A absorbância foi determinada a 540 nm em espectrofotômetro (Spectra Max 190/Molecular Device) e o resultado expresso em µM.

4.2.15. Dosagem de PGE2 pelo método de EIA

Os níveis de PGE2 foram dosados por EIA diretamente no sobrenadante dos grupos controle, infectados e tratados, de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical CO). Foram adicionados 50 µL/poço das amostras previamente diluídas (1:200) em tampão de EIA ou 50 µL/poço da PGE2 nas concentrações de 1000-7,8 pg/mL (diluídas em tampão de EIA) em placas de 96 poços pré revestidas com anticorpo α -camundongo (feito em cabra). Em seguida, foram adicionados o anticorpo monoclonal de camundongo contra PGE2 (50 µL/poço) e a PGE2 conjugada com colinesterase (50 µL/poço) e incubados durante cerca de 16 h em temperatura ambiente. Os poços correspondentes ao controle receberam somente o tampão de EIA e a PGE2 conjugada com colinesterase (50 µL/poço). Após esta etapa, a placa foi lavada (5x) com tampão fosfato de potássio 0,01 M contendo “tween” 20 a 0,05%. Em seguida, foram adicionados 200 µL/poço do reagente de Elmmans, que contém o substrato para a enzima colinesterase (diluído em água deionizada, segundo instruções do fabricante), para revelação. A placa foi incubada sob agitação ao abrigo da luz até ocorrer a reação e lida em leitora de placa a 405 nm. Os dados foram analisados com o programa Soft Max Pro 5.2, e os resultados da dosagem foram baseados na respectiva curva-padrão, e expressos em ng/ml.

4.2.16. Avaliação da translocação de NF- κ B

Macrófagos foram plaqueados em lamínulas de vidro numa concentração de 10^5 células/lamínula/100 µL, incubados por 24 h em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, para adesão. Foram então infectados com o *M. bovis*-BCG por 6 h, com um MOI 1:1 e então tratados com 5 µM de TAA. Após 18 h de incubação as células foram lavadas com PBS 1%, foram então incubadas com paraformaldeído 4% por 1 h. Após lavagem com PBS 1% foi feita a adição de uma solução de PBS/BSA 3%. Decorridos 30 min e após uma nova lavagem adicionou-se uma solução de saponina 0,1% e SBF 10% diluídos em PBS, por mais 30 min. Em seguida as células foram incubadas com anticorpo primário contra NF- κ B, por 12 h. Após lavagem, fez-se nova incubação, com anticorpo biotilado por 30 min. Após lavagem, as células foram incubadas com estreptoavidina-FITC. E subsequentemente coradas com azul de Evans. A montagem das lâminas foi feita com meio de montagem, “Immunomount” (Thermo Shandon). A análise microscópica de fluorescência foi feita utilizando-se microscópio a laser confocal (Fluoview FV300 3.3 Olympus).

As intensidades de fluorescência das imagens originais foram analisadas utilizando-se o analisador de imagens Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics, Wokingham, Berkshire,

Reino Unido). O cálculo do índice de translocação foi realizado fazendo-se a razão entre a média de intensidade de fluorescência do núcleo e a média da intensidade de fluorescência total da célula, utilizando o software ImageJ (Schneider, Rasband, and Eliceiri 2012).

4.2.17. Quantificação de CL

Macrófagos foram plaqueados em lamínulas de vidro numa concentração de 10^5 células/lamínula/100 μ L, incubados por 24 h em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, para adesão. Foram então infectados ou estimulados e então tratados com o TAA e os controles de droga por 24 h. Após a incubação o sobrenadante foi recolhido e os poços foram lavados com PBS estéril para retirada de meio residual. Foram adicionados 500 μ L/poço de formalina a 3,7% com pH 7,4 por 20 min. A formalina foi retirada e os poços lavados com 500 μ L de água destilada (2x). A água foi retirada e fez-se a adição de 1,0 mL por poço de cacodilato de sódio (diluído em água MiliQ, seguindo instrução do fabricante) e 500 μ L por poço de tetróxido de ósmio 2%. A placa foi incubada por 30 min em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação os poços foram lavados com água destilada e fez-se a adição de tiocarbohidrazida (TCH) 1% por 3 min. Após lavagem adicionou-se novamente o ácido cacodílico e o tetróxido de ósmio por 5 min. A contagem dos CL foi realizada em microscópio óptico convencional. Utilizando o parâmetro número CL/macrófago em um total de 50 células analisadas por lamínula.

4.2.18. Imunofluorescência: marcação de ADRP em CL

Macrófagos foram plaqueados em lamínulas de vidro numa concentração de 10^5 células/lamínula/100 μ L, incubados por 24 h em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, para adesão. Foram então infectados com o *M. bovis*-BCG por 6 h, com um MOI 1:1 e então tratados com 5 μ M de TAA. Após 24 h de incubação as células foram lavadas com PBS 1%, foram então incubadas com paraformaldeído 4% por 1 h. Após lavagem com PBS 1% foi feita a adição de uma solução de PBS 1%/BSA 0,2%/triton 0,1%, para permeabilização, por 20 min. Fez-se nova lavagem com PBS 1% e então adição de NH₄Cl 50mM, para bloqueio de marcação inespecífica, por 10 min. Rinsou-se uma vez com a mesma solução de PBS/BSA/triton utilizada acima. Foi feita a incubação com o anticorpo α -ADRP α -camundongo (feito em porquinho da índia) na concentração de 1:100 (diluído em PBS/BSA/triton), por 1 h. Foram realizadas três lavagens com a solução de PBS/BSA/triton e então incubação com anticorpo

secundário “dylight”488 (verde) α - porquinho da Índia (1:500) por 1 h. A montagem da lamínula à lamínula foi precedida de três lavagens com a solução de PBS/BSA/triton.

4.2.19. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas, com peso variando entre 15 – 20 g, procedentes do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia Aplicada de Far-Manguinhos, à temperatura ambiente entre 24 - 26°C e ciclo de claro/escuro de 12/12 h, com livre acesso à ração e água, até o momento do uso. Todos os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados e licenciados pelo comitê institucional de ética animal (CEUA/FIOCRUZ Licença 0004/08).

4.2.20. Pleurisia induzida pelo *M. bovis*-BCG

A pleurisia foi induzida como descrito (Henriques et al. 1990), 30 min após o tratamento. A técnica utiliza um cursor que permite a introdução da agulha (13 x 5 gauge) de aproximadamente 2 mm no interior do lado direito da cavidade torácica dos camundongos. Foram inoculados 100 μ L de salina por cavidade torácica contendo ou 4×10^5 UFC de *M. bovis*-BCG. Animais controle foram injetados com o mesmo volume de salina estéril. Os camundongos foram eutanasiados por inalação de CO₂, 6 h ou 24 h ou 15 dias após o estímulo, sendo posteriormente suas cavidades torácicas abertas e o lavado pleural recolhido com 1,0 mL de PBS estéril. A contagem total de leucócitos foi feita em um contador automático de partículas (Z1; Beckman-Coulter, EUA). O citoesfregaço (Thermo-Shandon EUA) foi corado pelo método de May-Grünwald/Giemsa para diferenciação dos leucócitos por microscópio óptico (1000 x). O lavado pleural foi centrifugado a 400 x g por 10 min. O sobrenadante foi utilizado nas análises dos mediadores pelo método de ELISA e pelo método de Griess.

4.2.21. Tratamento com TAA *in vivo*

Após jejum de 12 h os animais receberam o tratamento por via oral (v.o.) 30 minutos antes do estímulo. Foi realizada gavagem e feita a administração de 100 μ L de xarope de sacarose (veículo) aos grupos controle. TAA (50 mg/kg), rifampicina (25 mg/kg) ou dexametasona (10 mg/kg), solubilizados no veículo foram administrados da mesma forma.

4.2.22. Descontaminação do lavado pleural

O lavado recolhido foi colocado em tubos estéreis, adicionou-se solução de NaOH 4% na relação 1:1. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e incubada a temperatura ambiente. Após 15 min adicionou-se água estéril na proporção 1:1. O material foi centrifugado a 3645 x g por 15 min, sendo descartado o sobrenadante. Ressuspendeu-se o “pellet” para volume inicial (1,0 mL). Uma alíquota de 100 µL deste volume foi semeada nos tubos contendo meio LJ. Decorridos 30 dias foi realizada a contagem das UFC.

4.2.23. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente através do teste de análise da variância (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls-Student. Valores de “p” inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

5. Resultados

5.1. Avaliação da ação antimicobacteriana direta do TAA sobre o *M. bovis*-BCG

Dando continuidade ao estudo publicado que relata a ação do TAA sobre *M. tuberculosis* (Silva Lourenço et al. 2007), pretendemos avaliar a ação do TAA em macrófagos infectados e em animais. Procedeu-se então a análise da ação bacteriostática do TAA pelo método de azul de Alamar. Como mostra a **Tabela 5.1.**, o tratamento com TAA (50 pM; 500 pM; 5,0 nM; 50 nM; 500 nM; 5,0 µM) não inibiu o crescimento bacteriano do *M. bovis*-BCG apenas na dose de 5 pM, a menor concentração usada, foi observada a inibição. O MIC do TAA sobre o *M. bovis*-BCG é de 50 pM.

TABELA 5.1.: Ação micobacteriostática do TAA sobre o *M. bovis*-BCG determinado pelo método de azul de Alamar.

TAA	<i>M. bovis</i> -BCG
5,0 pM	Resistente
50 pM	Suscetível
500 pM	Suscetível
5,0 nM	Suscetível
50 nM	Suscetível
5,0 µM	Suscetível

5.2. Avaliação da ação do TAA sobre o *M. smegmatis* ou *E. coli*

Com o objetivo de avaliar se a ação bactericida era restrita a micobactérias do MTC avaliamos a atividade bacteriostática do TAA sobre o *M. smegmatis*, pelo método de azul de Alamar. Como demonstrado na **Tabela 5.2.**, o TAA não foi capaz de inibir o crescimento do *M. smegmatis* em nenhuma das concentrações analisadas (50 nM; 500 nM; 5,0 µM; 50 µM), indicando portanto uma seletividade contra micobactérias do MTC.

Avaliamos ainda se o TAA teria ação bactericida sobre a *E. coli*, com intuito de eliminar a possibilidade de alteração da flora gastro-intestinal, numa possível administração oral da substância. Foi realizada avaliação utilizando o método de espalhamento (“spread plate”) onde a substância foi adicionada diretamente ao meio de cultivo em placas de petri

Tabela 5.3. Foi observado que o TAA, também, não é capaz de inibir o crescimento da *E. coli*, mostrando mais uma vez sua provável seletividade contra micobactérias do MTC.

TABELA 5.2.: Avaliação da atividade bacteriostática do TAA sobre o *M. smegmatis*, pelo método de azul de Alamar;

TAA	<i>M. smegmatis</i>
50 nM	Resistente
500 nM	Resistente
5,0 µM	Resistente
50 µM	Resistente

TABELA 5.3.: Avaliação da ação bactericida do TAA sobre a *E. coli*, pelo método de “spread plate”.

TAA	<i>E. coli</i>
200 nM	Resistente
1,0 µM	Resistente
5,0 µM	Resistente

5.3. Avaliação da ação do TAA sobre macrófagos infectados com o *M bovis*-BCG

5.3.1. Avaliação da citotoxicidade do TAA

Após a avaliação do MIC, o próximo passo foi avaliar a citotoxicidade do TAA sobre macrófagos murinos infectados pelo *M. bovis*-BCG, para afastar a possibilidade do TAA promover a morte da célula hospedeira. A **Tabela 5.4.** mostra que o TAA não foi citotóxico para nenhuma das doses testadas (5 nM a 50 µM), após 24 h de incubação, sobre a linhagem testada. O mesmo resultado foi observado quando os macrófagos foram incubados com rifampicina (12 µM).

TABELA 5.4.: Avaliação da citotoxicidade do TAA sobre macrófagos infectados com o *M. bovis*-BCG

Amostra	Concentração	Viabilidade
BCG	N/A	100%
TAA	50 nM	100%
	500 nM	98%
	5,0 µM	98%
	50 µM	97%
	500 µM	95%
Rifampicina	12 µM	99%

Tabela 5.4.: O percentual de viabilidade celular foi calculado através do ensaio do MTT, onde macrófagos J774 (10^5 /poço) foram infectados com *M. bovis*-BCG ($2,5 \times 10^5$ bactérias/poço/100 µL), e tratados com TAA (50nM a 500 µM) ou rifampicina (12 µM). Valores de sobrevivência celular inferior a 95% seriam considerados citotóxicos quando comparados ao grupo controle. O grupo controle teve seus valores de sobrevivência normalizados para 100% de viabilidade.

5.3.2. Avaliação da atividade antimicobacteriana do TAA em macrófagos infectados com o *M. bovis*-BCG

A **Figura 5.1.** demonstra que macrófagos incubados com *M. bovis*-BCG, por 6 h, foram capazes de fagocitar a micobactéria apresentando em torno de 6×10^2 UFC/ml. Foi observado que o tratamento, por 24 h com TAA, é capaz de diminuir o número de bactérias

intracelulares viáveis em todas as concentrações testadas (50 nM a 50 µM). Dados semelhantes foram observados após o tratamento com rifampicina (12 µM).

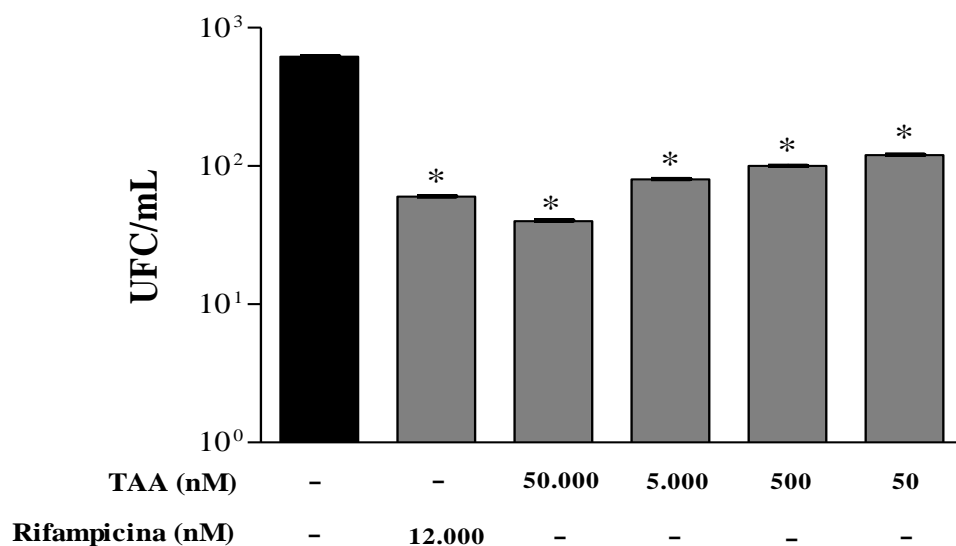


Figura 5.1.: Determinação das UFC encontradas no interior de macrófagos após sua lise. Tratamento com TAA (50 nM- 50 µM) por 24 h após 6 h de infecção com *M. bovis*-BCG ($2,5 \times 10^5$ bactérias/poço/100 µL). A rifampicina (12 µM) foi usada como droga de referência. Os dados são apresentados como média \pm EPM da triplicata por grupo e representativo de 3 experimentos. * $p < 0,001$ em comparação à infecção por *M. bovis*-BCG.

5.3.3 Efeito do tratamento com o TAA na quantificação de UFC no lavado pleural de camundongos infectados com o *M. bovis*-BCG

Os estudos *in vitro* realizados até o momento confirmam a ação micobactericida do TAA. Sendo assim, o próximo passo foi avaliar se a ação micobactericida do TAA também seria observada no modelo experimental de pleurisia induzida por *M. bovis*-BCG.

Observamos que o lavado pleural recolhido de camundongos infectados com *M. bovis*-BCG apresenta um aumento no número de UFC em 6 h, que se mantém alto em 24 h sendo ainda observada em 15 dias. O tratamento com TAA nas doses avaliadas (5, 25 e 50 mg/kg) a partir do tempo de 6 h, promove a diminuição das UFC do lavado pleural, que se torna menor no tempo de 24 h permanecendo até 15 dias após a infecção. Dados semelhantes foram observados após o tratamento com rifampicina (25 mg/kg). Como demonstrado na **Figura 5.2.**, confirmando a capacidade micobactericida observada *in vitro*.

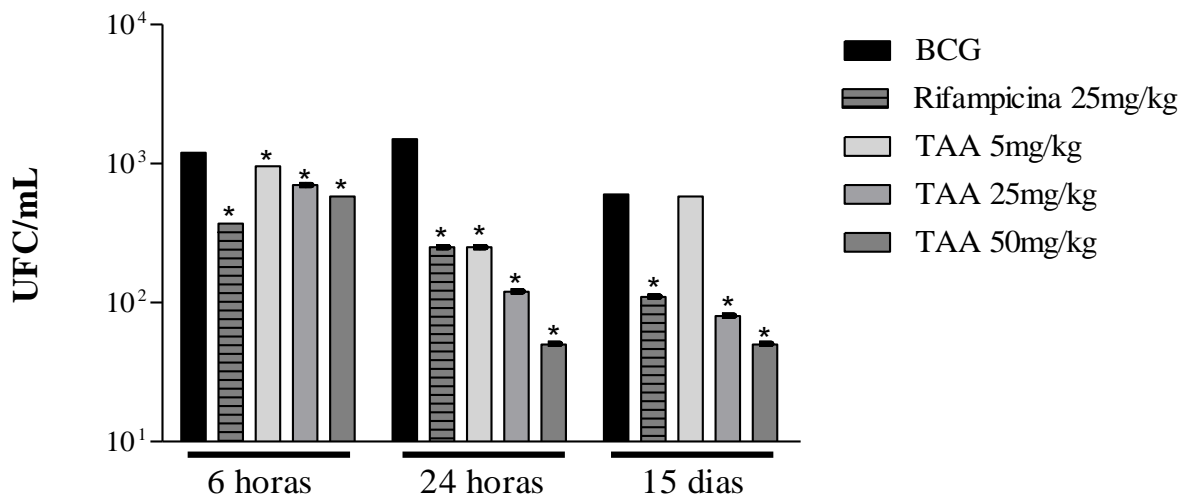


Figura 5.2.: Cinética da quantificação de UFC do lavado pleural recolhido de camundongos C57BL/6 após 6, 24 h e 15 dias da infecção. Os camundongos foram pré-tratados com TAA (5, 25 ou 50 mg/kg, v.o.) ou rifampicina (25 mg/kg, v.o.) 30 min antes da infecção com *M. bovis*-BCG (4×10^5 UFC/cavidade, i.t.). Os dados são apresentados como média \pm EPM da triplicata por grupo e representativo de 3 experimentos. * $p < 0,001$ em comparação à infecção por *M. bovis*-BCG.

5.4. Avaliação da ação imunomoduladora do TAA sobre macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG

Uma vez confirmada a ação micobactericida, fomos avaliar se o TAA seria capaz de modular a ativação de macrófagos infectados pelo *M. bovis*-BCG.

Inicialmente, avaliamos a produção de NO que é significativamente aumentada após a infecção dos macrófagos pelo *M. bovis*-BCG. E pode ser considerado um marcador da resposta imune frente a infecção por micobactérias. O tratamento com o TAA, nas concentrações testadas foi capaz de inibir significativamente a liberação de nitrito nos tempos avaliados. Resultados similares aos observados no tratamento com a rifampicina (12 μ M), como observado na **Figura 5.3**. Todos os grupos com exceção ao grupo Meio, foram infectados com *M. bovis*-BCG

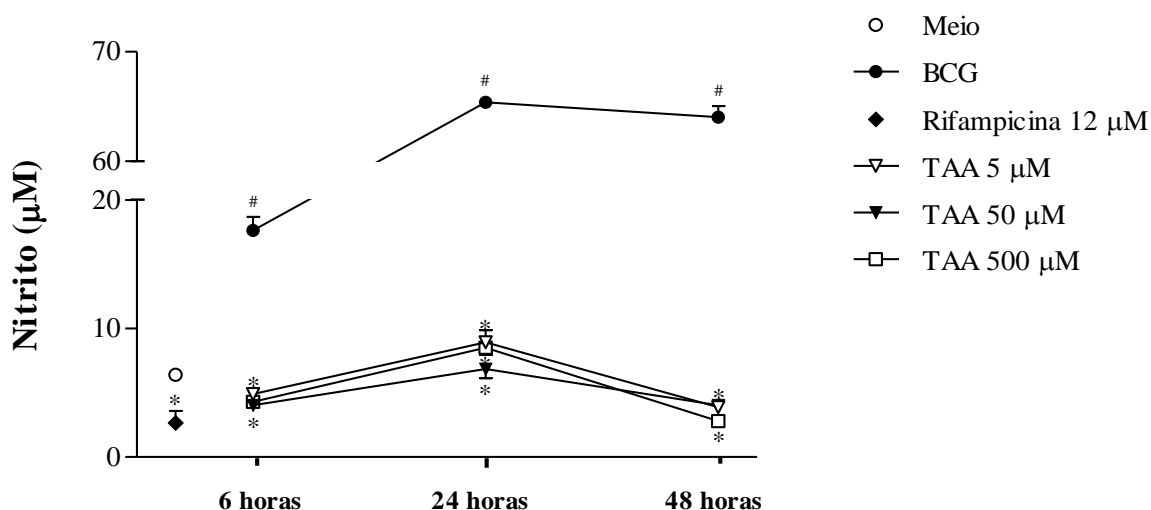


Figura 5.3.: Cinética de liberação de nitrito, verificada pelo método de Griess, no sobrenadante de macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG (10^5 bactérias/poço/100 μ L), tratados com TAA (500-5 μ M). A rifampicina (12 μ M) foi utilizada como droga de referência. Tanto a suspensão bacteriana, quanto a solução de TAA e de rifampicina foram preparadas em meio condicionado. Os dados são apresentados como média \pm EPM da triplicata por grupo e representativo de 3 experimentos. # $p < 0,01$ por comparação ao meio; * $p < 0,01$ em comparação à infecção por *M. bovis*-BCG. Todos os grupos com exceção ao grupo Meio, foram infectados com *M. bovis*-BCG

Após avaliação da ação do TAA sobre a liberação de nitrito pudemos concluir que o TAA modula a resposta imune decorrente da infecção em todas as doses e tempos avaliados.

Na continuação de nosso trabalho utilizamos a menor dose, 5 μ M, no tempo de pico de liberação de nitrito, 24 h.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por macrófagos ativados, causando uma intensa resposta inflamatória, importante para a contenção da infecção. Sua presença leva a indução da liberação de outras citocinas, como IL-12 e IL-6. Em resposta à infecção por micobactérias e/ou TNF- α macrófagos liberam IL-6 que atua tanto na imunidade natural, estimulando a produção de neutrófilos na medula, quanto na imunidade adquirida, levando a maturação de linfócitos B. Avaliamos ainda a IL-12 já que quando liberada por macrófagos ativados atua na diferenciação e expansão da população de linfócitos Th1, induzindo a liberação de IFN- γ por essas células que dentre inúmeras funções atua na ativação de macrófagos. Observamos que macrófagos infectados com o *M. bovis*-BCG, como era esperado, tiveram um aumento na liberação de TNF- α , IL-12 e IL-6. Onde o TAA (5 μ M) é capaz de inibir a liberação de TNF- α , IL-6 e IL-12. Como demonstrado na **Figura 5.4**.

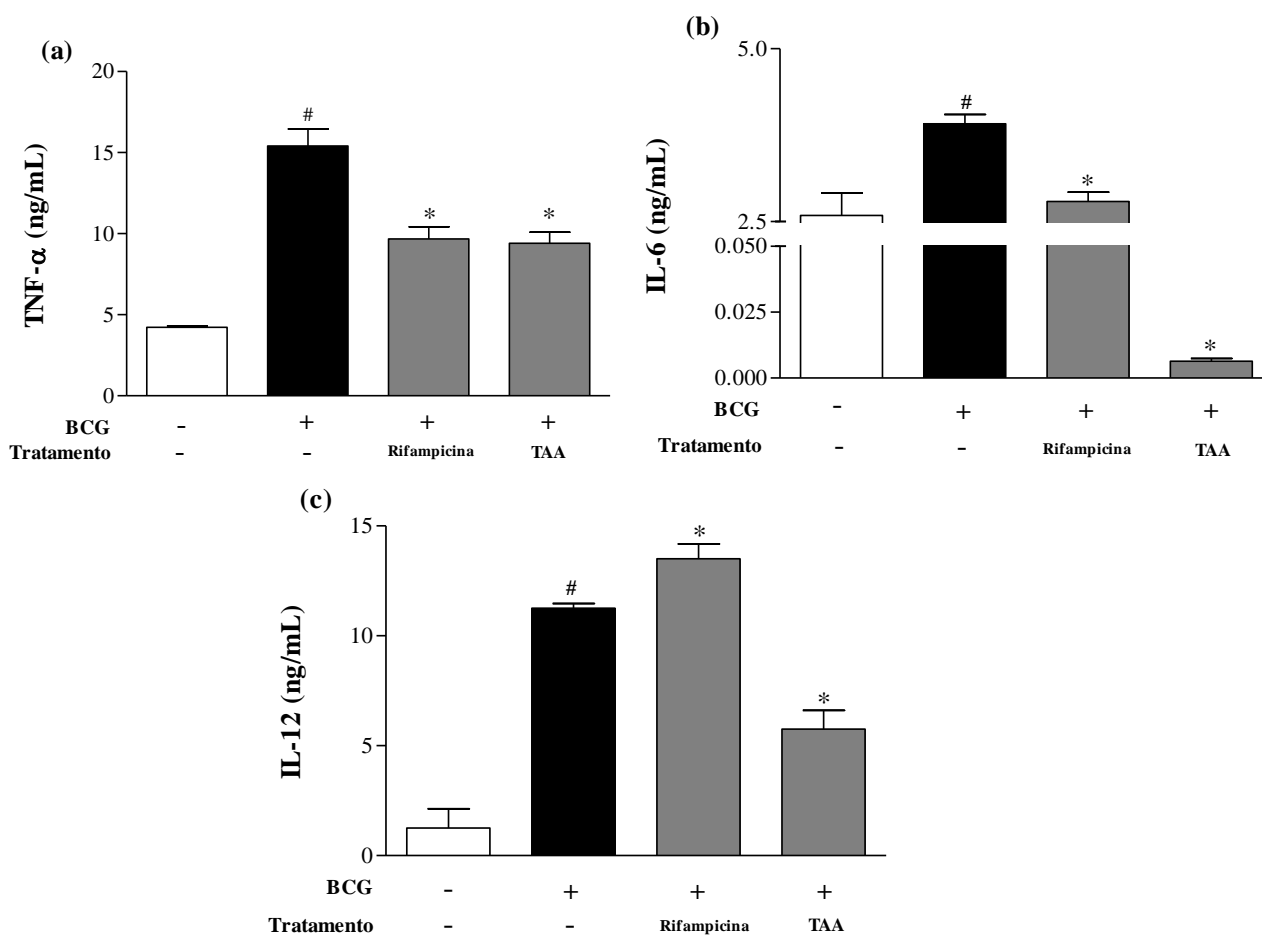


Figura 5.4.: Efeito do tratamento do TAA (5 μ M) na quantificação de citocinas (a) TNF- α ; (b) IL-6; (c) IL-12, no sobrenadante de macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG (10^5 bactérias/poço/100 μ L- MOI: 1:1- 6 h de infecção). A rifampicina (12 μ M) foi usada como controle de droga anti-TB. Ambos os tratamentos foram realizados após a infecção. As citocinas foram dosadas pelo método de ELISA. O sobrenadante foi recolhido após 24 h de tratamento. Os dados são apresentados como média \pm EPM da triplicata por grupo e representativo de 3 experimentos. # p<0,01 por comparação ao meio; * p<0,01 em comparação à infecção por *M. bovis*-BCG.

Além dos mediadores pró-inflamatórios envolvidos na contenção da infecção por micobactérias observa-se a presença de mediadores de caráter anti-inflamatório. Esses últimos tem como responsabilidade a resolução da inflamação após a contenção da infecção. Neste trabalho realizamos a avaliação de dois desses mediadores a IL-10 e a PGE2.

A IL-10 é uma citocina multifuncional com efeitos diversos sobre a maioria dos tipos celulares hematopoiéticos. Esta citocina é reconhecida, principalmente, pela sua capacidade de limitar e, finalmente, encerrar as respostas inflamatórias. A PGE2 é um derivado eicosanoide sintetizado a partir do AA sua produção pode ocorrer no interior de CL ou a partir da ruptura de membranas celulares. A IL-10 e a PGE2 estão intimamente interligadas, sabe-se que o aumento de PGE2 leva à indução da liberação de IL-10, entretanto o aumento de IL-10 leva à inibição de PGE2. Observamos que macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG apresentam aumento na liberação de IL-10 e que o tratamento com TAA leva a indução da liberação desta citocina, como mostrado na **Figura 5.5. (a)**. Com o intuito de elucidar se a inibição de IL-10 se relacionava à modulação de PGE2 fomos avaliar qual seria o resultado do tratamento com o TAA na liberação de PGE2. Observamos que no grupo infectado e não tratado há aumento da produção de PGE2 e o tratamento com o TAA promove a inibição da mesma (**Figura 5.5. b**).

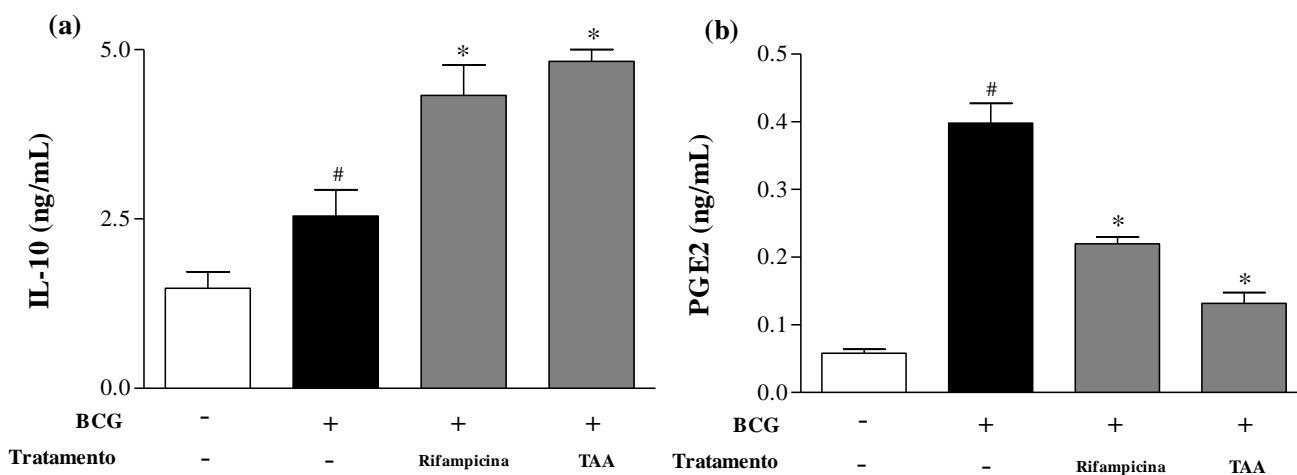
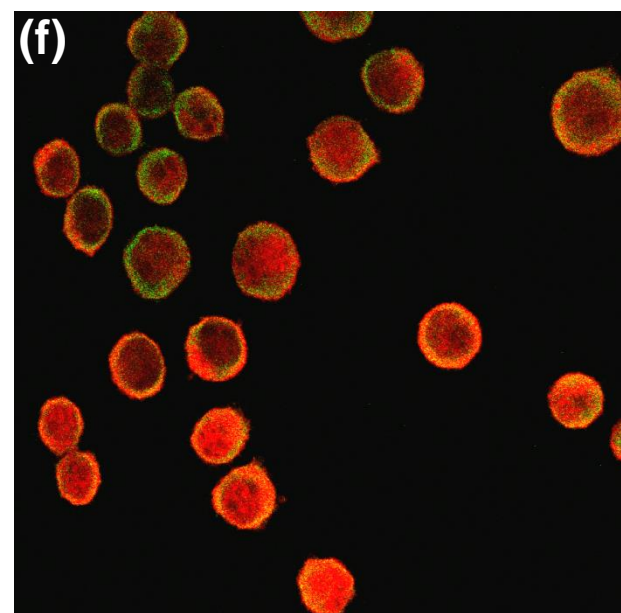
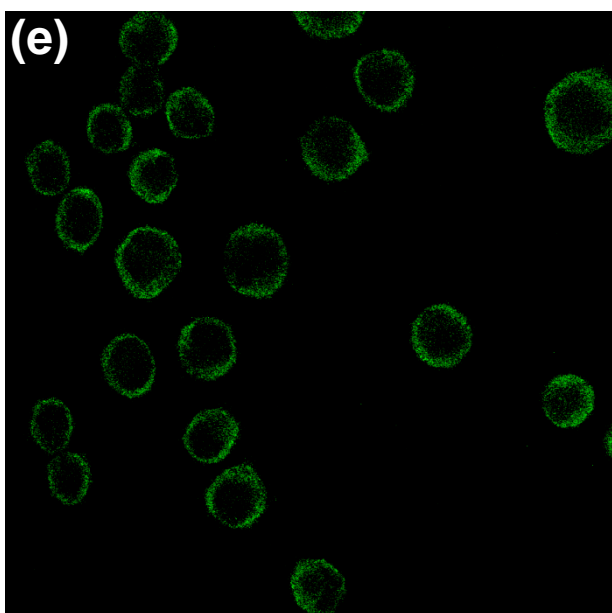
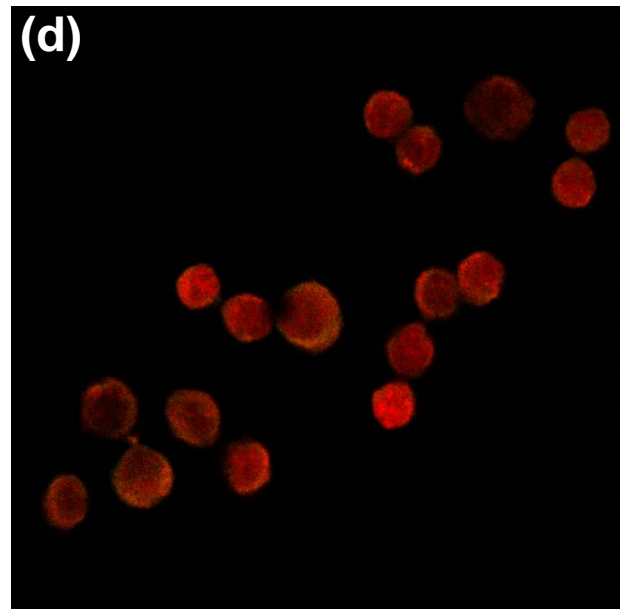
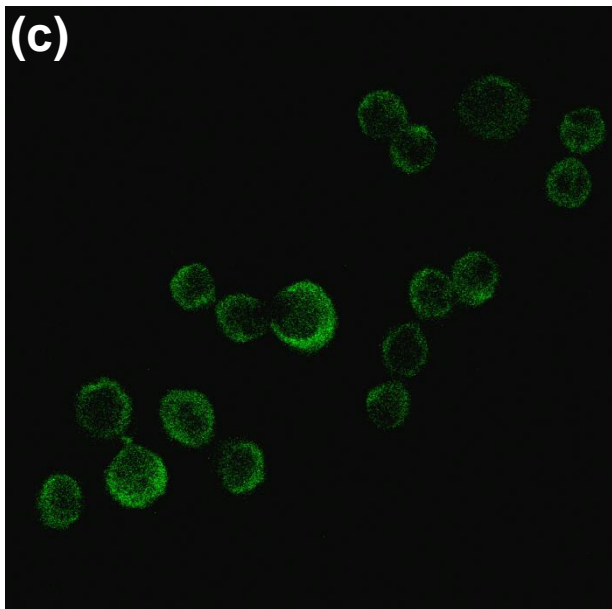
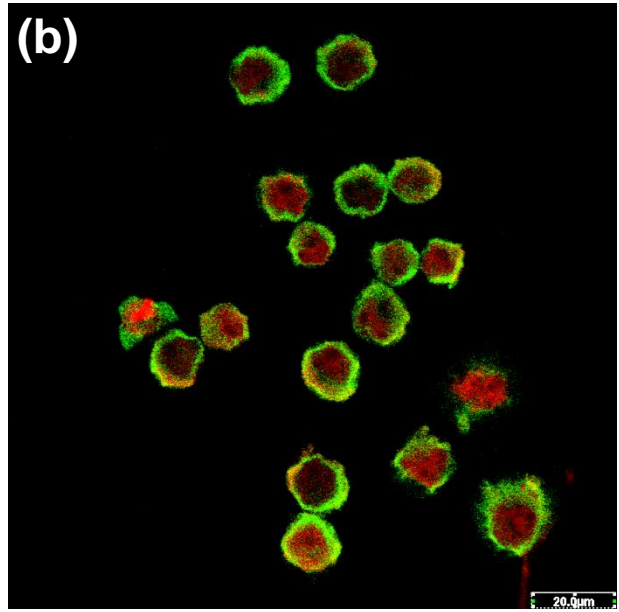
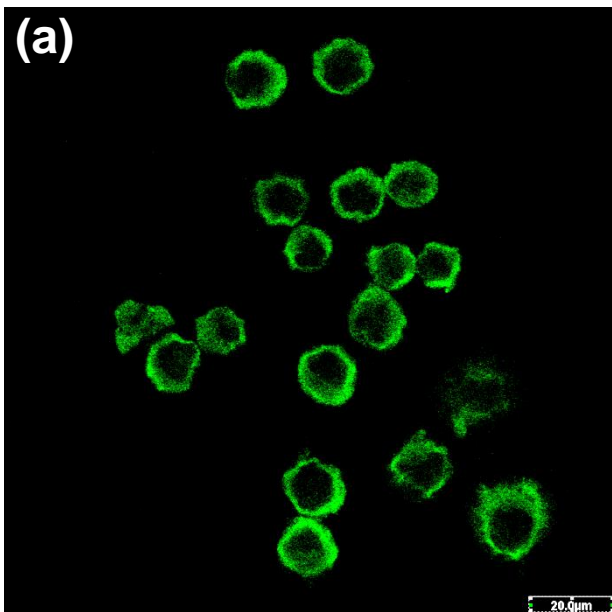


Figura 5.5.: Efeito do tratamento do TAA (5 μ M) na quantificação de mediadores (a) IL-10 dosada pelo método de ELISA; (b) PGE2 dosada pelo método de EIA, no sobrenadante de macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG (10^5 bactérias/poço/100 μ L- MOI: 1:1- 6 h de infecção). A rifampicina (12 μ M) foi usada como controle de droga anti-TB. Ambos os tratamentos foram realizados após a infecção. As citocinas foram dosadas pelo método de ELISA. O sobrenadante foi recolhido após 24 h de tratamento. Os dados são apresentados como média \pm EPM da triplicata por grupo e representativo de 3 experimentos. # $p < 0,01$ por comparação ao meio; * $p < 0,01$ em comparação à infecção por *M. bovis*-BCG.

5.5. Avaliação do tratamento com TAA sobre a translocação de NF- κ B para o núcleo de macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG

Como o tratamento de macrófagos com TAA foi capaz de inibir a produção de importantes mediadores, fomos avaliar se esta inibição estaria relacionada com a translocação de NF- κ B para o núcleo dos macrófagos infectados. Avaliamos de forma qualitativa a translocação de NF- κ B para o núcleo, através de microscopia confocal. Observamos que a célula não infectada apresenta o NF- κ B em maior quantidade no citoplasma enquanto que após a infecção observa-se uma maior quantidade no núcleo e que o tratamento com o TAA é capaz de inibir esta translocação nuclear (**Figura 5.6. a-c**). Utilizando o “software” ImageJ foi realizada a quantificação de emissão de fluorescência e pudemos obter o índice de translocação do fator nuclear, observamos que após o estímulo com o *M. bovis*-BCG há um aumento de 2x na translocação do NF- κ B para o núcleo e após o tratamento com o TAA esse translocação é diminuída a metade, igualando-se ao índice da célula não estimulada.



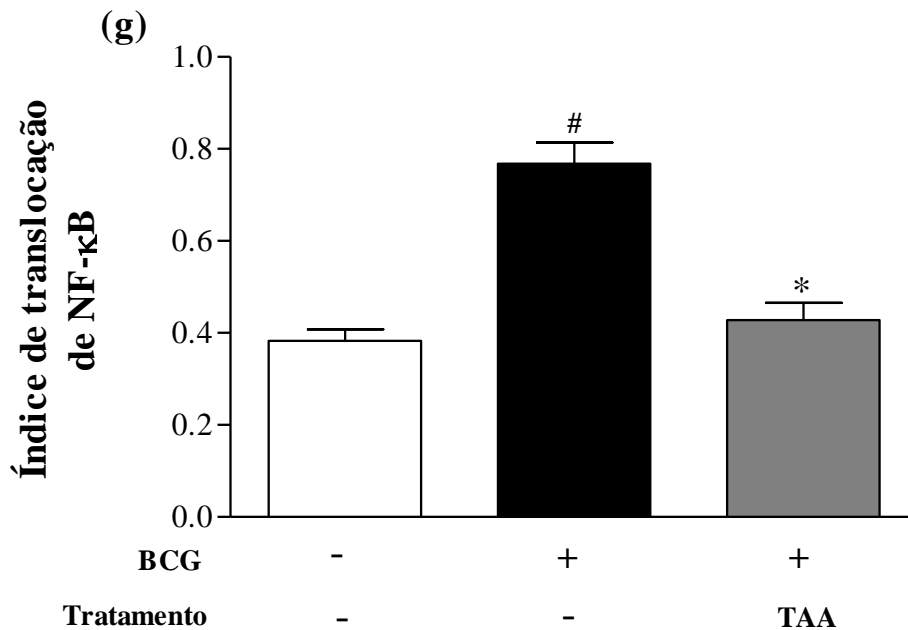


Figura 5.6: Microscopia confocal de macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG (10^5 bactérias/lamínula/100 μL). A marcação foi feita com anticorpo conjugado a FITC (verde) α -NF- κ B e contracoloração da célula com azul de Evans (vermelho). **(a)** não infectados e não tratados-marcados com anticorpo α -NF- κ B; **(b)** não infectados e não tratados-merge da contracoloração com azul de Evans; **(c)** não tratados e infectados-marcados com anticorpo α -NF- κ B; **(d)** não tratados e infectados-merge da contracoloração com azul de Evans; **(e)** tratados com TAA (5,0 μM) e infectados-marcados com anticorpo α -NF- κ B; **(f)** tratados com TAA (5,0 μM) e infectados-merge da contracoloração com azul de Evans; **(g)** o gráfico representa a quantificação do índice de translocação de NF- κ B, onde as intensidades de fluorescência foram analisadas utilizando o “software” Image J. Os dados são apresentados como média \pm EPM da triplicata por grupo e representativo de 3 experimentos. # $p < 0,01$ por comparação ao meio; * $p < 0,01$ em comparação à infecção por *M. bovis*-BCG.

5.6. Efeito imunomodulador do tratamento com TAA na infecção pleural causada por *M. bovis*- BCG em camundongos

Os estudos *in vitro* e *in vivo* realizados até o momento confirmam a ação micobactericida do TAA. A avaliação da liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos infectados indicam, também, um efeito imunomodulador. Sendo assim, o próximo passo foi estudar a ação do TAA em modelo experimental de pleurisia induzida por *M. bovis*-BCG, permitindo a observação do efeito do TAA sobre outros tipos celulares, presentes na infecção.

Após a injeção i.t. de *M. bovis*-BCG ocorre um intenso acúmulo de leucócitos na cavidade torácica de camundongos C57BL/6, por comparação ao grupo salina (controle negativo). Os tratamentos, por v.o., realizados com rifampicina (25 mg/kg) ou dexametasona (10 mg/kg) diminuíram significativamente o influxo de leucócitos para a cavidade (24 h após a infecção). O tratamento dos animais com TAA (50 mg/kg), por v.o., não alterou de forma significativa o número de leucócitos totais no tempo avaliado como demonstrado na **Figura 5.7.a**. Foi observado o acúmulo significativo de neutrófilos na cavidade pleural (24 h após a infecção) em comparação ao grupo controle. Também foi observado que todos os tratamentos realizados, rifampicina (25 mg/kg) ou dexametasona (10 mg/kg) ou TAA (50 mg/kg) diminuíram significativamente o influxo dessas células para a cavidade, como mostrado na **Figura 5.7.b**. Além da migração de neutrófilos para a cavidade pleural, neste modelo de pleurisia, também foi observado o influxo de células mononucleares e eosinófilos (24 h após a infecção), em relação ao grupo controle. Tanto células mononucleares quanto eosinófilos tiveram seu acúmulo inibido após tratamento com rifampicina (25 mg/kg) ou dexametasona (10 mg/kg), o tratamento com TAA não foi capaz de alterar o influxo celular de células mononucleares ou eosinófilos para a pleura (**Figura 5.7.c,d**).

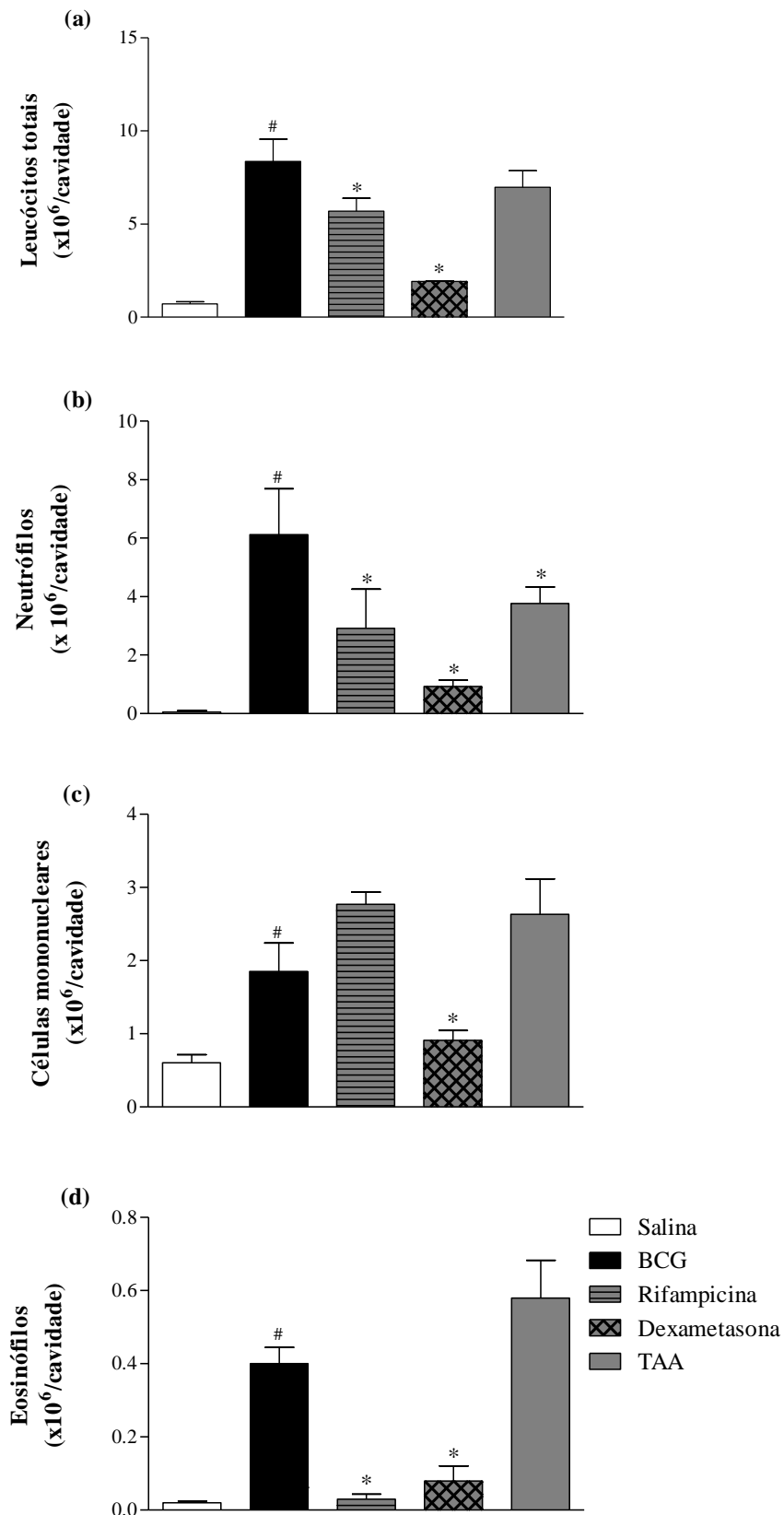


Figura 5.7.: Efeito do tratamento oral com rifampicina (25 mg/kg) ou dexametasona (10 mg/kg) ou TAA (50 mg/kg) sobre o influxo de (a) leucócitos totais; (b) neutrófilos; (c) células mononucleares e (d) eosinófilos para a cavidade pleural de camundongos, 24 h após a pleurisia induzida por *M. bovis*-BCG (4×10^5 /cavidade). Os dados são apresentados como média \pm EPM da triplicata por grupo e representativo de 3 experimentos. # $p < 0,05$ por comparação ao grupo salina; * $p < 0,05$ em comparação à infecção por *M. bovis*-BCG.

O TAA foi capaz de inibir o influxo de neutrófilos para a cavidade pleural. Sabe-se que este tipo celular está envolvido na produção de diversos mediadores inflamatórios. Fomos, portanto, investigar a modulação deste tratamento no processo inflamatório do hospedeiro, através da dosagem de mediadores.

O NO é um importante mediador na defesa contra a infecção por micobactérias somado a isso estudos em animais experimentais e em pacientes demonstram a participação de diversas citocinas na resposta do hospedeiro contra micobactérias. Foi observado que há um aumento na quantidade de NO no tempo de 24 h após o estímulo com o *M. bovis*-BCG, o tratamento dos animais com TAA (50 mg/kg), levou a um aumento significativo nos níveis de NO, como demonstrado na **Figura 5.8.a**.

Sabe-se que IL-12 e IFN- γ participam da contenção da infecção causada por micobactérias, juntamente com NO. Ao avaliarmos a liberação de IL-12 foi observado um aumento significativo dos níveis de IL-12 no lavado pleural proveniente de animais infectados. O tratamento com TAA (50 mg/kg) foi capaz de inibir a liberação da IL-12 após 24 h de infecção, assim como a dexametasona, efeito exatamente oposto ao da rifampicina (25 mg/kg) (**Figura 5.8.b**). O IFN- γ tem papel importante na resolução da infecção por micobactérias, atua em conjunto com outras citocinas e é capaz de induzir a liberação de NO por macrófagos. Um aumento significativo dos níveis de IFN- γ , foi observado no lavado pleural proveniente de animais infectados com *M. bovis*-BCG. Como esperado o tratamento com TAA (50 mg/kg) assim como o tratamento com dexametasona (10 mg/kg) foram capazes de inibir a liberação de IFN- γ , como demonstrado no **Figura 5.8.c**.

A IL-6 é sintetizada por fagócitos, células endoteliais e fibroblastos, em respostas a microorganismos e a outras citocinas como TNF- α e IL-1 β . Foi observado um aumento na liberação de IL-6 após 24 h da infecção por *M. bovis*-BCG. Observamos que o tratamento com o TAA (50 mg/kg) assim como com a dexametasona (10 mg/kg) promoveu uma indução na liberação de IL-6 (**Figura 5.8.d**). No intuito de avaliar se a ação do TAA era direta ou indireta sobre a IL-6 foi quantificada a liberação de IL-1 β no lavado pleural. Observamos um aumento na liberação de IL-1 β no lavado pleural, após a infecção e o tratamento com a rifampicina (25 mg/kg) ou com a dexametasona (10 mg/kg) induziram um aumento na liberação IL-1 β . Enquanto que o tratamento com TAA (50 mg/kg) inibiu sua liberação, indicando que a ação do TAA sobre a produção de IL-6 é independente da modulação de IL-1 β (**Figura 5.8.e**), distinto da rifampicina.

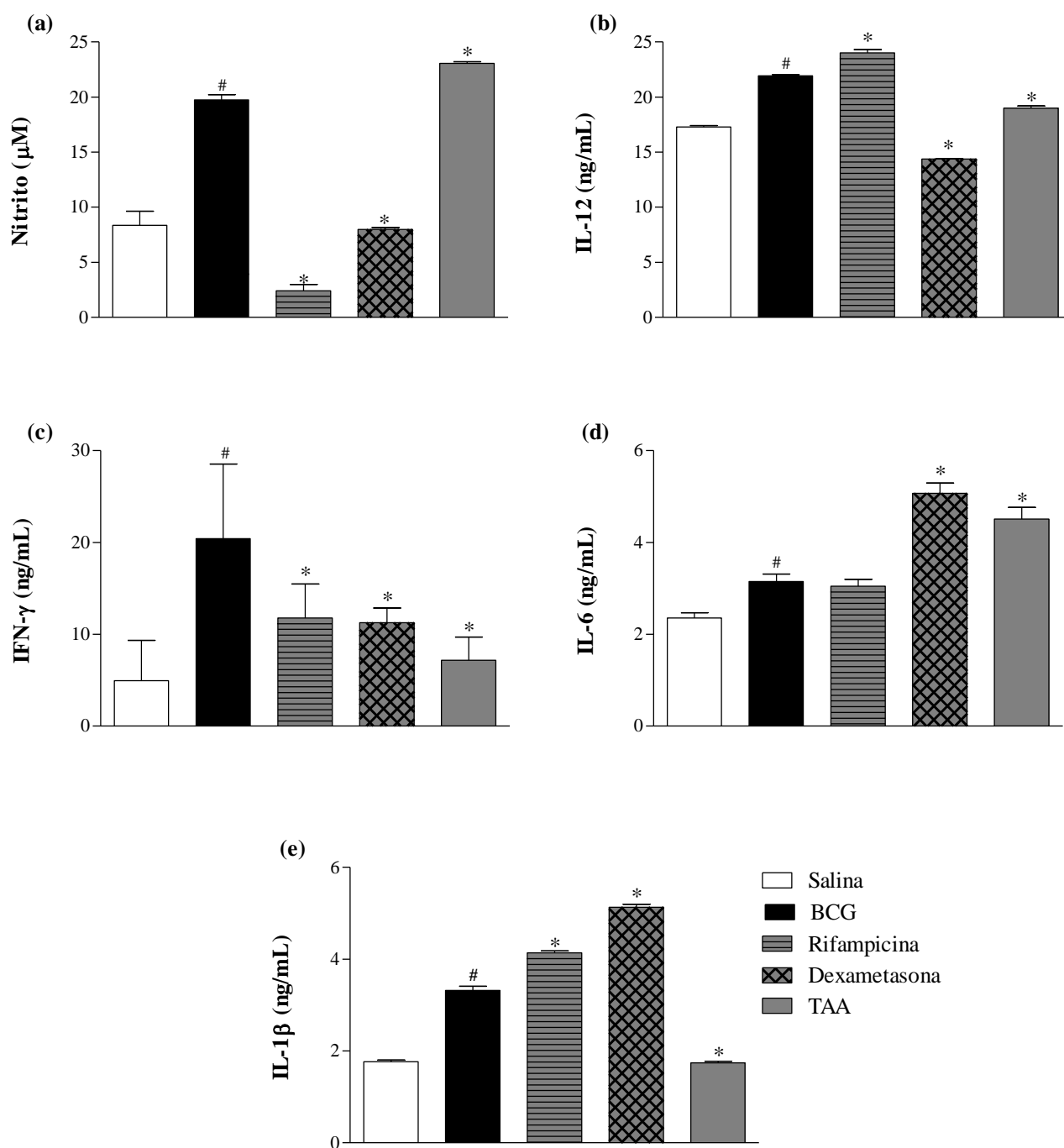


Figura 5.8.: Efeito do tratamento do TAA na quantificação de mediadores (a) nitrito; (b) IL- 12; (c) INF- γ ; (d) IL- 6; (e) IL- 1 β , no lavado pleural de camundongos infectados. As citocinas foram dosadas pelo método de ELISA, e o nitrito pelo método de Griess. O lavado pleural foi recolhido após 24 h da infecção. Os camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com TAA (50 mg/kg, v.o.), rifampicina (25 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (10 mg/kg, v.o.) 30 min antes da infecção com *M. bovis*-BCG (4×10^5 UFC/cavidade, i.t.). Os dados são apresentados como média \pm EPM da triplicata por grupo e representativo de 3 experimentos. # $p < 0,05$ por comparação ao grupo salina; * $p < 0,05$ em comparação à infecção por *M. bovis*-BCG.

5.7. Avaliação do tratamento com TAA sobre a liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos estimulados por antígenos bacterianos

Foi observado que o TAA é capaz de gerar uma modulação sobre macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Com o intuito de avaliar se a ação imunomoduladora do TAA estava relacionada com a viabilidade bacteriana ou não, investigamos a ação do TAA sobre macrófagos estimulados com *M. bovis*-BCG γ -irradiado. O *M. bovis*-BCG foi irradiado com o objetivo de promover a morte do bacilo com mínimo de destruição da estrutura celular bacteriana (Zack et al. 1974, Ramachandra et al. 2005). Avaliamos ainda se o TAA modularia a liberação de TNF- α após estímulo com LPS. Utilizamos a estimulação com LPS como controle de especificidade, visto que este é uma endotoxina presente em bactérias Gram negativas, consequentemente, ausente em micobactérias (Alexander and Rietschel 2001). O *M. bovis*-BCG irradiado foi capaz de induzir a produção de TNF- α , IL-6, IL-10 e PGE2. Entretanto é interessante notar que na estimulação com a micobactéria irradiada as quantidades liberadas de TNF- α , IL-6 e PGE2 são muito maiores do que quando a estimulação foi realizada com a micobactéria viva, fato oposto à liberação de IL-10. O fato pode estar associado a mecanismos de escapes que não são ativados quando utilizamos a micobactéria irradiada. O tratamento com o TAA é capaz de inibir a liberação de TNF- α , IL-6, IL-10 e PGE2. Como demonstrado na **Figura 5.9**. Entretanto, macrófagos estimulados com LPS e tratados com TAA não tem a liberação de TNF- α alterada (**Figura 5.9., detalhe**)

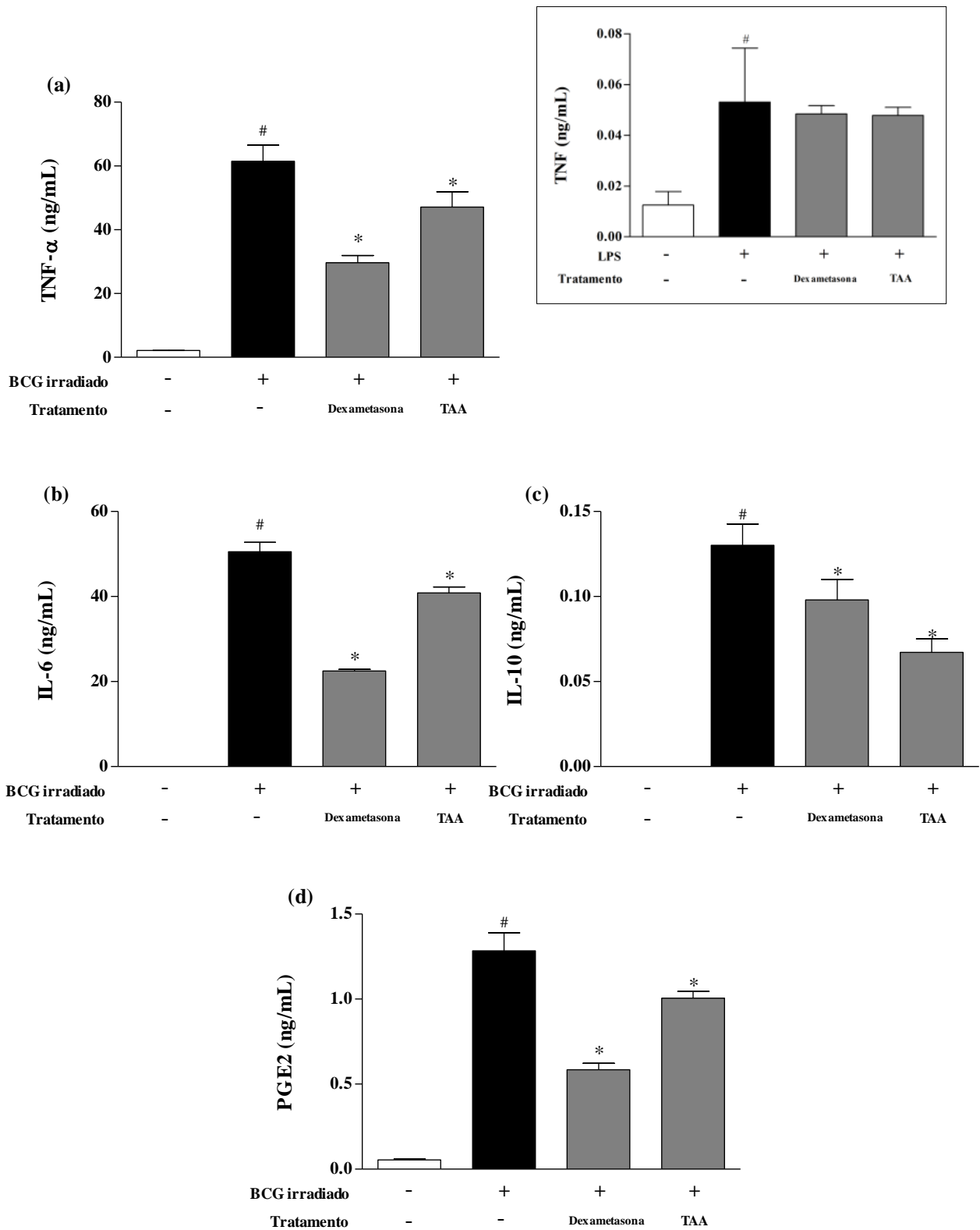
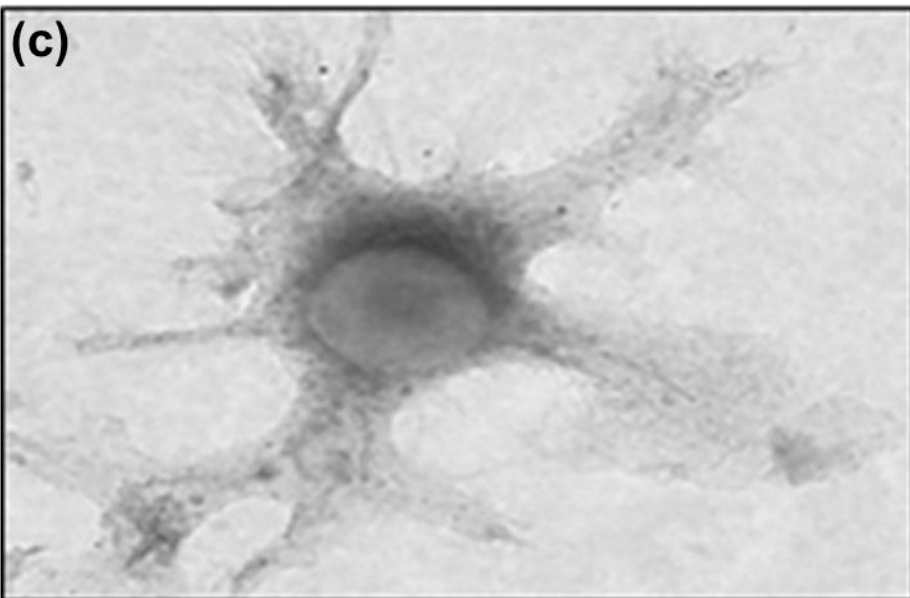
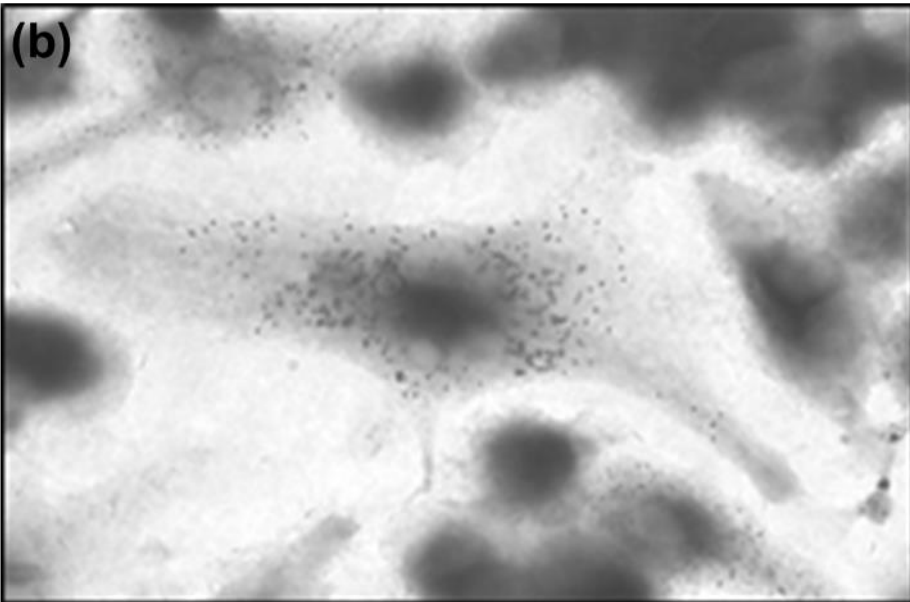
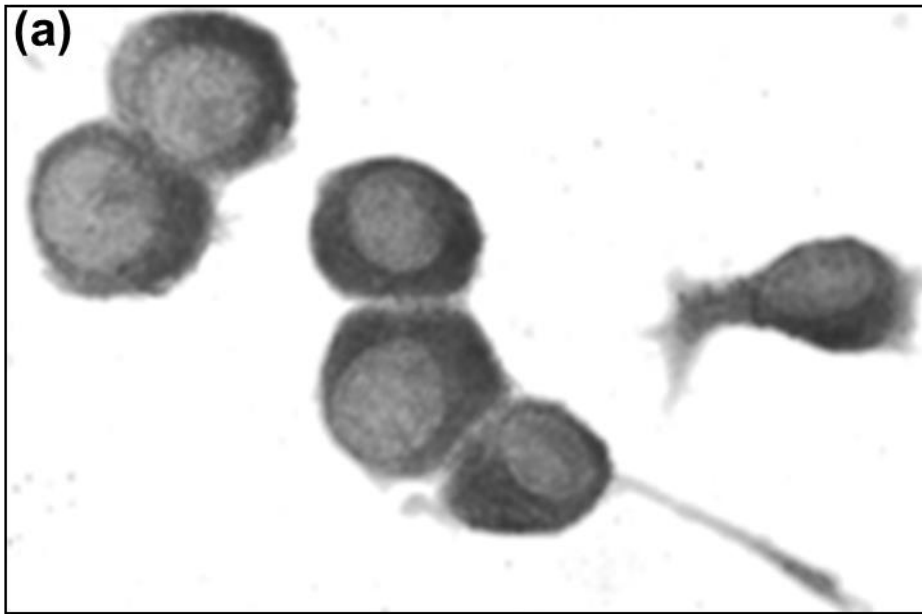


Figura 5.9.: Efeito do tratamento do TAA (5 μ M) na quantificação de mediadores (a) TNF- α ; (b) IL-6; (c) IL-10; (d) PGE2, estimulados com *M. bovis*-BCG γ -irradiado (10^5 bactérias/poço/100 μ L- MOI: 1:1- 6 h de estimulação). A dexametasona (1,28 μ M) foi usada como controle de droga anti-inflamatória. Ambos os tratamentos foram realizados após a estimulação. O detalhe representa a dosagem de TNF- α após estimulação com LPS, foi utilizado como controle de especificidade da estimulação. As citocinas foram dosadas pelo método de ELISA e a PGE2 por EIA. O sobrenadante foi recolhido após 24 h de tratamento. Os dados são apresentados como média \pm EPM da triplicata por grupo e representativo de 3 experimentos. # $p < 0,05$ por comparação ao meio; * $p < 0,05$ em comparação à estimulação com *M. bovis*-BCG γ -irradiado.

5.8. Avaliação do tratamento com o TAA sobre a formação de CL em macrófagos

A infecção por micobactérias leva a indução e ao aumento no número de CL na célula hospedeira a fim de permitir a sua sobrevivência e replicação, sendo assim um alvo atraente para a modulação de processos patogênicos da célula hospedeira (van der Meer-Janssen et al. 2010). A presença de CL nos macrófagos ativados está associada à liberação de citocinas como IL-10 e TNF- α e ainda a PGE2. O TAA é capaz de inibir tanto a liberação de TNF- α e PGE2, e aumentar os níveis de IL-10. Portanto nosso próximo passo foi avaliar qual seria a ação do TAA na formação de CL no macrófago hospedeiro. Observamos que a infecção de macrófagos por *M. bovis*-BCG induz a formação de CL que é reduzida pelo tratamento com o AAS (5,0 μ M) e a rifampicina (12 μ M). Entretanto, inesperadamente, o TAA (5,0 μ M), induz o aumento na formação desta organela, como representado na **Figura 5.10**.



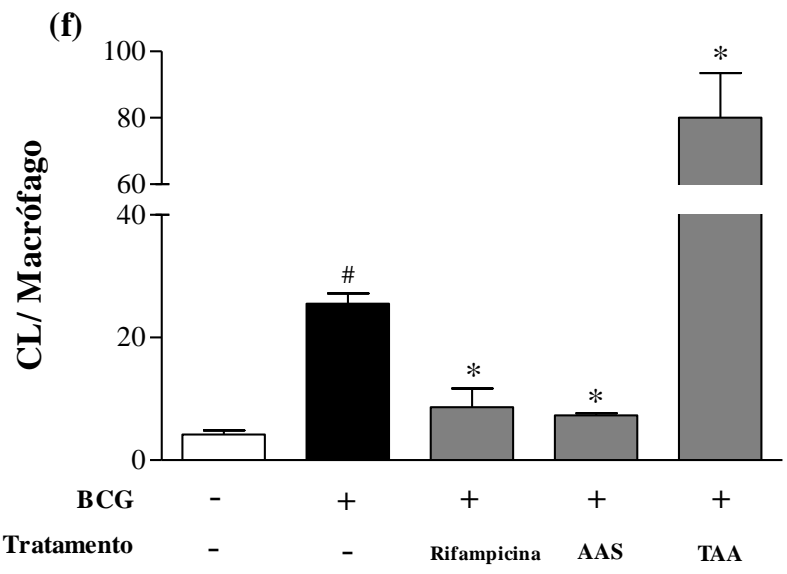
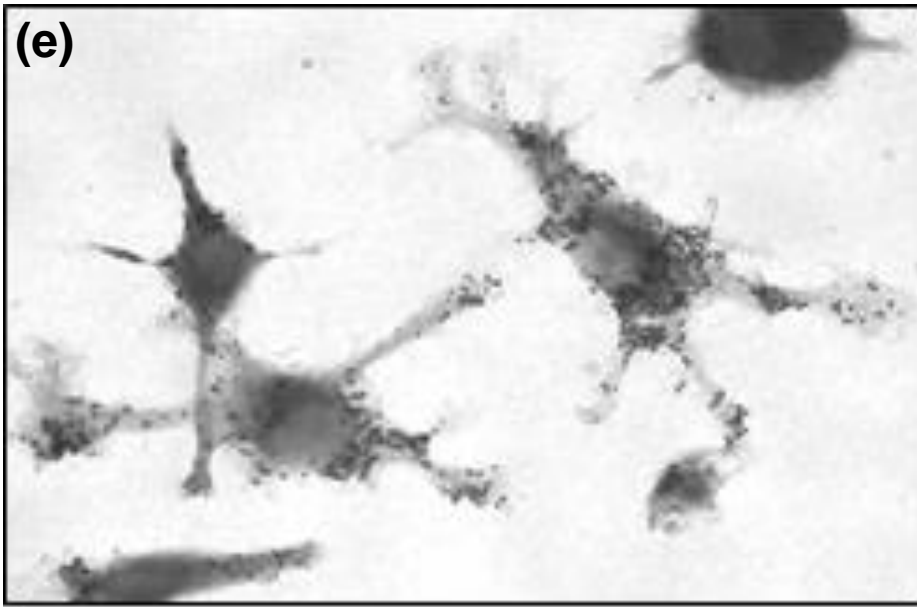
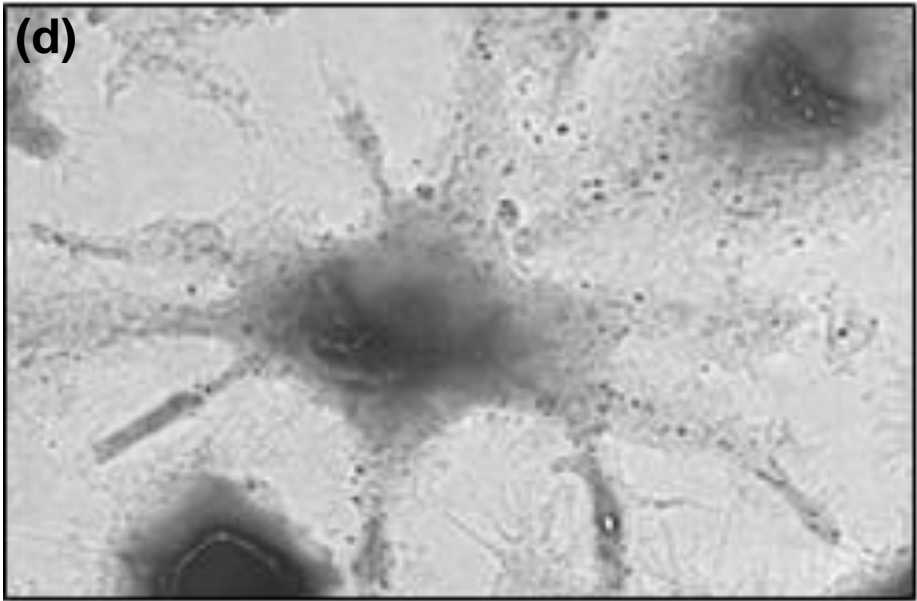
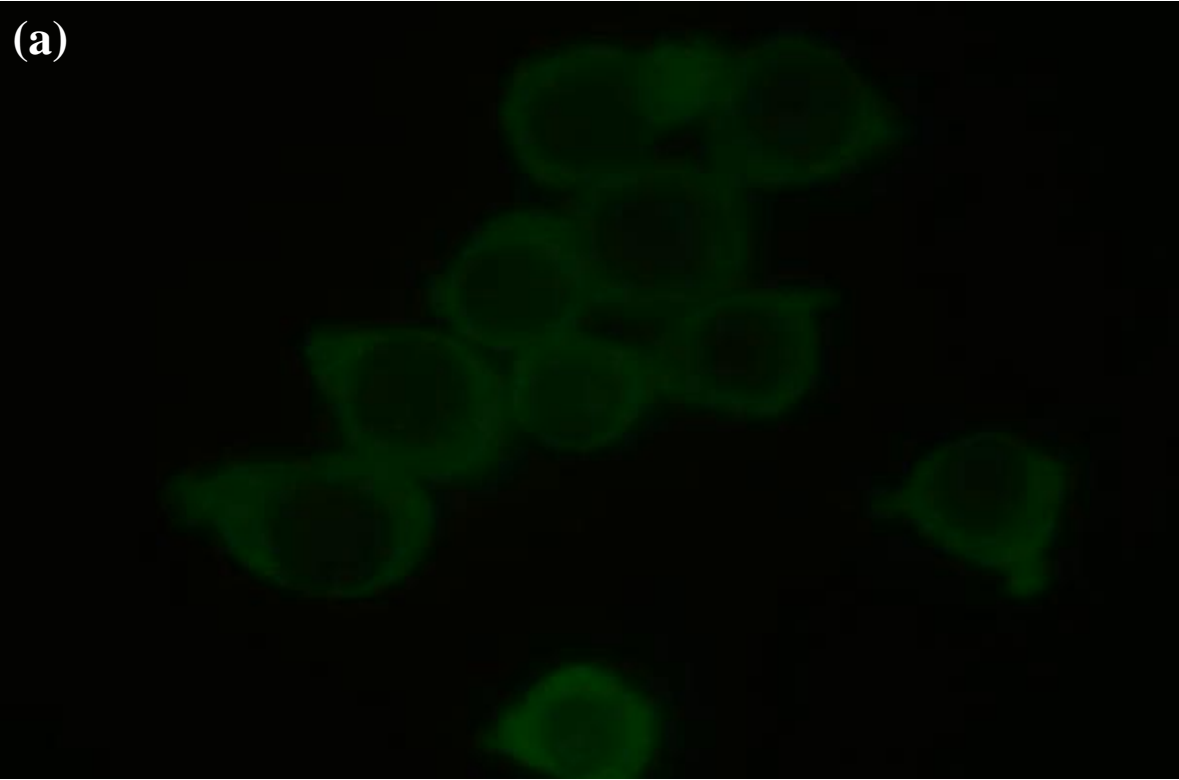


Figura 5.10.: Quantificação de CL no interior de macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG (10^5 bactérias/lamínula/100 μ L- MOI: 1:1- 6 h de infecção). **(a)** não infectados e não tratados; **(b)** não tratados e infectados; **(c)** infectados e tratados com AAS (5 μ M)- utilizado como droga de referência na inibição de CL; **(d)** infectados e tratados com rifampicina (12 μ M)- utilizada como controle de droga anti-TB; **(e)** infectados e tratados com TAA (5 μ M); **(f)** o gráfico representa a média do número de CL por macrófagos. Todos os tratamentos foram realizados após a estimulação. A coloração, com tetróxido de ósmio, foi realizada após 24 h de tratamento. Os dados são apresentados como média \pm EPM da triplicata por grupo e representativo de 3 experimentos. # $p < 0,001$ por comparação ao meio; * $p < 0,001$ em comparação à infecção por *M. bovis*-BCG.

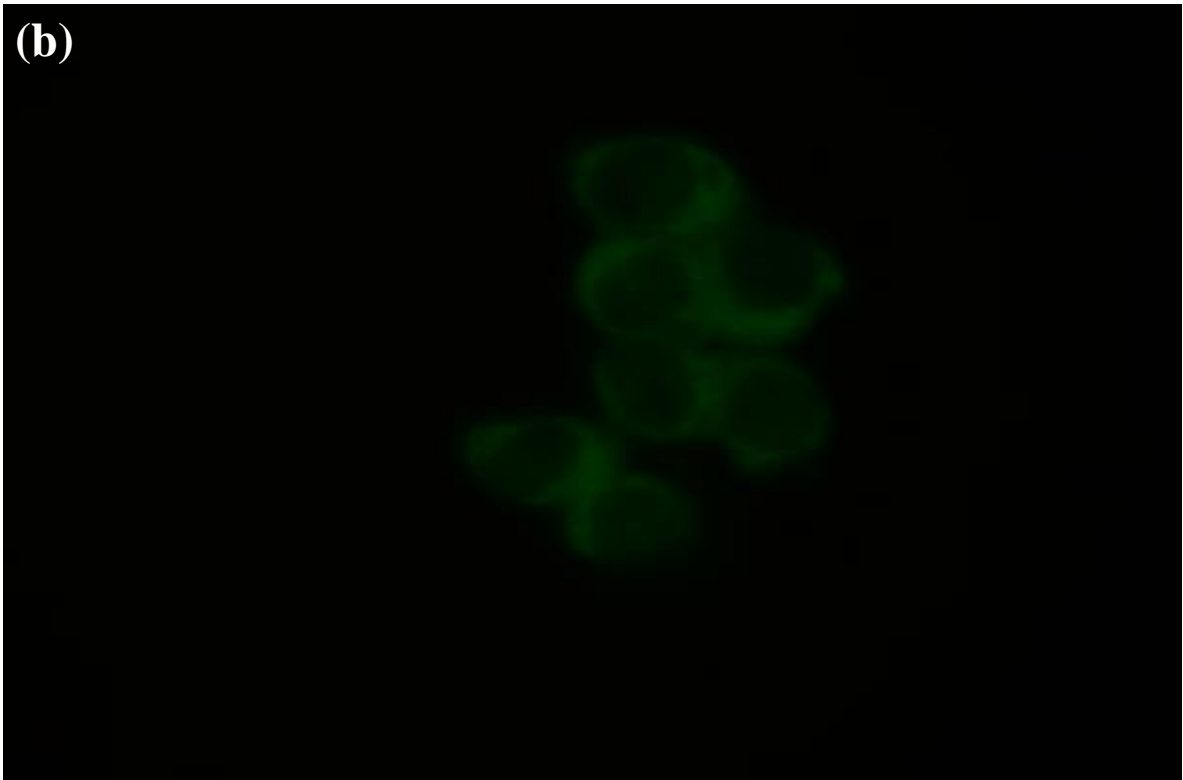
5.9. Avaliação do tratamento com TAA sobre a formação de CL em macrófagos estimulados *M. bovis*-BCG γ -irradiado.

Após a observação de que o *M. bovis*-BCG vivo estimula o acúmulo de CL em macrófagos e que o tratamento com TAA potencializa este aumento, avaliamos se a micobactéria irradiada também seria capaz de promover este fenômeno. Observamos que em macrófagos estimulados com o *M. bovis*-BCG irradiado, o TAA promove uma redução de CL. Além disso, foi avaliado se o TAA teria ação sobre o acúmulo de CL independente da presença da micobactéria e observamos que em macrófagos não estimulados não há alteração na formação de CL após tratamento com o TAA, como mostra a **Figura 5.11**.

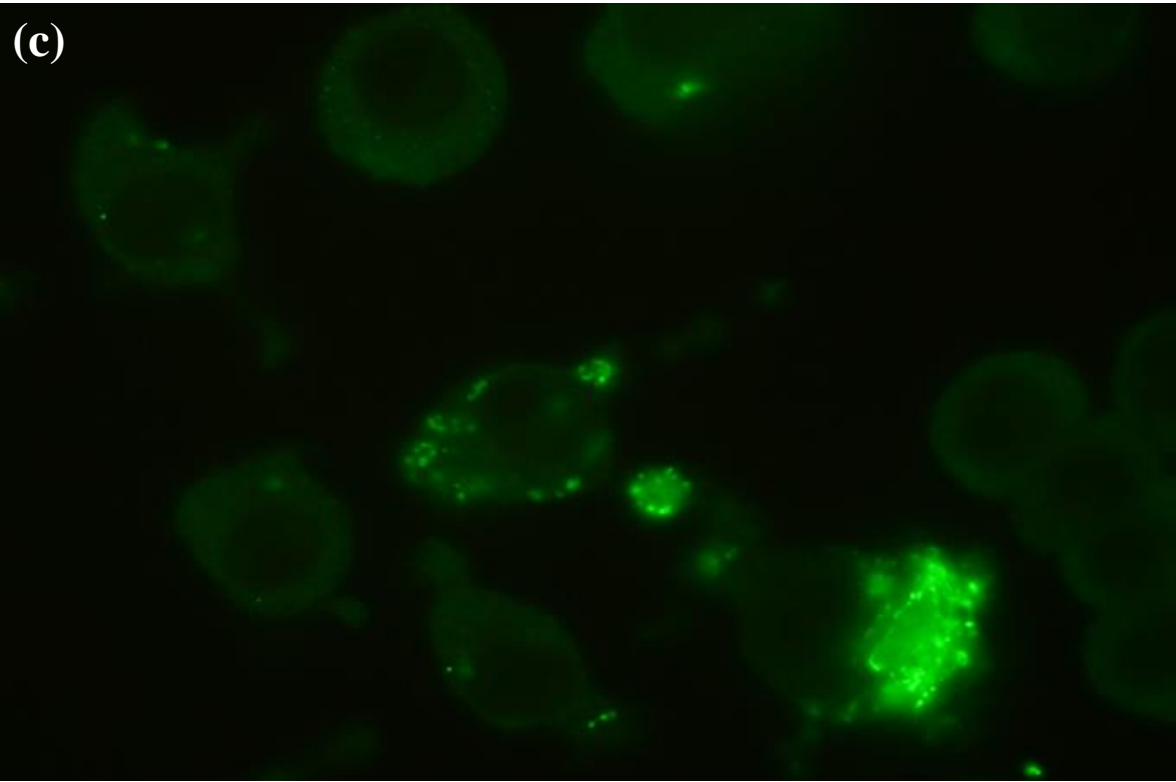
(a)



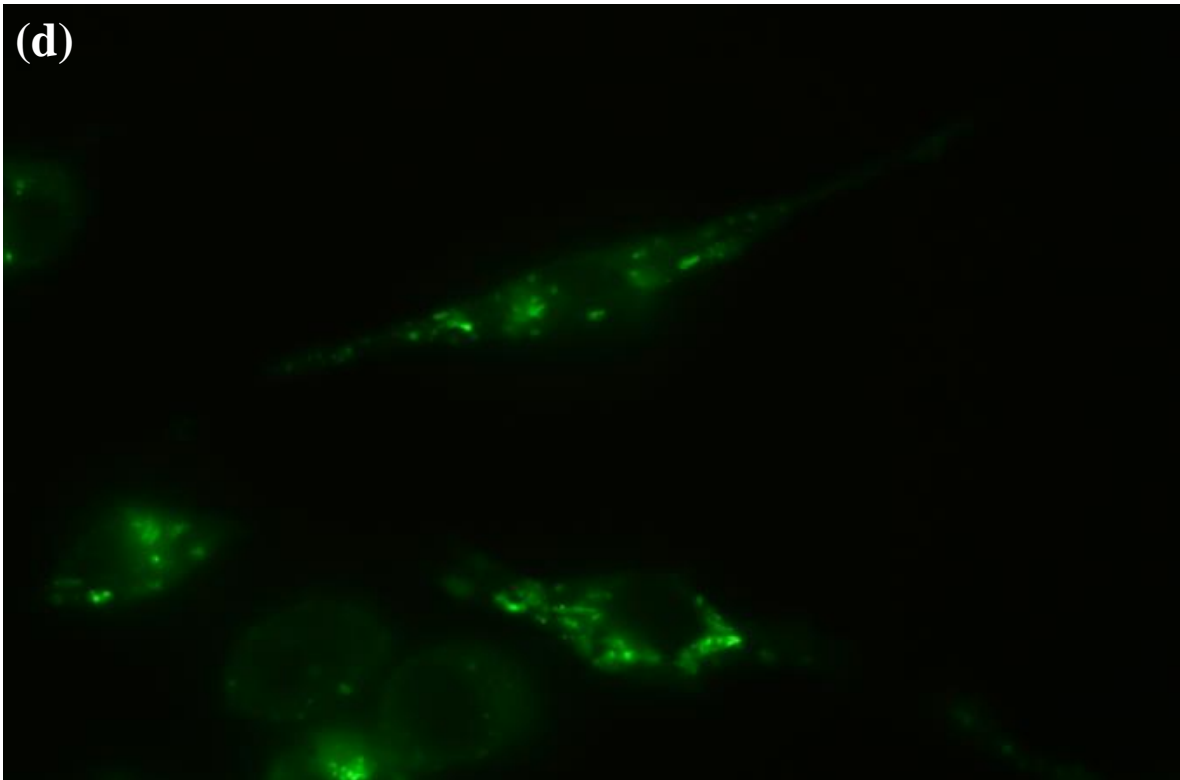
(b)



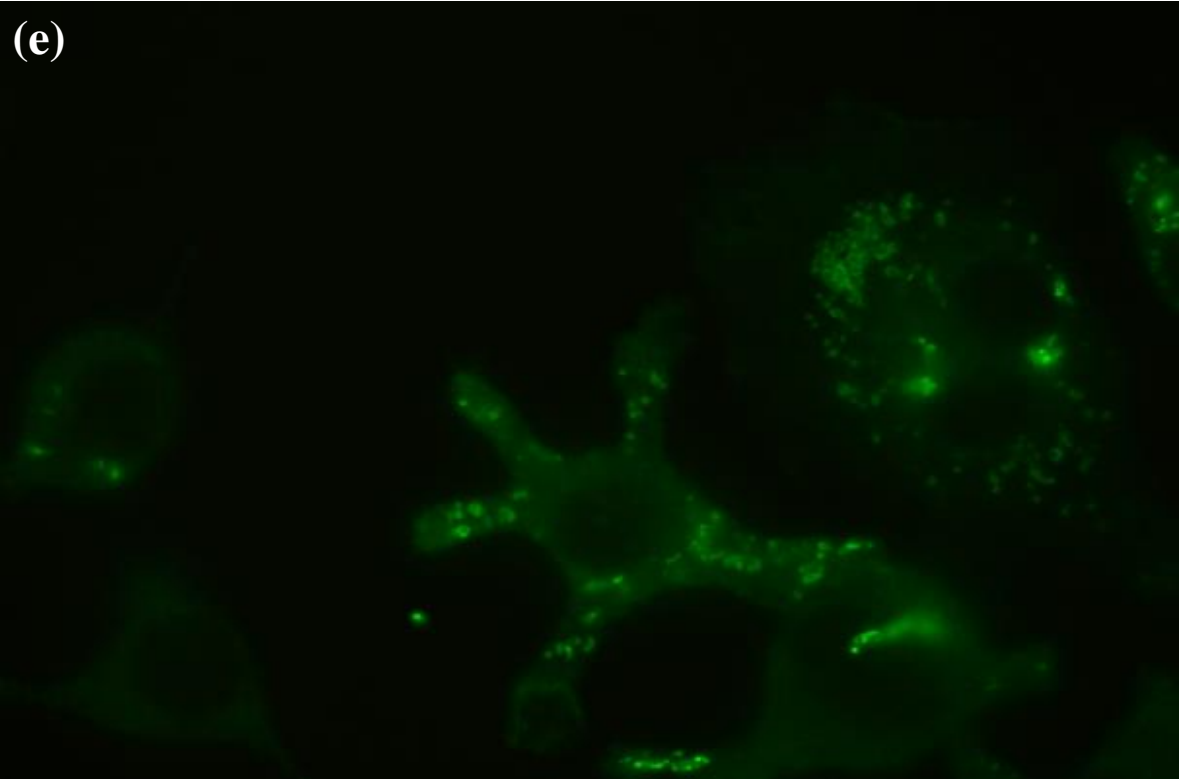
(c)



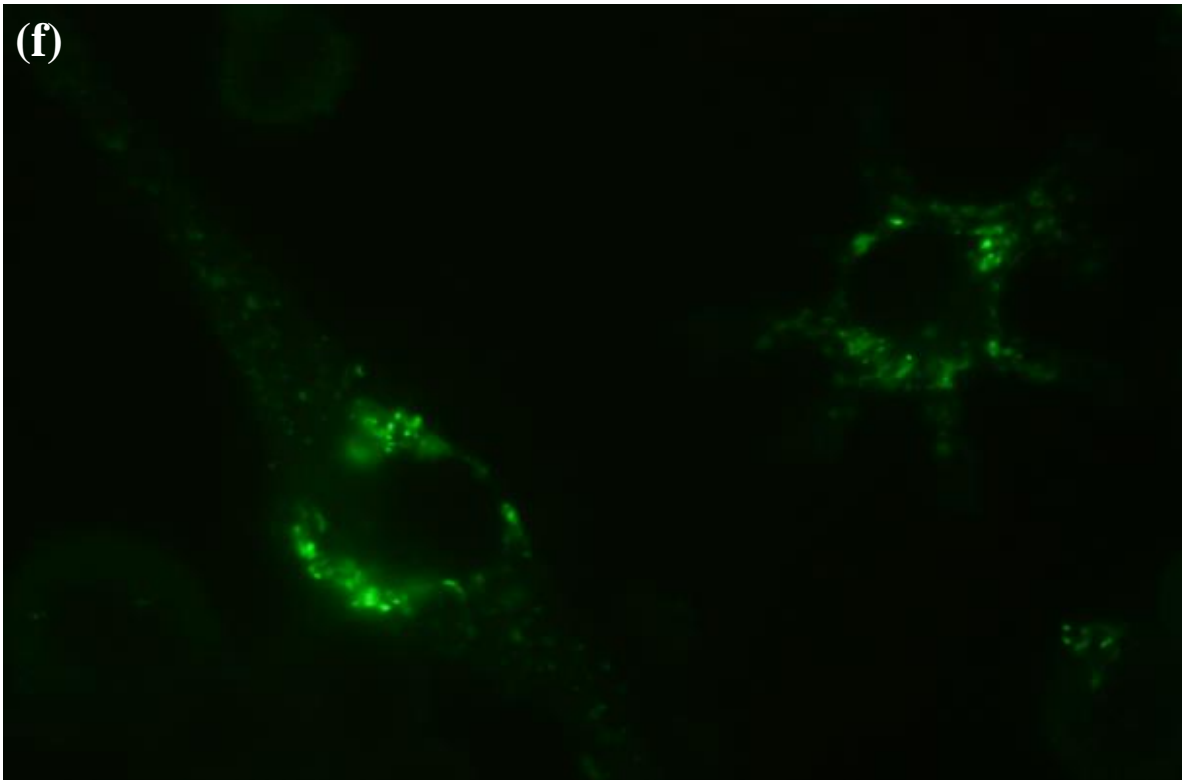
(d)



(e)



(f)



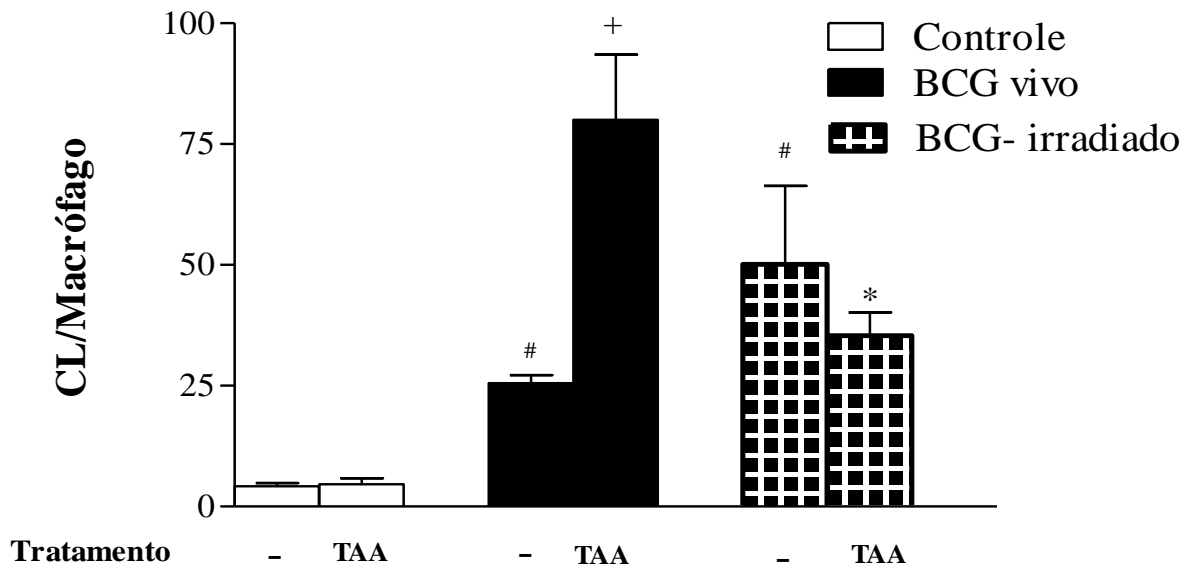


Figura 5.11.: Microscopia de fluorescência de macrófagos (a) não infectados e não tratados; (b) não infectados e tratados com TAA (5,0 μ M); (c) infectados com *M. bovis*-BCG vivo (10^5 bactérias/lamínula/100 μ L- MOI: 1:1- 6 h de infecção) e não tratados; (d) infectados com *M. bovis*-BCG vivo e tratados com TAA; (e) estimulados com *M. bovis*-BCG γ -irradiado (10^5 bactérias/poço/100 μ L- 6 h de estimulação) e não tratados; (f) estimulados com *M. bovis* -BCG γ -irradiado e tratados com TAA; (g) o gráfico representa a quantificação de CL após coloração com tetróxido de ósmio. A marcação foi feita com anticorpo conjugado a FITC (verde) α -ADRP. O tratamento foi realizado após a estimulação. Os dados são apresentados como média \pm EPM da triplicata por grupo e representativo de 3 experimentos. # $p < 0,05$ por comparação ao grupo não tratado e não estimulado; + $p < 0,05$ em comparação à infecção por *M. bovis*-BCG vivo, * $p < 0,05$ em comparação à estimulação com *M. bovis*-BCG γ -irradiado.

5.10. Avaliação da formação de CL e produção de PGE2 em macrófagos MyD88 nocautes infectados com *M. bovis*-BCG.

Após a interação da micobactéria com TLRs, mais especificamente com TLR2, TLR4 e TLR9, as vias de sinalização intracelular são ativadas como resposta à infecção. Muitas proteínas associadas estão envolvidas nesta cascata e são essenciais para a condução correta da sinalização celular, uma delas é o MyD88. O acúmulo de CL, dentre outros fatores, está associado a interação de TLR a antígenos bacterianos. Comumente CL e PGE2 possuem uma íntima relação, isto é, o aumento no acúmulo de CL leva a um aumento na liberação de PGE2. Entretanto, como demonstramos anteriormente, o TAA leva a um aumento de CL na célula infectada e uma diminuição de PGE2.

Avaliamos qual seria o efeito da infecção por *M. bovis*-BCG sobre macrófagos nocautes para a proteína associada MyD88. Podemos observar na **Figura 5.12.a** que em macrófagos MyD88 nocautes infectados não há formação de CL, havendo, entretanto aumento na liberação de PGE2 (**Figura 5.12.b**).

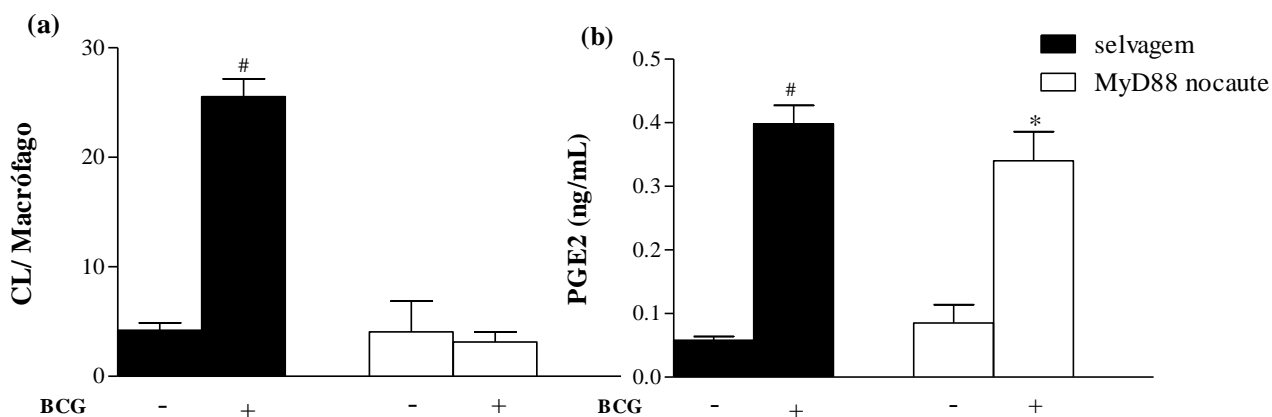


Figura 5.12.: Avaliação da infecção por *M. bovis*-BCG em macrófagos MyD88 nocautes. (a) CL em macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG (10^5 bactérias/lâminula/100 μ L- MOI: 1:1- 6 h de infecção) (b) PGE2, por EIA, no sobrenadante de macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG. A coloração, com tetróxido de ósmio, foi realizada após 24 h da infecção. Os dados são apresentados como média \pm EPM da triplicata por grupo e representativo de 3 experimentos. # $p < 0,01$ por comparação ao grupo não estimulado de macrófagos selvagens; * $p < 0,01$ em comparação ao grupo não estimulado de macrófagos MyD88 nocaute.

6. Resultados complementares

O presente trabalho foi realizado no Infectious Disease Research Institute (IDRI)-Seattle/EUA, sob supervisão e orientação da Dr^a. Tanya Parish, como parte do estágio de doutorando no exterior. A duração do estágio foi de 1 ano (no período de Fevereiro de 2013 à Janeiro de 2014), financiados pelo programa Ciências sem Fronteiras (CsF) do CNPq. Fizeram parte do estágio, além dos testes do TAA contra o *M. tuberculosis*, o treinamento, e consequente autorização, para trabalho em laboratório de nível de biossegurança 3 e o treinamento em HTS. O trabalho apresentado encontra-se em fase de manuscrito com breve submissão para a revista científica “Antimicrobial Agents and Chemotherapy” como um “short-form paper”.

Como descrito anteriormente CL são importantes organelas envolvidas na contenção da infecção por micobactérias além de participarem do processo inflamatório que segue a infecção. Observam-se, entretanto, importantes diferenças na resposta da célula hospedeira relacionadas à virulência da micobactéria. Portanto o objetivo principal deste trabalho foi avaliar se o tratamento com o TAA manteria a capacidade micobactericida e imunomoduladora na infecção de macrófagos por *M. tuberculosis*-H37Rv, uma cepa laboratorial virulenta. Além da avaliação do TAA, foram avaliados 23 novos análogos sintetizados “in house”, com a intenção de melhorar a potência contra o *M. tuberculosis*. Foi observado que o TAA é capaz de promover a morte da micobactéria em cultivo exponencial, entretanto apresenta um MIC elevado (70 µM), três de seus novos análogos apresentaram melhora considerável na potência e o melhor deles apresentou MIC 0,1 µM. Avaliamos se a capacidade em matar o *M. tuberculosis* era mantida quando a micobactéria se encontrava no interior de macrófagos. Ambas as substâncias apresentaram a capacidade de diminuir o número de UFC intracelular. É interessante notar que o TAA apresentou melhora na potência, uma dose 10 vezes menor (7,0 µM) foi capaz de promover a morte do *M. tuberculosis*, fato não observado com seu análogo. Após a confirmação da ação micobactericida do TAA foi avaliada sua habilidade em alterar o acúmulo de CL. Observamos que o TAA é capaz de diminuir o acúmulo de CL em macrófagos infectados por *M. tuberculosis*. Mais estudos devem ser realizados para elucidação do mecanismo utilizado pelo TAA para a morte do *M. tuberculosis* e diminuição do acúmulo de CL e ainda se ambos têm ou não relação entre si. Entretanto nosso trabalho apresenta uma substância com potencial micobactericida e imunomodulador frente à infecção por *M. tuberculosis*

HOST LIPIDS: TARGETS IN MYCOBACTERIA INFECTION

Fatima M Vergara^{a, b, c}, Edison S. Zuniga^b, Joshua Odingo^b, Marcus Vinícius N. de Souza^c, Maria das Graças M.O. Henriques^{a, c}, Tanya Parish^{b#}

National Institute for Science and Technology on Innovation on Neglected Diseases (INCT/IDN),
Center for Technological Development in Health (CDTS), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil^a,

Infectious Disease Research Institute- United States of America^b,

Institute of Drug Technology (Farmanguinhos), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil^c

Running Head: *Host lipids: targets in mycobacteria infection*

#Address correspondence to:

IDRI, 1616 Eastlake Ave E, Suite 400, Seattle WA 98102

tanya.parish@idri.org

Abstract (75 words):

Macrophages are major host cells for *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). They play a key role in activation of innate and adaptive immune response against Mtb infection. The improvement of the actual treatment and development of new drugs have become significantly more urgent with every passing day. Adjuvant therapies focusing on the host's mechanisms of action have been discussed. Here we present small molecule analogs of thiophenacetamide (TAA), capable of killing Mtb inside macrophages, thus disrupting the accumulation of lipids inside the infected macrophages.

Tuberculosis (TB), a disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), is currently the second leading cause of death by a single infectious agent according to the world health organization (WHO). Over 8.6 million new cases of TB were registered in 2012; this a higher than any other single bacterial pathogen (1). The present treatment used against tuberculosis is a combination of drugs developed in the 1950s. However, the number of patients infected with multi-resistant strains, especially among HIV positive patients, is rapidly increasing. Thus the discovery and development of new drugs for the treatment of tuberculosis, including drug-resistant strains, is imperative.

The development of new drugs is an expensive, lengthy and challenging endeavor. In an effort to overcome this challenge, repurposing existing drugs has become of interest, and has led to the development of new fluoroquinolones and oxazolidinones which are currently in phase III and phase II clinical trials, respectively. Advances in screening methods has led to the groundbreaking discoveries of delamanid and bedaquiline; both are used for the treatment of multi-drug resistant TB (2). Despite these promising discoveries, drug-resistance and drug toxicity are still looming issues.

The initial screening for new compounds is usually done against Mtb strains cultured *in vitro*, in an exponential phase providing a simple, inexpensive, and easily system to analyze. The majority of antibiotics are directed against microbial targets. However, the eradication of persistent bacteria from the tissues would require prolonged chemotherapy either to allow drugs with poor activity against minimally active bacteria to complete their work, or to allow the host to maintain bactericidal effect (3).

The behavior of mycobacteria while inside the host cell has been extensively studied (4) . The benefits of immunomodulation of the host as a complement in the treatment of patients infected with Tb has been previously reported (5). The interaction between pathogen and host is so complex and diverse that some authors have proposed an immunological life cycle of Mtb where the mycobacteria would express or suppress different type of genes

leading to different states, such as dormancy. In the same way the use of triacylglycerol from the host by Mtb induces a dormancy-like state in phagocyte mycobacteria (6). It has also been shown the interaction and disruption of many ions, such as Cl^- , in the host lead by the mycobacteria (4, 7). To this end, developing agents that target the host pathways disturbed by the mycobacteria infection may prove fruitful.

Thiophenacetamide (TAA) and 21 analogs have demonstrated, albeit poor, mycobactericidal activity against Mtb and low cytotoxicity in J774 macrophages. (8) This antimicrobial activity can be attributed to the thiophene core which is present in TAA and TAA analogs (9-11). The compounds also have an acetamide moiety that had been described to have anti-inflammatory and analgesic properties (12-14). Therefore, we hypothesized that TAA could help macrophages to kill intracellular mycobacteria. The parent compound (TAA) and 21 analogs have previously shown poor activity against Mtb (8). For this purpose, we synthesized 24 new analogs and evaluated their activity *in vitro* (**table S1**).

The new analogs and the parent compound were tested against Mtb H37Rv using a dual readout of growth in a 96-well format, combining fluorescence and an optical density based readout (15). According to our data, 3 analogs had improved activity against Mtb when compared to the previously synthesized analogs (**table S1**).

It is well known that all of the frontline drugs currently used to treat TB target processes that are involved in cell growth and division studied in cultured mycobacteria, which may explain their different potency or activity against mycobacteria inside the host (3). In this context, we hypothesized if TAA or any of the new analogs evaluated are able to kill Mtb in culture, outside the host cell, also the Mtb adapted to the host cell.

The compound **22** demonstrated the best activity (MIC 0.1 μM) against Mtb in exponential phase and has not shown cytotoxic activity in Vero cells (**table S1**). TAA possesses poor activity against Mtb in exponential phase- (MIC 70 μM) but also demonstrated no cytotoxic activity in Vero cells. Lacking structural diversity, we envision that the activity

of TAA can be improved via functional group modification. Nonetheless, these two compounds, TAA and compound **22**, have been selected for further studies.

In order to test the mycobactericidal activity of the compounds an *in vitro* model of infection was employed, where J774 macrophages were infected with a fluorescent strain of Mtb H37Rv (CHEAM3- expressing a codon-optimized mCherry fluorescent protein (15) for 24 hours in a MOI 1:1. After the infection, the cells were treated with compound for 72 hours. compound **22** was evaluated at 10x MIC and TAA was evaluated at 0.1x MIC. Rifampicin was used as a positive control (6 μM). We observed that the number of mycobacteria colonies collected from macrophages decreased after treatment with TAA and rifampicin (FIG1). It is interesting to note that there is no difference in colony-forming units (CFUs) after treatment with different concentrations of compound **22**. However a lower concentration of TAA (7 μM) decreased CFUs significantly when compared to the untreated group, while at higher concentration, TAA (70 μM) was inefficacious.

TAA has shown an improvement in potency against phagocytosed Mtb when compared to cultured mycobacteria. On the other hand, the potency of compound **22** remained consistent against Mtb adapted to host environment. These results indicate that TAA could have the property of induce or meliorate a host pathway that would increase Mtb killing. This property is not universal in TAA analogs.

Following the idea that TAA could modulate a host cell pathway leading to an increase in Mtb killing, we investigated the effects of the compound on the disruption of lipid bodies (LB) in infected macrophages.

The importance of lipids is currently being elicited. Lipids are important in the balance of pro and anti-inflammatory responses from the immune system against intracellular pathogens (16). In addition, they play a role in cellular signaling, membrane micro domain organization and dynamics, membrane trafficking and inflammatory site (17, 18). These properties make lipids an attractive target for pathogens to modulate host cell processes in

order to allow their survival and replication (19). On the other hand lipids, in particular LB, and its interactions with other organelles could be a pharmacological target for new drugs which could induce a well-balanced response that favors protective mechanisms and avoids those that are harmful (5). It has been reported that mycobacteria infection can induce and increase the number of LB in the host cell. In macrophages the increase in the lipid accumulation leads to the formation of foamy macrophages well known for their participation on granuloma formation and maintenance of tuberculosis infection. Interestingly macrophages infected with virulent Mtb strains demonstrated a higher number of LB formation than when infected with an avirulent strain (20). Mtb is known for the ability to evade and manipulate the immune host system in order to take advantage of it. It has been described that Mtb and other pathogenic mycobacteria induces the accumulation of LB in infected macrophages (21, 22). In addition it has also been shown by electron microscopy that Mtb migrates towards LB and engulfs it. The host organelle is used as a lipid source by the mycobacteria under stress also inducing necrosis and favoring dissemination. In experimental studies with *M. bovis*-BCG, it was found that this pathogen is capable of inducing a dose- and time-dependent increase on LB formation inside macrophages (23-25). Furthermore it was shown that LB are induced by mycobacteria which take advantage and use lipid accumulation to persist at the attack from the immune system.

In order to test the LB-modulating effects of TAA, we employed the same experimental model described above (15). J774 macrophages were infected with Mtb H37Rv (CHEAM3) and treated with TAA. After treatment, the cells were fixed with formaldehyde 4% for 4 hours followed by labelling with Bodipy 493/503 and DAPI. The images were captured using an inverted Nikon Eclipse fluorescent microscope (**FIGS1**) and using Image J software. As shown in **FIG2**, LB are almost absent in the non-infected macrophages as expected. After infection with Mtb, the number of LB per cell is significantly higher. Both treatments with TAA and rifampicin reduced the number of LB.

The correlation between increase of mycobacteria killing and decrease of LB was already been shown (20), however a novel compound that could be able to induce LB has not been shown. Our results indicate that TAA probably induces diminished LB accumulation leading to a decrease of Mtb inside macrophages. The mechanism by which this occurs remains unclear.

Hypotheses have been raised as the autophagy pathway and/or the balance between perilipin and hormone-sensitive lipase (HSL) could be addressed. Perilipin and HSL are being described as the key role of degradation of LB. The mechanism of this lipolytic reaction is related to the activation of adenylyl cyclase (AC) which leads to an increase of cAMP and phosphorylation of both HSL and peripilin (26). The conformational change of the phosphorylated peripilin allows the phosphorylated HSL to attach to the LB membrane. These events are followed by an increase of triacylglycerol (TAG) lipolysis and consequently a decrease in LB number (26). In agreement with what has been described, *Mycobacterium leprae* is able to suppress HSL phosphorylation leading to an increase in LB number inside THP-1 cells (21).

Autophagy could be also play a role in LB maintenance and degradation. In response to a short-term increase in lipid availability or during starvation, autophagy is increased, leading to a greater breakdown of stored lipids to supply fatty acids (27). A proposed mechanism of this degradation is autophagosome (double-membrane vesicles) formation, which delivers intracellular proteins and organelles sequestered into lysosomes for degradation. Inhibition of autophagy increases cellular lipid levels by blocking this degradation process. With a sustained increase in lipid availability, lipid accumulation also acts to inhibit autophagic function, promoting lipid accumulation (increased LB size) (27)

Cholesterol biosynthesis, as well as the TGA regulation, has a crucial role in LB biogenesis. The inhibition of the Acyl-CoA cholesterol acyltransferases 1 and 2 (ACAT-1,2) by CI-976 leads to the inhibition of LB formation on THP-1 cells infected with

Mycobacterium tuberculosis (Mtb). In the absence of the inhibitor, Mtb was co-localized with LB and there was no signal of autophagy (20).

Definitely further studies must be done to determine by which pathways TAA is able to inhibit Mtb growth. Nonetheless here we showed a compound that has its abilities to kill Mtb improved- while it is inside macrophages and modulates an important pathway of the host cell.

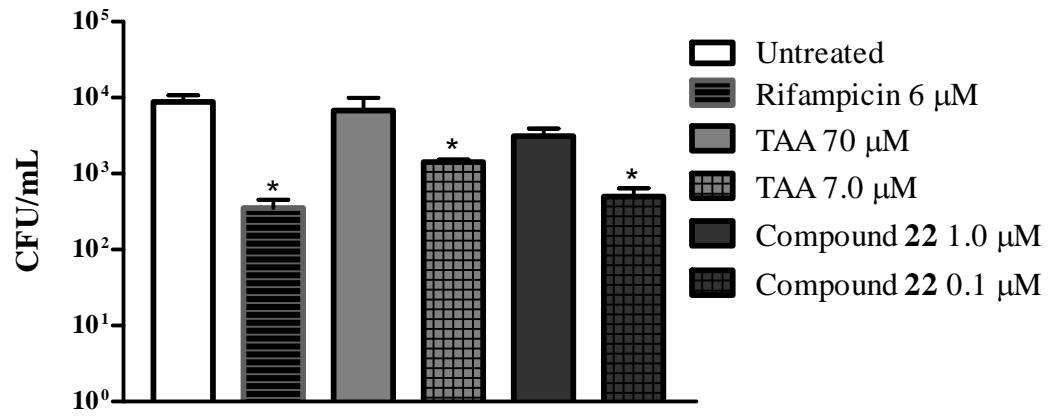


FIG1: Intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis in vitro*: 10⁵ J774 macrophages were infected with Mtb for 24 h (MOI 1:1) and treated with TAA (70 μM or 7 μM) or compound **22** (1.0 μM or 0.1 μM) or Rifampicin (6 μM) for 72 h. Macrophages were lysate using 0,025% SDS. The suspension was transferred to conical tubes containing 0,25 % SDS and spin at 2000 g for 10 min. The “pellet” was suspended in 1 mL 7H9+Tw+OADC and plated in a serial dilutions (from 10⁻¹ to 10⁻⁵) in solid media for 4 weeks to determine CFU. Data show mean ± SEM of triplicate per group and are representative of 4 experiments. *p ≤ 0.05 between groups treated and not treated. One-way Anova test was applied followed by Newman–Keuls test.

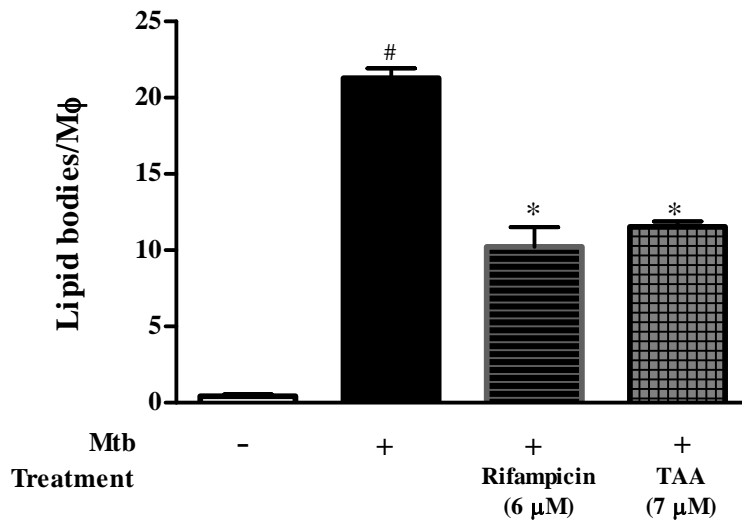


FIG2: Quantification of lipid bodies inside macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: 10^5 J774 macrophages were infected with Mtb for 24 hours (MOI 1:1) and treated with TAA (7 μ M) or Rifampicin (6 μ M) for 72 hours. Cells were fixed with formaldehyde 4%. Lipid bodies were stained with BODIPY 493/593 after fixation. Images were taken with a Nikon T71 fluorescent microscope, 100 x magnified. Quantification of lipid bodies was done using ImageJ software. Data show mean \pm SEM of triplicate per group and are representative of 3 experiments. # $p \leq 0.05$ between macrophages infected and macrophages not infected; * $p \leq 0.05$ between macrophages infected but not treated and macrophages infected and treated. One-way Anova test was applied followed by Newman–Keuls test.

References

1. **WHO.** 2013. Global tuberculosis report 2013. World Health Organization, France.
2. **Zumla AI, Gillespie SH, Hoelscher M, Philips PP, Cole ST, Abubakar I, McHugh TD, Schito M, Maeurer M, Nunn AJ.** 2014. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *Lancet Infect Dis* **14**:327-340.
3. **Gomez JE, McKinney JD.** 2004. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb)* **84**:29-44.
4. **Ernst JD.** 2012. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* **12**:581-591.
5. **Hawn TR, Matheson AI, Maley SN, Vandal O.** 2013. Host-directed therapeutics for tuberculosis: can we harness the host? *Microbiol Mol Biol Rev* **77**:608-627.
6. **Daniel J, Maamar H, Deb C, Sirakova TD, Kolattukudy PE.** 2011. Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS pathogens* **7**.
7. **Tan S, Sukumar N, Abramovitch RB, Parish T, Russell DG.** 2013. Mycobacterium tuberculosis responds to chloride and pH as synergistic cues to the immune status of its host cell. *PLoS Pathog* **9**:e1003282.
8. **Silva Lourenço MC, Rodrigues Vicente F, de Oliveira Henriques M, Peixoto Candéa AL, Borges Gonçalves RS, Nogueira TC, de Lima Ferreira M, Nora de Souza MV.** 2007. Synthesis and biological evaluation of N-(aryl)-2-thiophen-2-ylacetamides series as a new class of antitubercular agents. *Bioorg Med Chem Lett* **17**:6895-6898.
9. **Hudson JB, Graham EA, Miki N, Towers GHN, Hudson LL, Rossi R, Carpita A, Neri D.** 1989. Photoactive antiviral and cytotoxic activities of synthetic thiophenes and their acetylenic derivatives *Chemosphere Volume 19*:Pages 1329-1343.
10. **Marles RJ, Hudson JB, Graham EA, Soucy-Breau C, Morand P, Compadre RL, Compadre CM, Towers GH, Arnason JT.** 1992. Structure-activity studies of photoactivated antiviral and cytotoxic tricyclic thiophenes. *Photochem Photobiol* **56**:479-487.
11. **Masunari A, Tavares LC.** 2007. A new class of nifuroxazide analogues: synthesis of 5-nitrothiophene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Med Chem* **15**:4229-4236.
12. **Casadio S, Pala G, Marazziùberti E, Coppi G.** 1964. Alpha-isopropyl-alpha²-dimethylaminoethyl)-1-naphthylacetamide (DA 992), a new anti-inflammatory agent. *Experientia* **20**:457.
13. **Casadio S, Pala G, Bruzzese T, Crescenzi E, Marazzi-Uberti E, Coppi G.** 1965. Synthesis and pharmacological evaluation of alpha,alpha-disubstituted derivatives of phenylacetamide and 1-naphthylacetamide. *J Med Chem* **8**:594-598.
14. **Pala G, Casadio S, Bruzzese T, Crescenzi E, Marazzi-Uberti E.** 1965. Structure-activity relationships in antiinflammatory and analgesic compounds chemically related to alpha-isopropyl-alpha-(2-dimethylaminoethyl)-1-naphthylacetamide. *J Med Chem* **8**:698-700.
15. **Ollinger J, Bailey MA, Moraski GC, Casey A, Florio S, Alling T, Miller MJ, Parish T.** 2013. A Dual Read-Out Assay to Evaluate the Potency of Compounds Active against *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* **8**:e60531.
16. **Chen M, Divangahi M, Gan H, Shin DS, Hong S, Lee DM, Serhan CN, Behar SM, Remold HG.** 2008. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *The Journal of experimental medicine* **205**:2791-2801.

17. **Melo RC, D'Avila H, Wan HC, Bozza PT, Dvorak AM, Weller PF.** 2011. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **59**:540-556.
18. **Robenek H, Hofnagel O, Buers I, Robenek MJ, Troyer D, Severs NJ.** 2006. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *Journal of Cell Science* **119**.
19. **van der Meer-Janssen YPM, van Galen J, Batenburg JJ, Helms JB.** 2010. Lipids in hostpathogen interactions: Pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Progress in Lipid Research* **49**:1-26.
20. **Singh V, Jamwal S, Jain R, Verma P, Gokhale R, Rao KVS.** 2012. Mycobacterium tuberculosis-Driven Targeted Recalibration of Macrophage Lipid Homeostasis Promotes the Foamy Phenotype. *Cell Host & Microbe* **12**:669-681.
21. **Tanigawa K, Degang Y, Kawashima A, Akama T, Yoshihara A, Ishido Y, Makino M, Ishii N, Suzuki K.** 2012. Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in Mycobacterium leprae-infected macrophages. *Microbial Pathogenesis* **52**:285-291.
22. **Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F.** 2009. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* **10**:943-948.
23. **Anes E, Peyron P, Staali L, Jordao L, Gutierrez MG, Kress H, Hagedorn M, Maridonneau-Parini I, Skinner MA, Wildeman AG, Kalamidas SA, Kuehnel M, Griffiths G.** 2006. Dynamic life and death interactions between Mycobacterium smegmatis and J774 macrophages. *Cellular microbiology* **8**:939-960.
24. **Russell DG, VanderVen BC, Lee W, Abramovitch RB, Kim MJ, Homolka S, Niemann S, Rohde KH.** 2010. Mycobacterium tuberculosis wears what it eats. *Cell host & microbe* **8**:68-76.
25. **D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT.** 2006. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **176**:3087-3097.
26. **Tansey JT, Sztalryd C, Hlavin EM, Kimmel AR, Londos C.** 2004. The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB life* **56**:379-385.
27. **Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ.** 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* **458**:1131-1135.

Supplemental material:

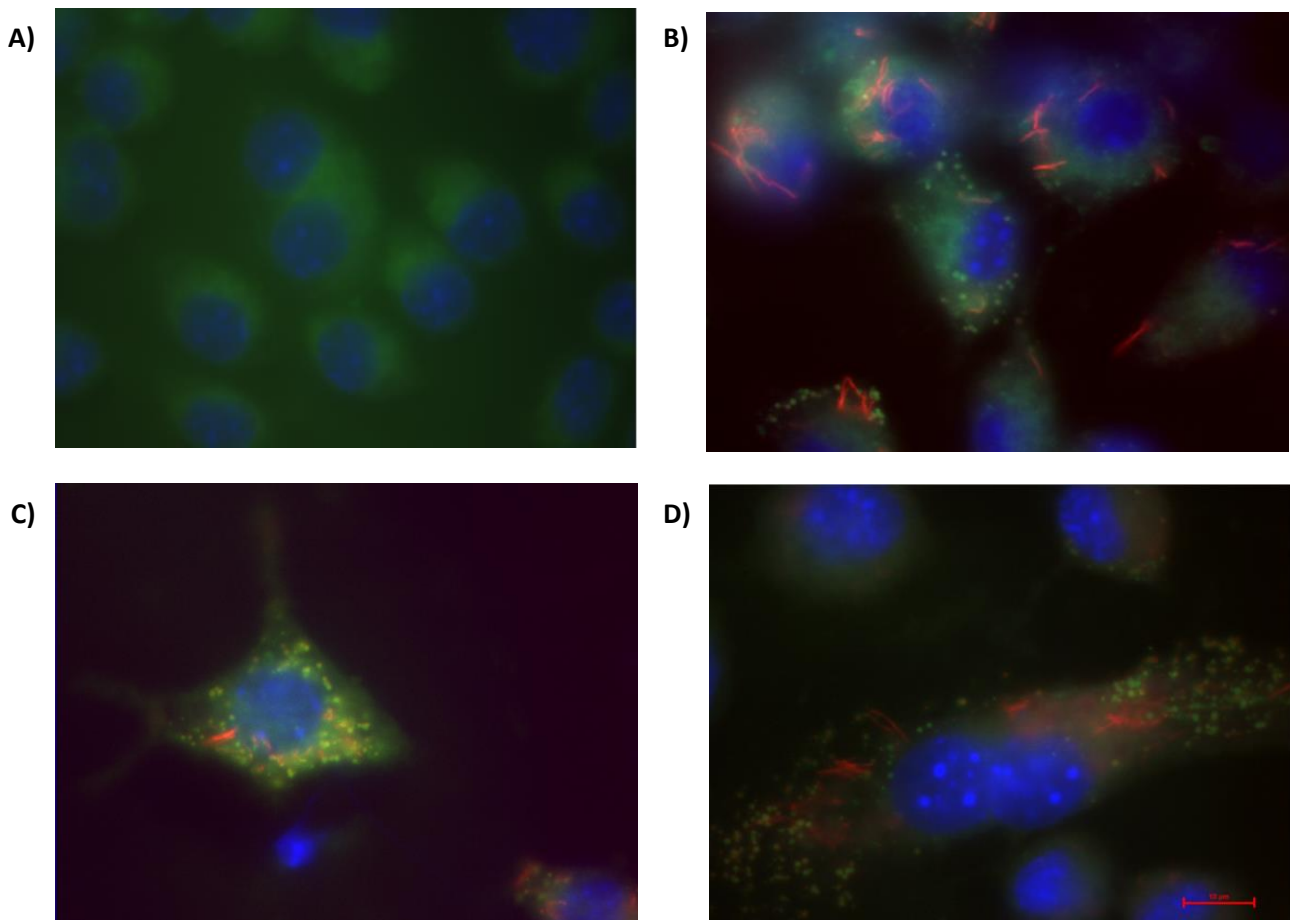
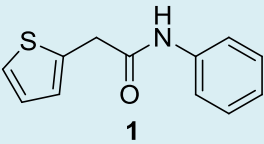
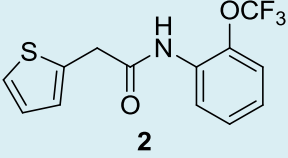
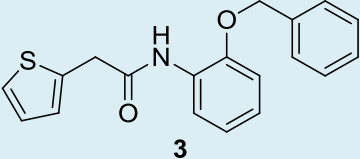
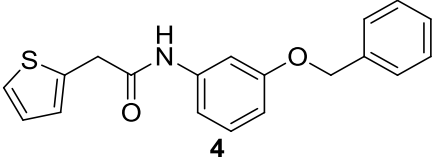
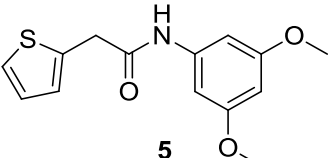
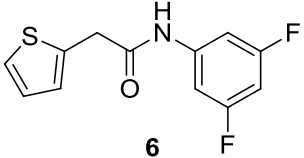
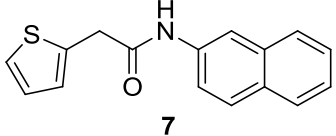
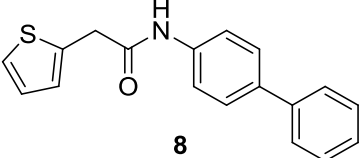
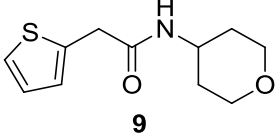
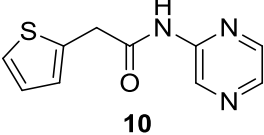
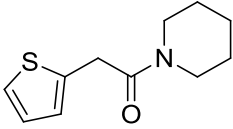
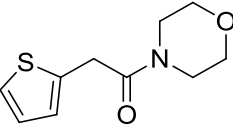
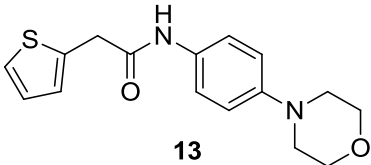
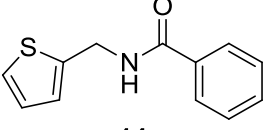
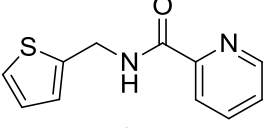
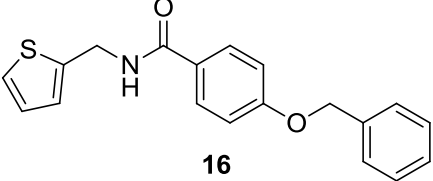
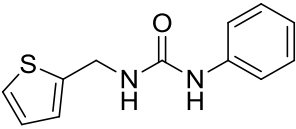
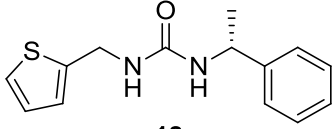
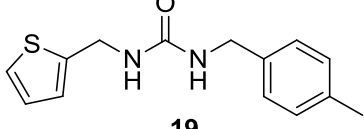
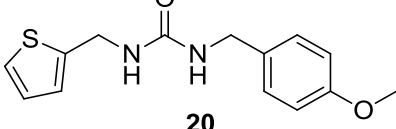
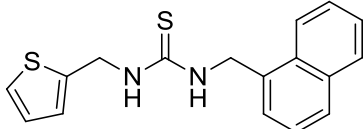
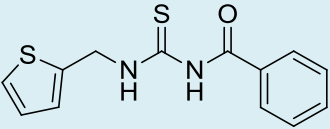
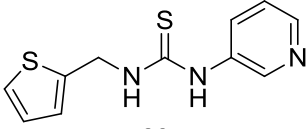
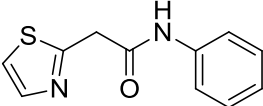
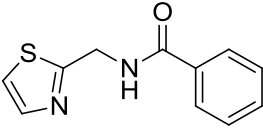


FIG S1: Immunofluorescence microscopy of J774 macrophages infected with Mtb CHEAM3, (A) not infected, not treated, (B) infected with Mtb, not treated, (C) infected with Mtb treated with TAA (7 μ M), (D) infected with Mtb treated with rifampicin (6 μ M). Macrophages nucleus were stained with DAPI (in blue), lipid bodies were stained with the BODIPY 493/503 (small circles in green), Mtb CHEAM3 (red). Quantification of lipid bodies was performed in ImageJ software.

Table S1: TAA and analogs structures related to MIC against Mtb:

TAA analogs	MIC (μM)	Cytotoxicity
 1	70	>100
 2	3	>100
 3	>150	ND
 4	0.7	48.8
 5	>150	ND
 6	>150	ND
 7	>150	ND
 8	>150	ND
 9	>150	ND
 10	>150	ND

 <p>11</p>	>150	ND
 <p>12</p>	>150	ND
 <p>13</p>	>150	ND
 <p>14</p>	>150	ND
 <p>15</p>	80	ND
 <p>16</p>	69	ND
 <p>17</p>	88	ND
 <p>18</p>	>150	ND
 <p>19</p>	102	ND
 <p>20</p>	>150	ND
 <p>21</p>	100	ND

 <p style="text-align: center;">22</p>	0.1	>100
 <p style="text-align: center;">23</p>	112	ND
 <p style="text-align: center;">24</p>	>150	ND
 <p style="text-align: center;">25</p>	>150	ND

General Methods

¹H and ¹³C NMR spectral data were recorded on a 300 MHz Bruker NMR spectrometer. Column chromatography was conducted on Revelaris flash chromatography system. Reactions were monitored using thin-layer chromatography (TLC) on silica gel plates. HPLC-MS analysis was conducted on an Agilent 1100 series LC-MS system (Agilent ChemStation Rev.A.10.02; Phenomenex-Luna-C18, 4.8 mm × 150 mm, 5 μm, 1.0 mL/min, UV 254nm, room temperature) with MeCN/H₂O (0.05% TFA or HCOOH buffer) gradient elution. Melting points were measured on a Mettler Toledo MP-50 Metling Point System. All reagents and solvents were purchased from Fisher Scientific, VWR or Sigma Aldrich.

General procedure for *N*-phenyl-2-thiopheneacetamide analogs (1-13)

To 2-thiopheneacetyl chloride (0.1 mL, 0.8 mmol) dissolved in THF (1 mL) was added a solution of amine (0.8 mmol) in THF (1 mL), dropwise. The mixture was stirred at room temperature. The reaction was monitored via TLC. After 1 h, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate. The organic layer was subsequently washed with 1 M HCl (1 x 10 mL), water (1 x 10 mL), 1 M NaOH (1 x 10 mL) and brine (2 x 10 mL). The organic layer was collected, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to give product.

N-Phenyl-2-thiopheneacetamide (TAA, 1)

169 mg beige solid (96% yield); m.p. 119-120 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 3.93 (s, 2H), 6.95-7.09 (m, 3H), 7.27-7.32 (m, 3H), 7.66 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 9.40 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 37.9, 119.3, 123.5, 124.7, 126.4, 126.6, 128.7, 137.0, 139.2, 168.0. All data are consistent with reported values (1).

N-[2-(Trifluoromethoxy)phenyl]-2-thiopheneacetamide (2)

190 mg white solid (82% yield); m.p. 104-105 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 4.06 (s, 2H), 7.02-7.09 (m, 2H), 7.36-7.40 (m, 2H), 7.63-7.71 (m, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.60 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 37.3, 122.1, 125.3, 125.4, 125.7, 125.9, 126.00, 126.07, 126.1, 126.8, 127.1, 132.8, 136.3;

***N*-[2-(Phenylmethoxy)phenyl]-2-thiopheneacetamide (3)**

245 mg beige solid (93% yield); m.p. 85-86 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 3.99 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 6.90-7.09 (m, 5H), 7.29 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.37-7.41 (m, 5H), 8.35-8.38 (m, 1H), 8.55 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 38.0, 70.2, 112.0, 119.9, 120.8, 123.7, 125.3, 127.0, 127.2, 127.8, 127.9, 128.2, 128.5, 136.6, 136.8, 147.5, 167.5;

***N*-[3-(Phenylmethoxy)phenyl]-2-thiopheneacetamide (4)**

246 mg beige solid (93% yield); m.p. 94-95 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 3.92 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 6.73-6.75 (m, 1H), 6.95-7.00 (m, 2H), 7.18-7.24 (m, 2H), 7.31-7.55 (m, 7H), 9.40 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 37.9, 69.4, 106.0, 106.1, 109.9, 111.6, 111.7, 124.7, 126.4, 126.6, 127.5, 127.7, 128.3, 129.4, 137.0, 137.4, 140.4, 159.3, 167.9;

***N*-(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-thiopheneacetamide (5)**

160 mg off-white solid (71% yield); m.p. 89-90 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 3.73 (s, 6H), 3.91 (s, 2H), 6.23 (br s, 1H), 6.93-7.00 (m, 4H), 7.30-7.32 (m, 1H), 9.35 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 38.0, 54.6, 95.6, 97.6, 124.8, 126.4, 126.6, 136.9, 140.9, 161.1, 168.0;

***N*-(3,5-Difluorophenyl)-2-thiopheneacetamide (6)**

173 mg beige solid (84% yield); m.p. 160-161 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 3.95 (s, 2H), 6.70 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.95-7.00 (m, 2H), 7.32-7.39 (m, 3H), 9.73 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 37.8, 97.9, 98.2, 98.6, 101.8, 102.2, 124.9, 126.6, 136.3, 164.6;

***N*-(2-Naphthalenyl)-2-thiopheneacetamide (7)**

191 mg beige solid (88% yield); m.p. 159-160 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 4.00 (s, 2H), 6.97 (m, 1H), 7.05 (m, 1H), 7.33-7.49 (s, 3H), 7.62-7.66 (dd, *J*₁ = 8.8 Hz, *J*₂ = 1.9 Hz, 1H), 7.80-7.85 (m, 3H), 8.39 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 37.9, 115.6, 119.8, 124.6, 124.7, 126.3, 126.4, 126.5, 127.41, 127.48, 128.4, 130.4, 133.9, 136.8, 168.0;

***N*-(1,1'-Biphenyl)-4-yl-2-thiopheneacetamide (8)**

182 mg brown solid (76% yield); m.p. 176-177 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 3.96 (s, 2H), 6.97-7.04 (m, 3H), 7.30-7.35 (m, 2H), 7.44 (t, *J* = 15.2 Hz, 2H), 7.63 (t, *J* = 8.2 Hz, 4H), 7.76-7.79 (m, 2H), 9.46 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 25.9, 34.7, 37.9, 63.8, 119.6, 124.7, 126.40, 126.46, 126.5, 126.9, 127.0, 128.8, 137.0, 138.7, 140.4, 167.8;

***N*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-4-yl)-2-thiopheneacetamide (9)**

21 mg off-white solid (11% yield); m.p. 115-117 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 1.30 (s, 1H), 2.74-2.87 (m, 4H), 3.57-3.78 (m, 5H), 3.97 (s, 1H), 6.93-6.95 (m, 2H), 7.27-7.33 (m, 1H), 7.63 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 33.3, 34.0, 35.6, 41.9, 46.3, 54.7, 56.3, 66.2, 124.2, 126.1, 126.3;

N-Pyrazinyl-2-thiopheneacetamide (10)

25 mg off-white solid (14% yield); m.p. 94-95 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 2.87 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 6.98-7.01 (m, 1H), 7.07-7.08 (m, 1H), 7.35-7.37 (dd, $J_1 = 5.1$ Hz, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 8.30-8.34 (m, 2H), 9.46 (s, 1H), 9.86 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 37.2, 125.0, 126.6, 126.8, 136.2, 136.4, 140.0, 142.4, 148.8, 168.7;

1-(1-Piperidiny)-2-(2-thienyl)-ethanone (11)

116 mg yellow solid (68% yield); m.p. 89-91 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 1.44-1.48 (m, 4H), 1.57-1.64 (m, 2H), 3.51 (t, $J = 14.4$ Hz, 4H), 3.94 (s, 2H), 6.94-6.96 (m, 2H), 7.29-7.31 (m, 1 H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 24.2, 25.3, 25.4, 26.1, 34.5, 42.4, 46.8, 124.4, 125.8, 126.4, 137.8 167.4. All data are consistent with reported values (2).

1-(4-Morpholinyl)-2-(2-thienyl)-ethanone (12)

120 mg white solid (69% yield); m.p. 65-67 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 3.53-3.60 (m, 8H), 3.97 (s, 2H), 6.94-6.97 (m, 2H), 7.31-7.33 (dd, $J_1 = 4.7$ Hz, $J_2 = 1.4$ Hz, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 34.1, 41.9, 46.3, 66.3, 124.6, 126.0, 126.4, 137.4, 167.9. All data are consistent with reported values (3).

N-[4-(4-morpholinyl)phenyl]-2-thiopheneacetamide (13)

87 mg white solid (36% yield); m.p. 64-66 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 3.07 (t, $J = 4.9$ Hz, 4H), 3.76 (t, $J = 4.5$ Hz, 4H), 3.88 (s, 2H), 6.89-6.99 (m, 3H), 7.31-7.34 (m, 1H), 7.52 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 9.18 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 34.3, 37.8, 49.5, 66.5, 115.7, 120.4, 124.6, 124.7, 126.2, 126.5, 126.6, 131.8, 148.0, 167.2;

N-(2-Thienylmethyl)-benzamide (14)

To benzoylchloride (0.11 mL, 0.97 mmol) dissolved in THF (2 mL) was added 2-thiophenemethylamine (0.1 mL, 0.97 mmol), dropwise. Upon completion of addition, precipitate formed. The mixture was stirred at room temperature. The reaction was monitored via TLC. After 1 h, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate. The organic layer was subsequently washed with 1 M HCl (1 x 10 mL), water (1 x 10 mL), 1 M NaOH (1 x 10 mL) and brine (2 x 10 mL). The organic layer was collected, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to give **14** as 155 mg white solid (73% yield); m.p.122-123 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 4.77 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 6.93-6.96 (m, 1H), 7.04-7.05 (m, 1H), 7.30-7.32 (dd, $J_1 = 5.0$ Hz, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H), 7.43-7.55 (m, 3H), 7.93-7.96 (m, 2H), 8.40 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 37.9, 124.7, 125.5, 126.5, 127.2, 128.3, 131.2, 134.6, 142.6, 166.3. All data are consistent with reported values (4).

***N*-(2-Thienylmethyl)-2-pyridinecarboxamide (15)**

To picolinic acid (120 mg, 0.97 mmol) and HATU (556 mg, 1.46 mmol) dissolved in DMF (4 mL) was added thiophene-2-methylamine (0.1 mL, 0.97 mmol) followed by the addition of DIPEA (0.25 mL, 1.46 mmol). The mixture was stirred at room temperature. The reaction was monitored via TLC. After 16 h, the reaction was quenched in H₂O (10 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). The organic layers were combined, washed with brine (2 x 25 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The resulting crude was purified via column chromatography (hexanes:ethyl acetate 100:0 to 0:100 over 30 min) to give **15** as 187 mg yellow solid (88% yield); m.p. 102-104 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 4.83 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 6.95-6.98 (m, 1H), 7.09-7.10 (m, 1H), 7.31-7.33 (m, 1H), 7.54-7.58 (m, 1H), 7.98 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.15-8.18 (m, 1H), 8.58-8.60 (m, 1H), 8.90 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 37.4, 39.4, 121.9, 124.8, 125.7, 126.3, 126.6, 137.5, 142.3, 148.3, 150.1, 163.6;

4-(Phenylmethoxy)-*N*-(2-thienylmethyl)-benzamide (16)

To 4-benzyloxybenzoic acid (222 mg, 0.97 mmol) and HATU (556 mg, 1.46 mmol) dissolved in DMF (4 mL) was added thiophene-2-methylamine (0.1 mL, 0.97 mmol) followed by the addition of DIPEA (0.25 mL, 1.46 mmol). The mixture was stirred at room temperature. The reaction was monitored via TLC. After 16 h, the reaction was quenched in H₂O (10 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). The organic layers were combined, washed with brine (2 x 25 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The resulting crude was purified via column chromatography (hexanes:ethyl acetate 100:0 to 0:100 over 30 min) to give **16** as 254 mg yellow solid (81% yield); m.p. 102-104 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 4.74 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 5.20 (s, 2H), 6.93-6.96 (m, 1H), 7.03-7.10 (m, 3H), 7.29-7.51 (m, 6H), 7.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.20 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 37.8, 69.6, 114.3, 124.6, 125.3, 126.4, 127.1, 127.6, 127.8, 128.4, 129.0, 137.0, 142.9, 161.3, 165.6;

General procedure for *N*-phenyl-*N'*-(2-thienylmethyl)-urea and thiourea analogs (17-23)

To thiophene-2-methylamine (0.1 mL, 0.97 mmol) dissolved in THF (2 mL) was added isocyanate or isothiocyanate (0.97 mmol), dropwise. The mixture was stirred at room temperature. Precipitate was observed as the reaction progressed. The reaction was monitored via TLC. After 1 h, the resulting precipitate was collected, washed with ethyl acetate and dried to give product.

***N*-Phenyl-*N'*-(2-thienylmethyl)-urea (17)**

180 mg white solid (80% yield); m.p. 169-170 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 4.58 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 6.29 (br s, 1H), 6.91-7.00 (m, 3H), 7.21-7.32 (m, 3H), 7.49-7.52 (m, 2H), 8.01 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 38.2, 118.1, 121.5, 124.5, 125.0, 126.5, 128.5, 140.5, 143.5, 154.9;

***N*-[(*R*)-1-Phenylethyl]-*N'*-[1-(2-thienyl)ethyl]-urea (18)**

147 mg white solid (58% yield); m.p. 122-124 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 1.38-1.49 (m, 4H), 4.40-4.55 (m, 2H), 4.89-4.99 (m, 1H), 6.02 (br s, 2H), 6.90-6.92 (m, 2H), 7.18-7.36 (m, 7H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 22.3, 22.6, 38.4, 49.0, 49.2, 124.2, 124.6, 125.8, 126.4, 126.5, 126.8, 128.2, 128.4, 144.2, 145.6;

***N*-[(4-Methylphenyl)methyl]-*N'*-(2-thienylmethyl)-urea (19)**

292 mg white solid (99% yield); m.p. 163-164 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 2.27 (s, 3H), 4.17 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 4.38 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 6.37-6.49 (dt, *J*₁ = 24.6 Hz, *J*₂ = 5.5 Hz, 2H), 6.93 (s, 2H), 7.09-7.15 (m, 4H), 7.36-7.37 (m, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, DMSO-d₆) 21.1, 38.6, 42.1, 125.1, 127.0, 127.4, 129.2, 136.0, 136.1, 144.8, 158.2;

***N*-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-*N'*-(2-thienylmethyl)-urea (20)**

240 mg white solid (89% yield); m.p. 147-148 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 3.72 (s, 3H), 4.16 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 4.39 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 6.36-6.49 (dt, *J*₁ = 27.6 Hz, *J*₂ = 5.7 Hz, 2H), 6.86-6.89 (m, 2H), 6.94-6.95 (m, 2H), 7.17-7.20 (m, 2H), 7.36-7.37 (m, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, DMSO-d₆) 39.1, 42.8, 55.4, 114.0, 125.0, 127.0, 128.8, 133.1, 144.8, 158.1, 158.5;

***N*-(2-Naphthyl)-*N'*-(2-thienylmethyl)-thiourea (21)**

283 mg yellow solid (97% yield); m.p. 151-152 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 5.02 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 6.88-6.94 (m, 2H), 7.27 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 7.45-7.57 (m, 5H), 7.88-8.03 (m, 3H), 9.14 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 43.1, 123.0, 124.7, 125.7, 125.8, 126.2, 126.4, 126.6, 127.9, 128.2, 130.5, 133.5, 134.6, 141.9, 182.6;

***N*-[[2-(Thienylmethyl)amino]thioxomethyl]-benzamide (22)**

264 mg white crystal (98% yield); m.p. 114-115 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 5.15 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 7.00-7.03 (m, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.40-7.42 (m, 1H), 7.52-7.57 (m, 2H), 7.64-7.69 (m, 1H), 10.18 (br s, 1H), 11.24 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 43.3, 125.6, 126.6, 127.0, 128.1, 128.6, 132.3, 133.1, 139.5, 167.6, 180.5;

***N*-3-Pyridinyl-*N'*-(2-thienylmethyl)-thiourea (23)**

239 mg white crystal (99% yield); m.p. 160-161 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 4.93 (s, 2H), 6.99 (t, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.08-7.09 (m, 1H), 7.33-7.38 (dd, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 4.4 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.31-8.33 (m, 1H), 8.46 (br s, 1H), 8.58-8.59 (m, 1H), 9.75 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, DMSO-d₆) 42.7, 123.7, 125.8, 126.6, 127.0, 131.2, 136.5, 141.7, 145.3, 145.5, 181.4;

***N*-Phenyl-2-thiazoleacetamide (24)**

To 2-thiazoleacetic acid (50 mg, 0.35 mmol) and HATU (159 mg, 0.42 mmol) dissolved in DMF (2 mL) was added aniline (0.03 mL, 0.35 mmol) followed by the addition of DIPEA (0.07 mL, 0.42 mmol). The mixture was stirred at room temperature. The reaction was monitored via TLC. After 16 h, the reaction was quenched in H₂O (10 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). The organic layers were combined, washed with brine (2 x 25 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The resulting crude was purified via column chromatography (hexanes:ethyl acetate 100:0 to 0:100 over 30 min) to give **24** as 50 mg beige solid (66% yield); decomp. 113-115 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ ; ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 4.19 (s, 2H), 7.08 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.32 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.67-7.76 (m, 3H), 9.68 (br s, 1H); 40.8, 119.3, 120.0, 123.6, 128.7, 139.0, 142.0, 163.2, 166.2;

***N*-(2-Thiazolylmethyl)-benzamide (25)**

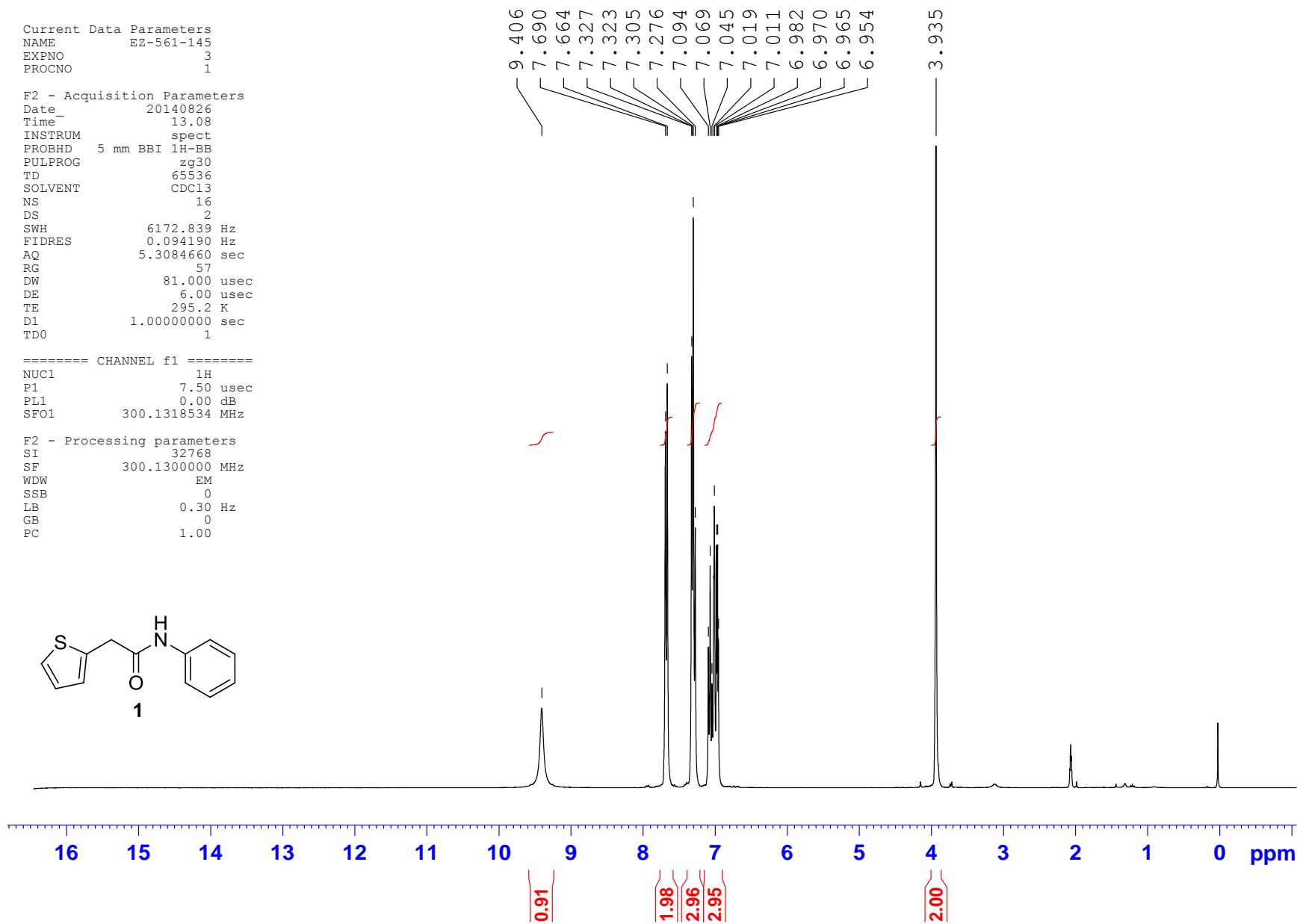
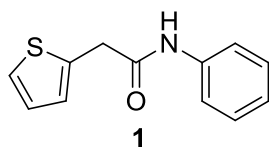
To benzoylchloride (0.038 mL, 0.33 mmol) dissolved in THF (2 mL) was added 2-aminomethylthiazole hydrochloride (50 mg, 0.33 mmol) followed by triethylamine (0.045 mL, 0.33 mmol). The mixture was stirred at room temperature. The reaction was monitored via TLC. After 1 h, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate. The organic layer was subsequently washed with water (1 x 10 mL) and brine (2 x 10 mL). The organic layer was collected, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residual was purified via column chromatography (hexanes:ethyl acetate 100:0 to 0:100 over 30 min) to give **25** as 15 mg white solid (21% yield); m.p.118-119 °C; ¹H NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ 4.88 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.44-7.71 (m, 5H), 7.70-7.71 (m, 1H), 7.94-8.00 (m, 1H), 8.61 (br s, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, acetone-d₆) 41.1, 119.4, 127.2, 127.4, 128.2, 128.4, 131.1, 131.4, 134.3, 142.2;

Current Data Parameters
NAME EZ-561-145
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140826
Time_ 13.08
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 57
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



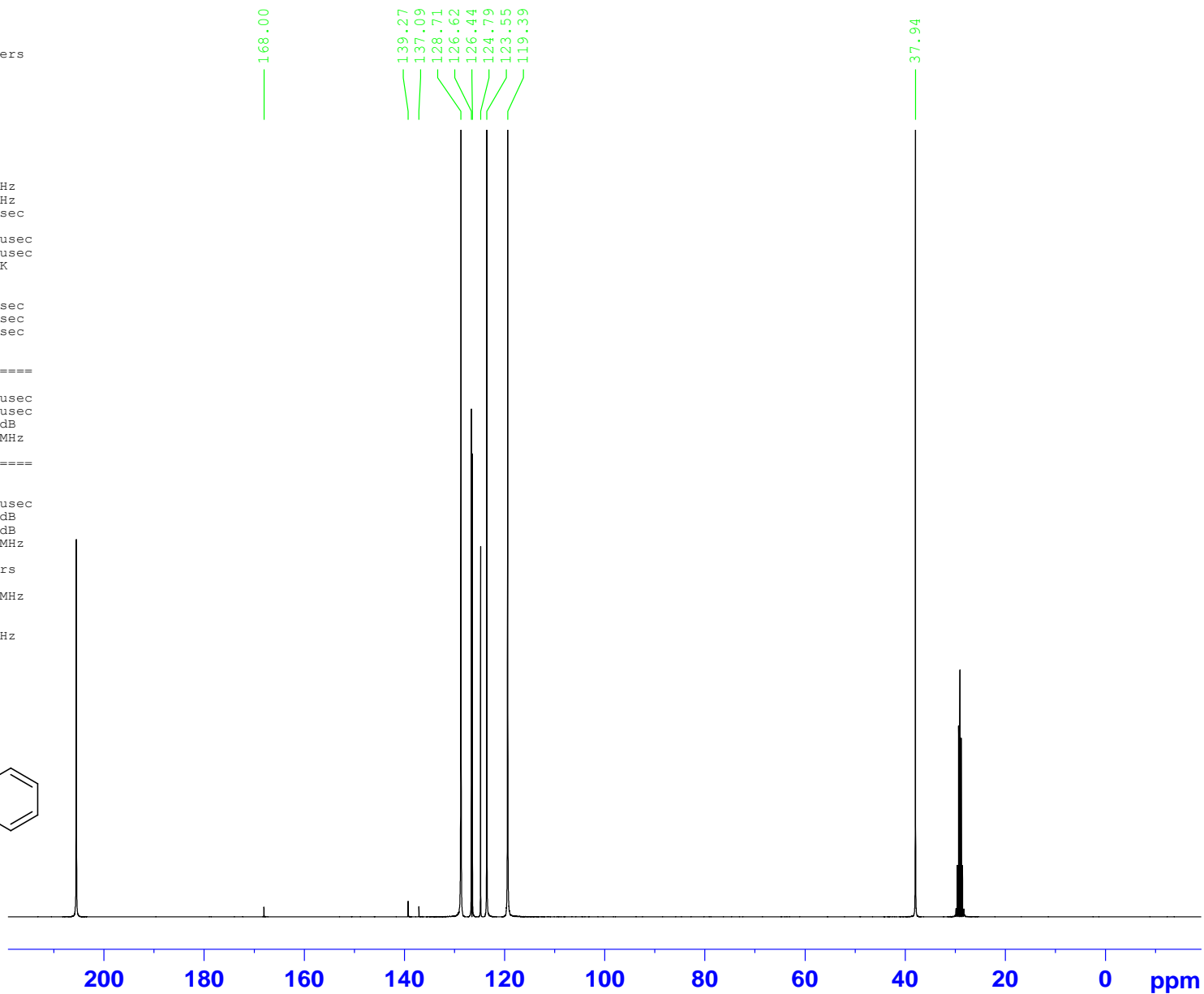
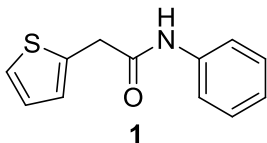
Current Data Parameters
NAME EZ-561-145
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140826
Time_ 14.45
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 1496
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.0000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TDO 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
F1 14.50 usec
p2 29.00 usec
FL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

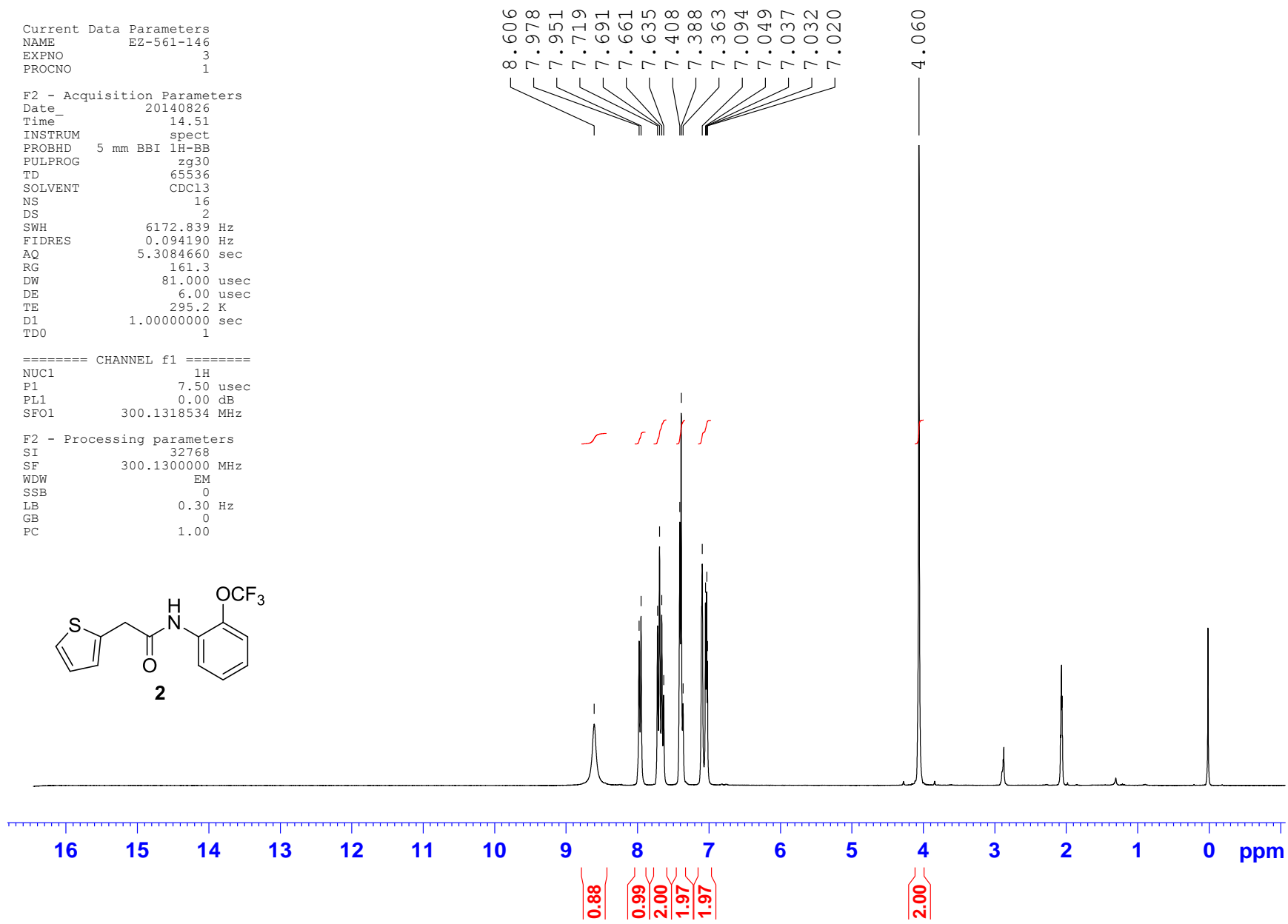
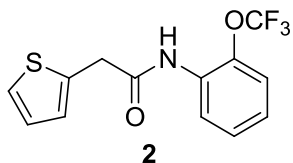


Current Data Parameters
NAME EZ-561-146
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140826
Time_ 14.51
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 161.3
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SF01 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



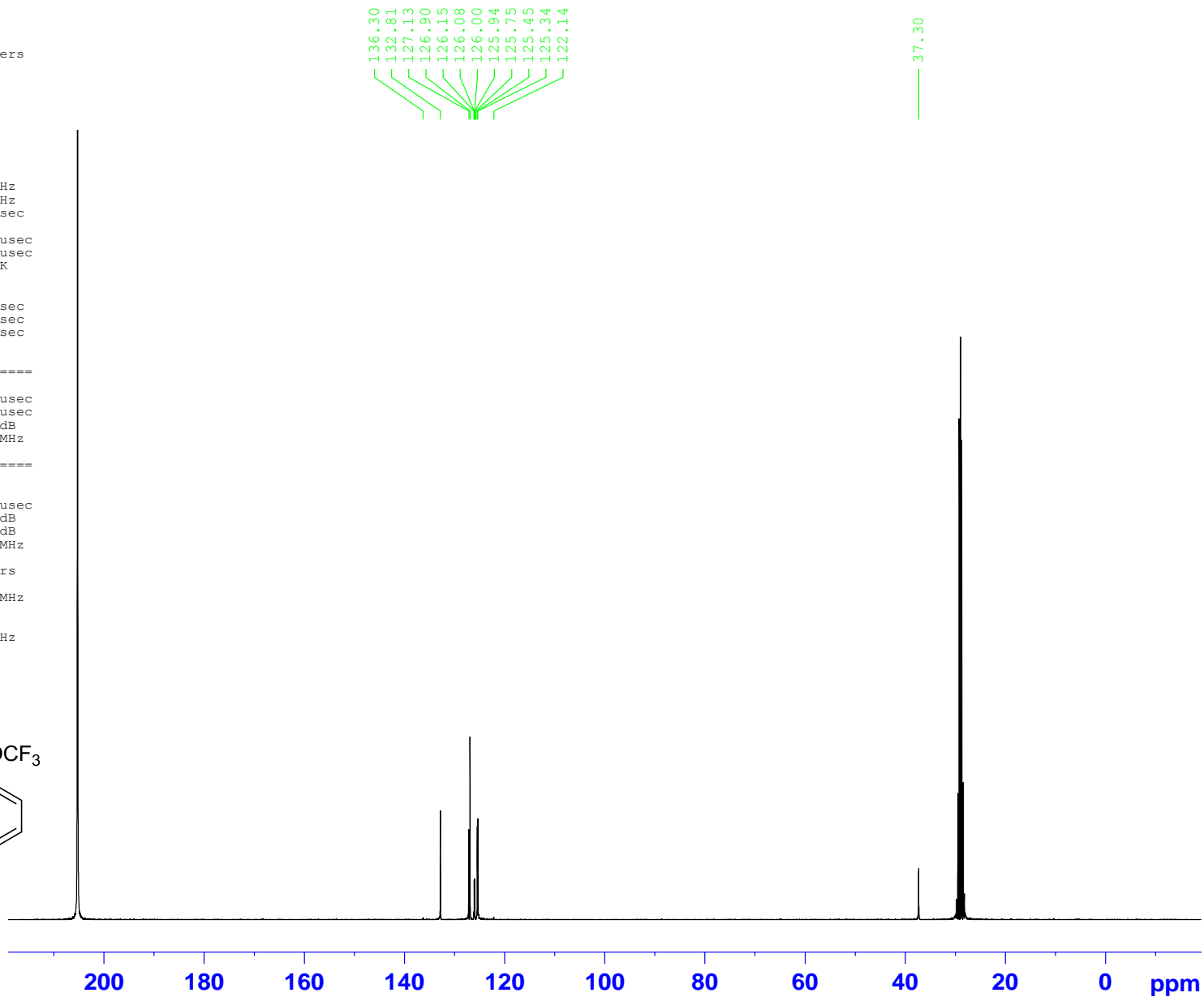
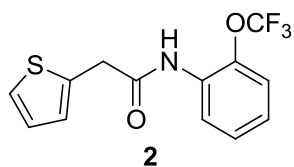
Current Data Parameters
NAME EZ-561-146
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140826
Time_ 16.16
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 1308
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.0000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

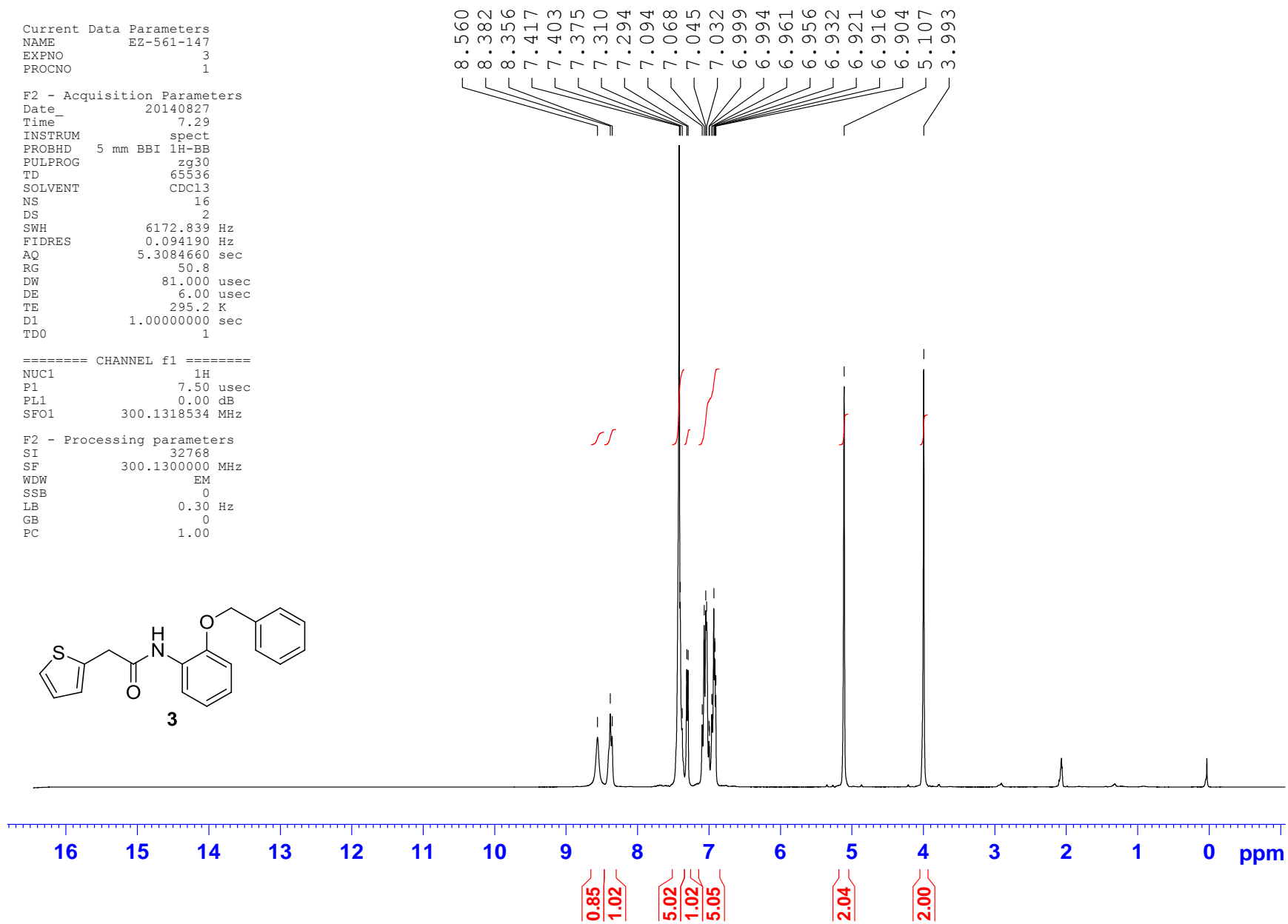
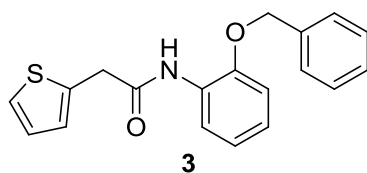


Current Data Parameters
NAME EZ-561-147
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140827
Time_ 7.29
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 50.8
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



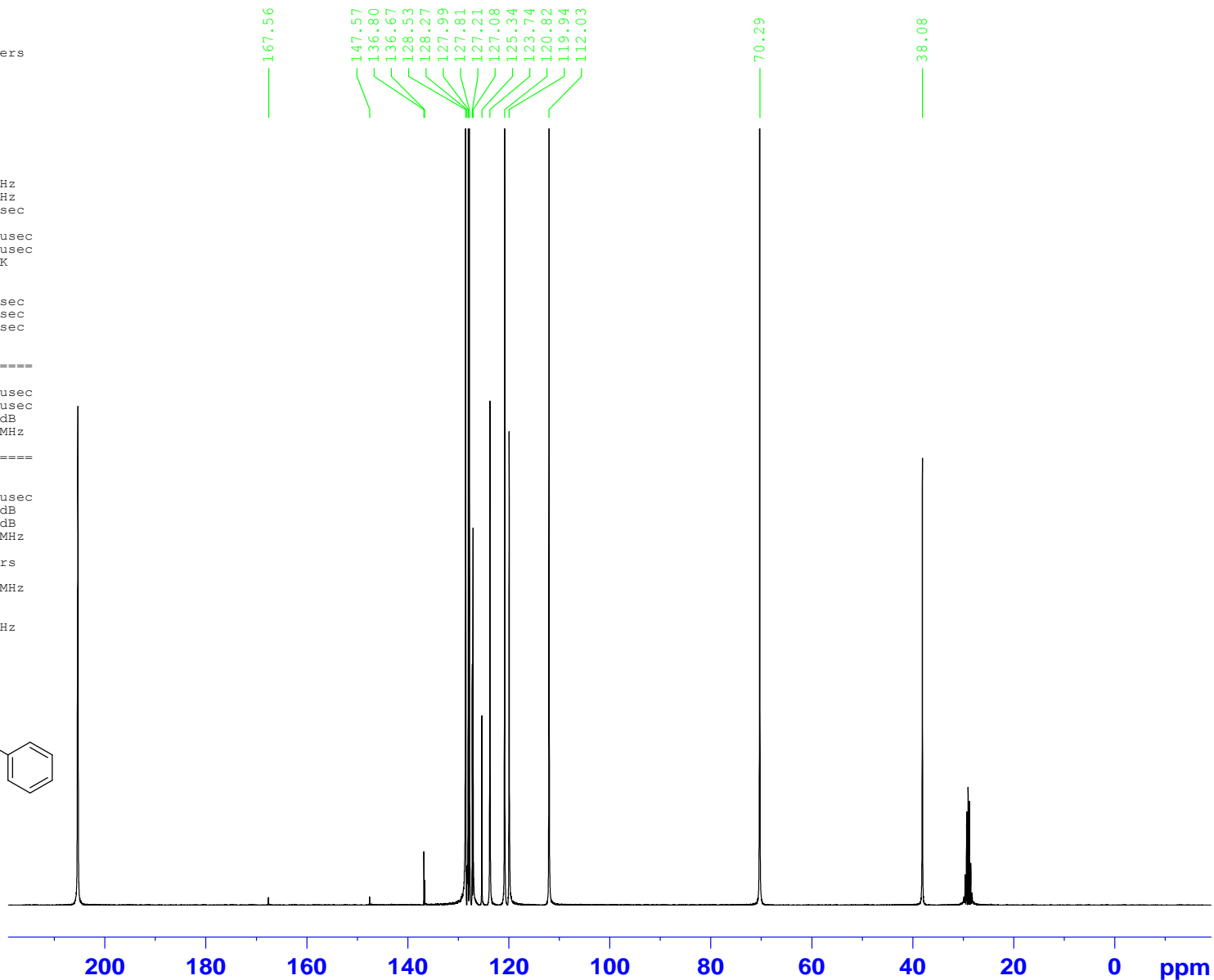
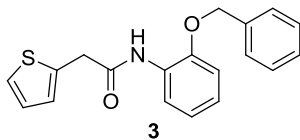
Current Data Parameters
NAME EZ-561-147
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140827
Time_ 9.32
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 1883
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TD0 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

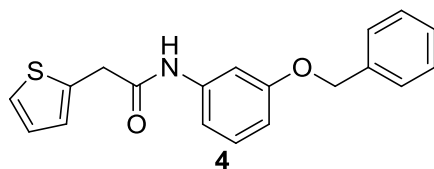


Current Data Parameters
NAME EZ-561-148
EXPNO 3
PROCNO 1

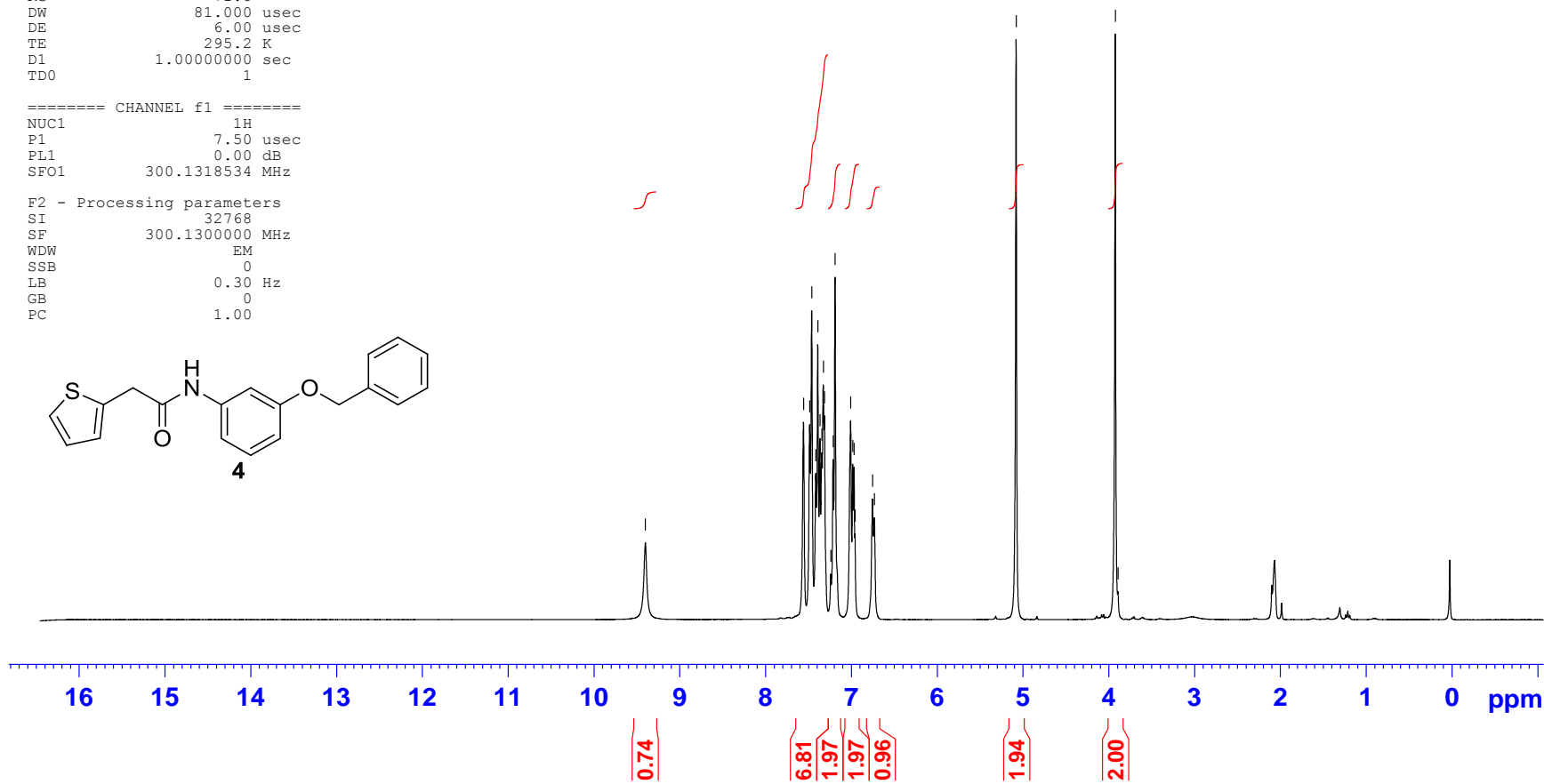
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140827
Time_ 9.37
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 71.8
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



9.400
7.558
7.485
7.462
7.414
7.391
7.367
7.345
7.327
7.314
7.240
7.214
7.190
7.009
6.984
6.968
6.957
6.754
6.731
5.079
3.924
3.892



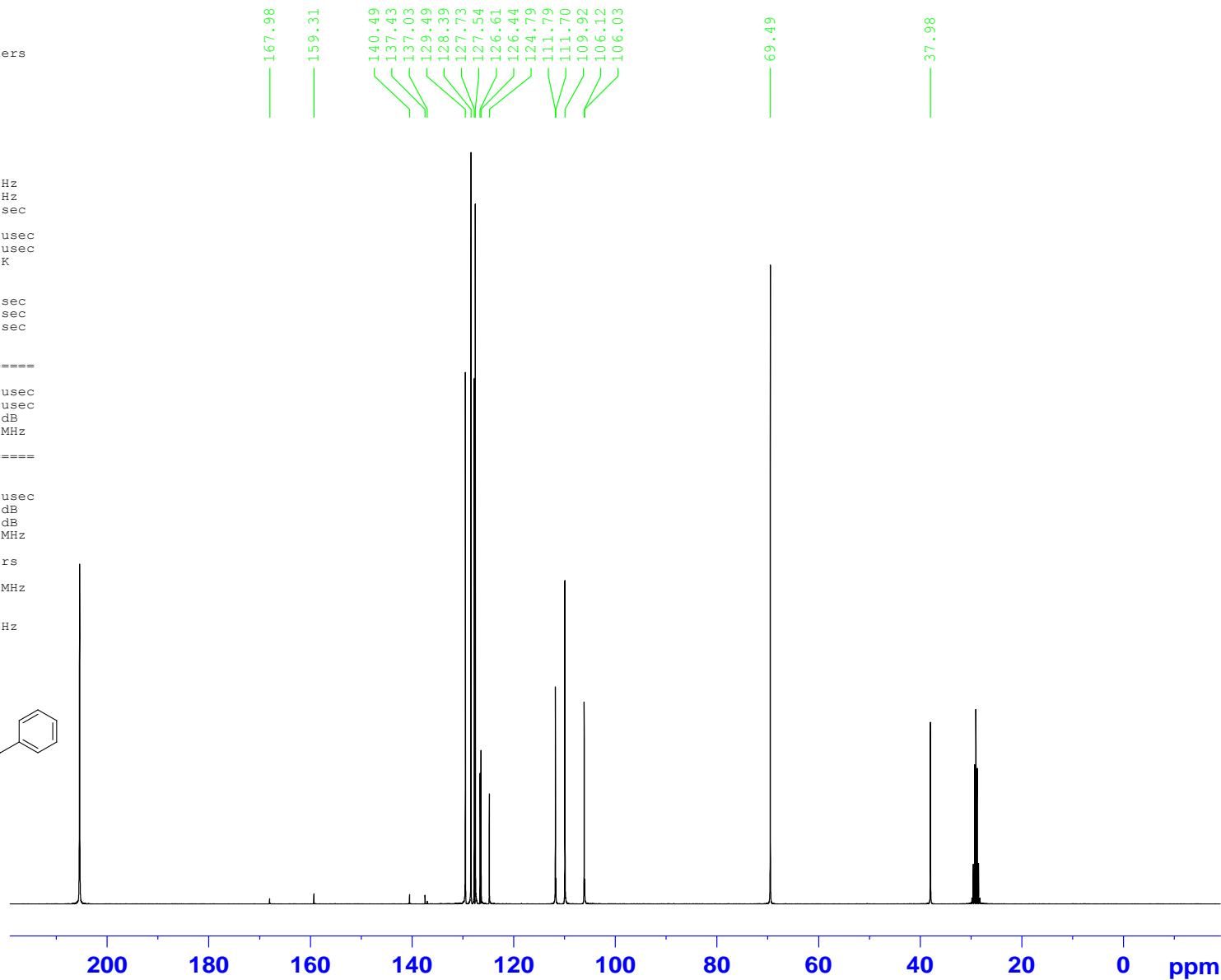
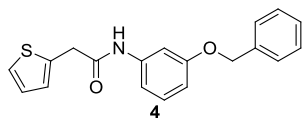
Current Data Parameters
NAME EZ-561-148
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140827
Time 10.25
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 715
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TDO 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

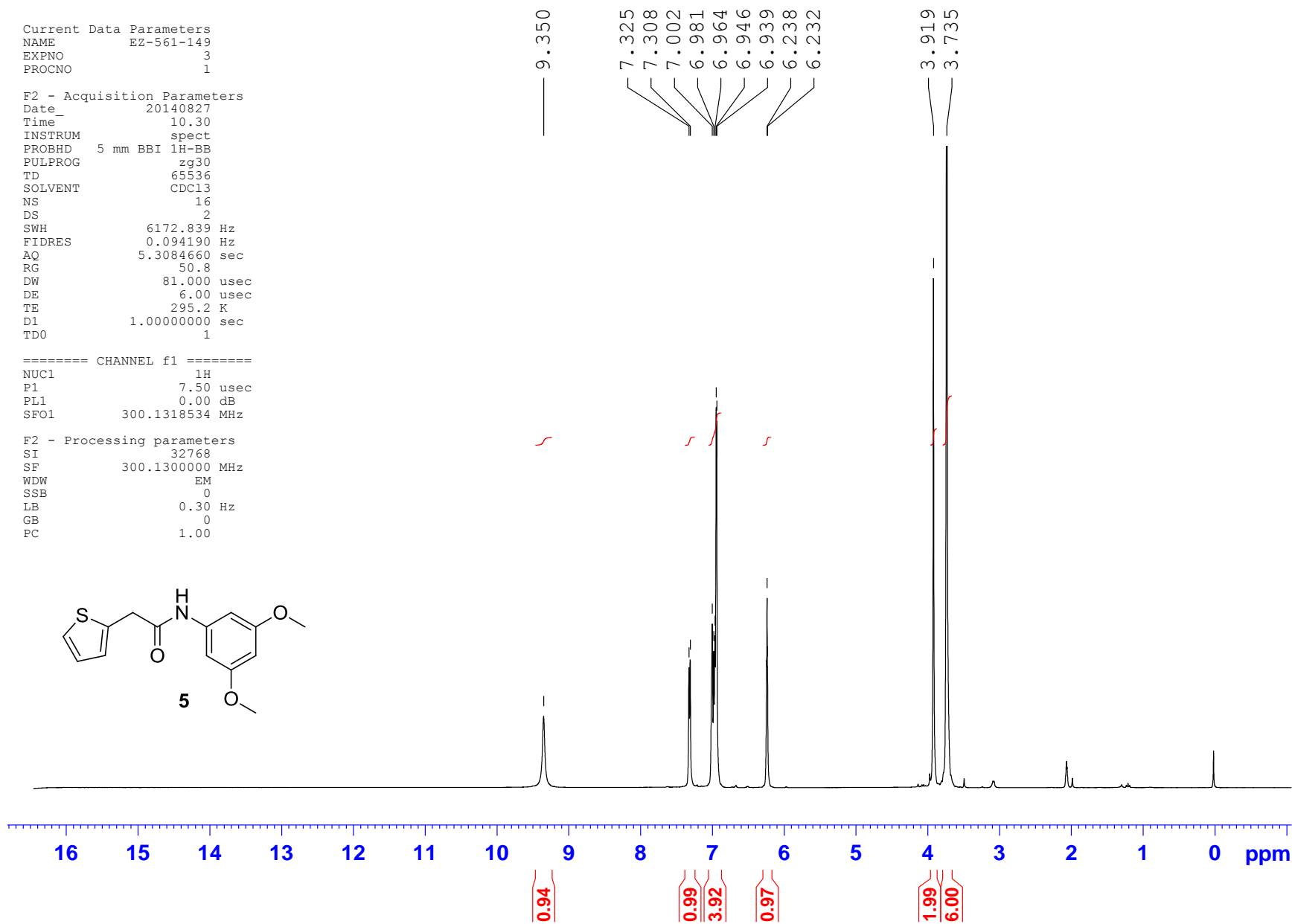
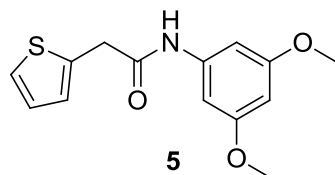


Current Data Parameters
NAME EZ-561-149
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140827
Time_ 10.30
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 50.8
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



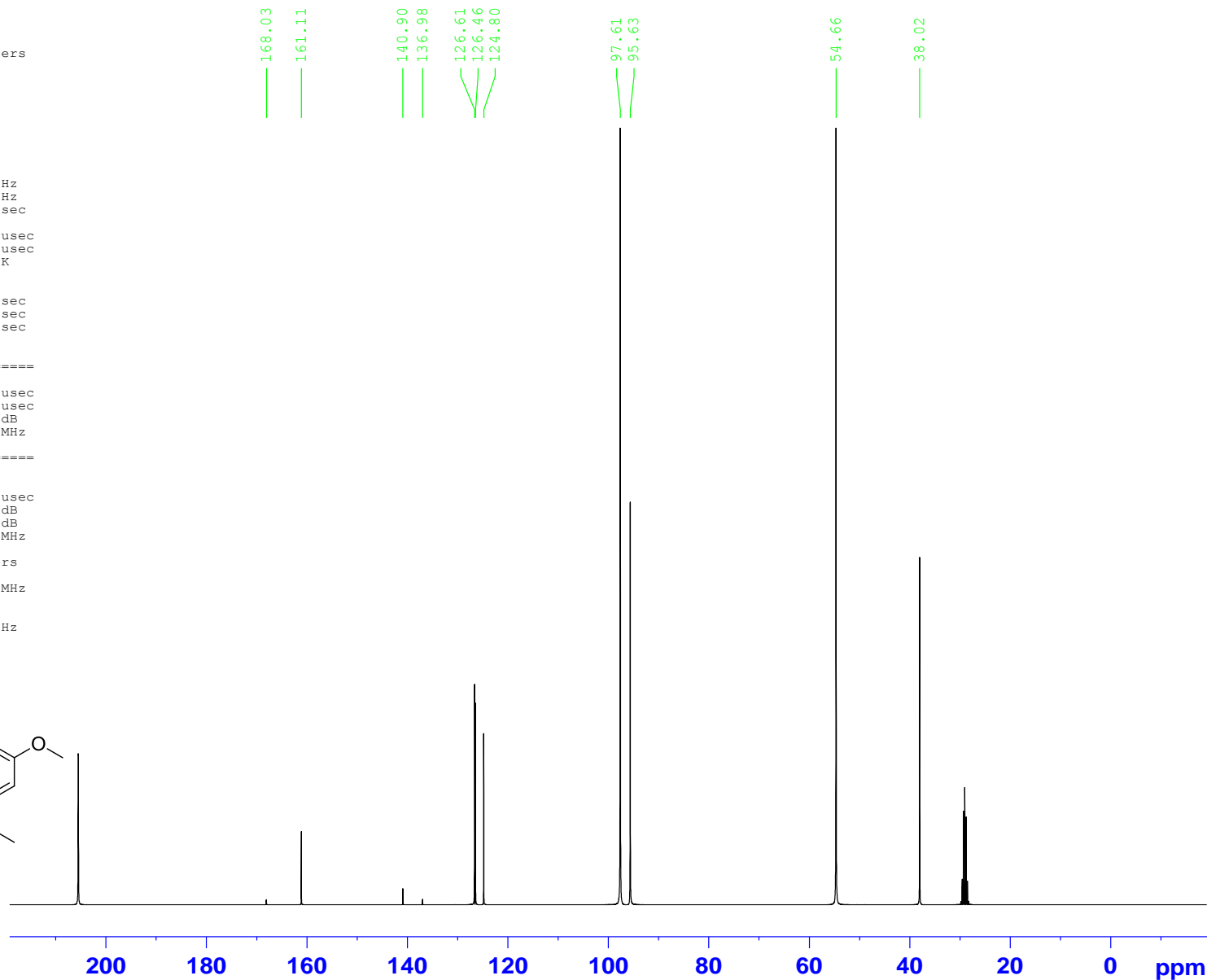
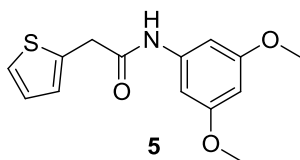
Current Data Parameters
NAME EZ-561-149
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140827
Time 12.06
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 1481
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.0000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TDO 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

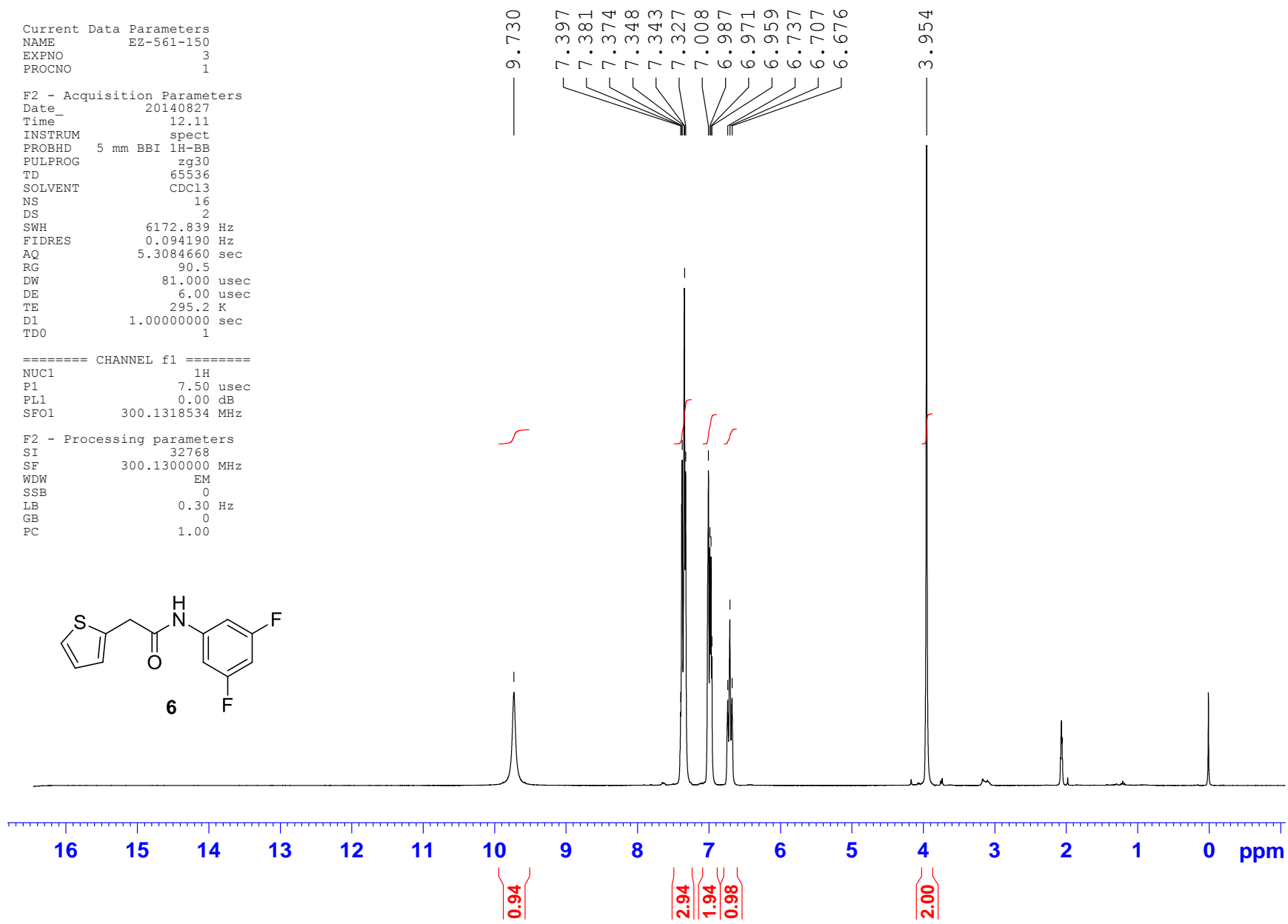
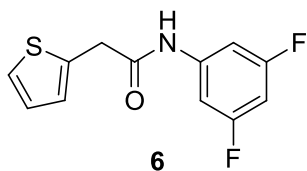


Current Data Parameters
NAME EZ-561-150
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140827
Time_ 12.11
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 90.5
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



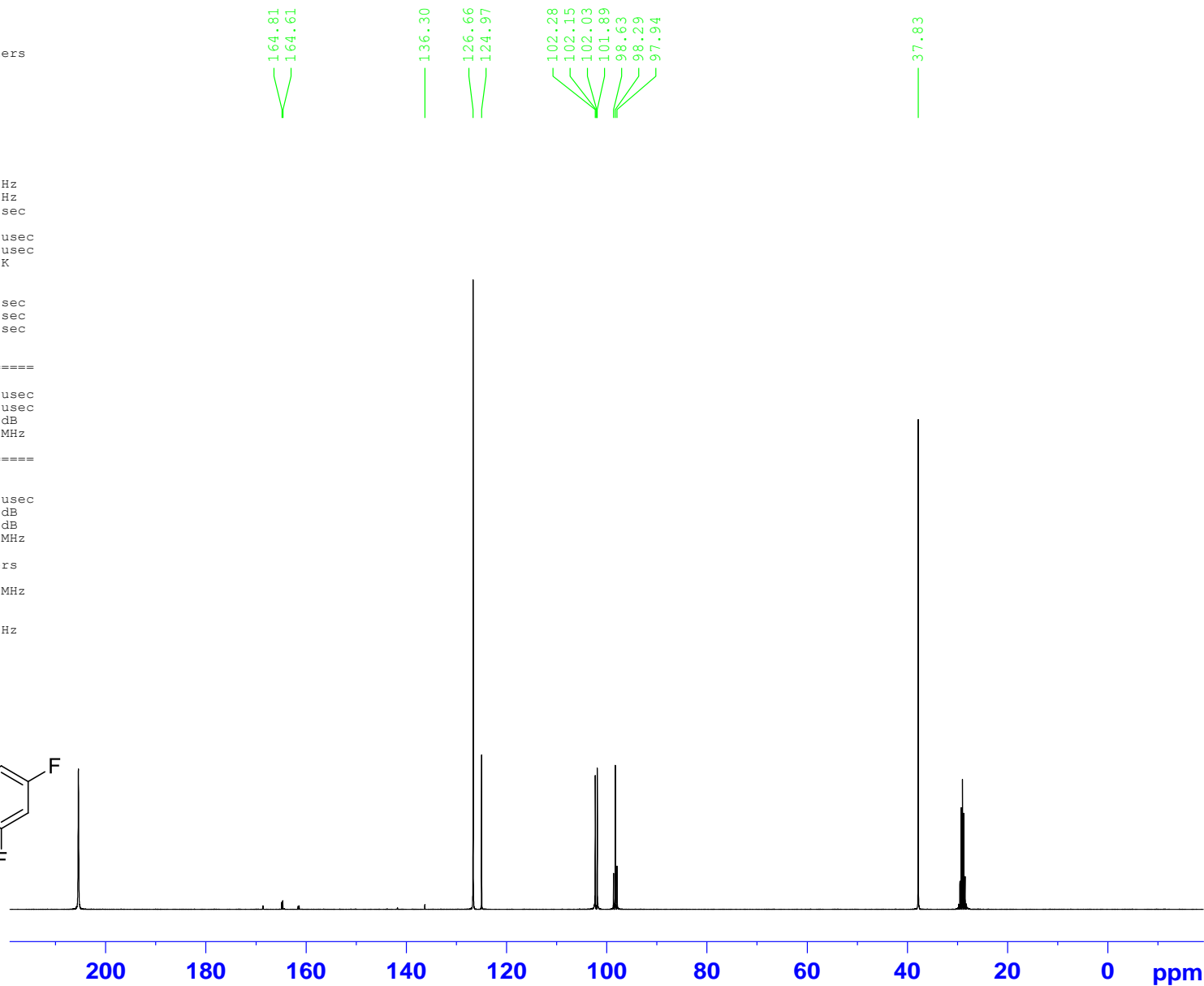
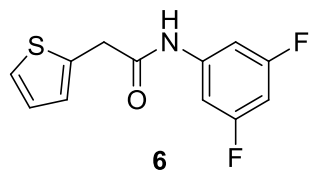
Current Data Parameters
NAME EZ-561-150
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140827
Time_ 14.27
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 524
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 11585.2
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

==== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

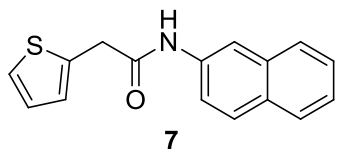


Current Data Parameters
NAME EZ-561-151
EXPNO 3
PROCNO 1

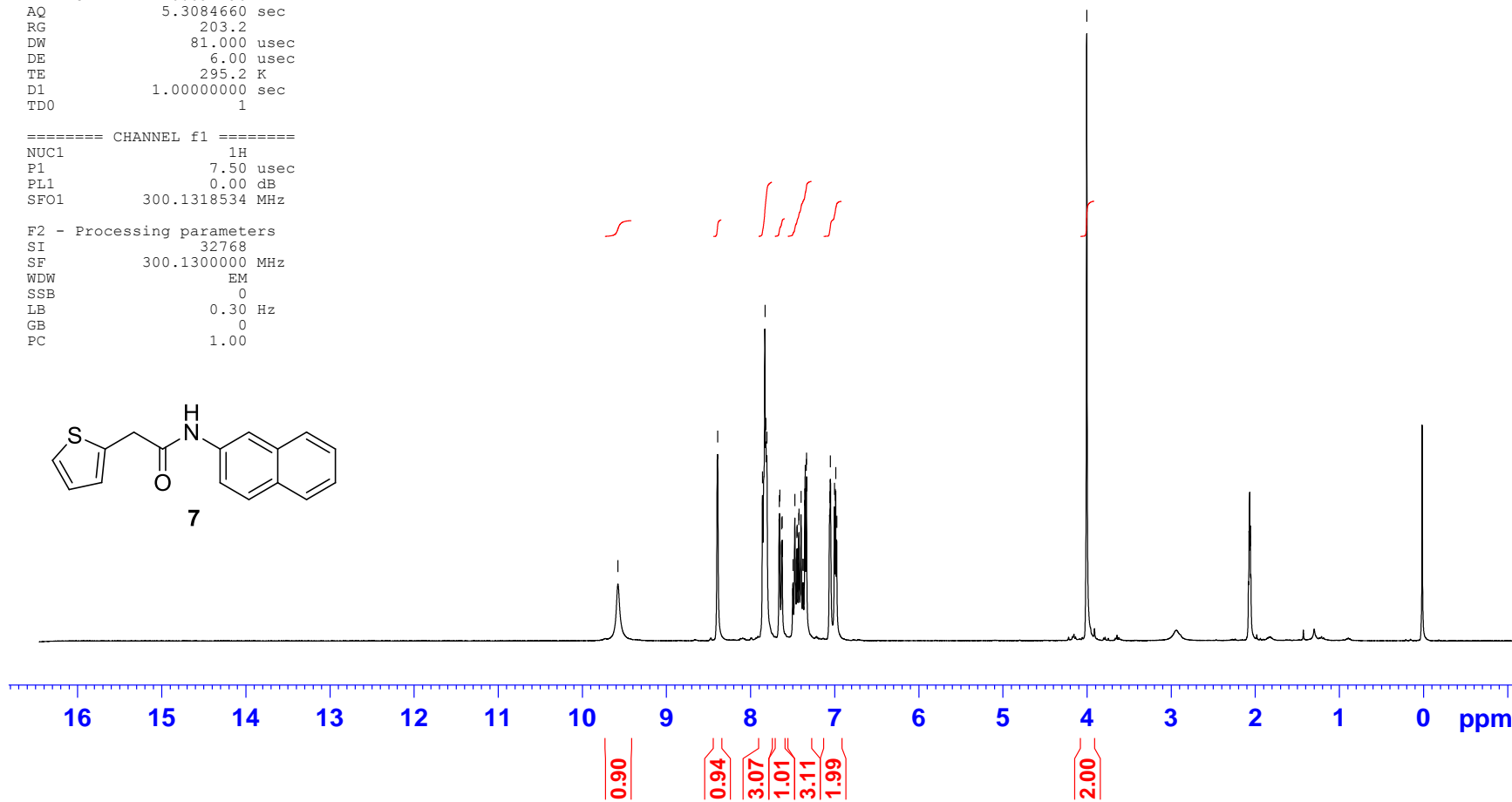
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140827
Time_ 14.33
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 203.2
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



9.577
8.392
7.858
7.830
7.819
7.807
7.660
7.654
7.631
7.624
7.495
7.473
7.449
7.446
7.427
7.424
7.400
7.378
7.374
7.355
7.352
7.338
7.335
7.059
7.051
7.004
6.992
6.987
6.976
4.002



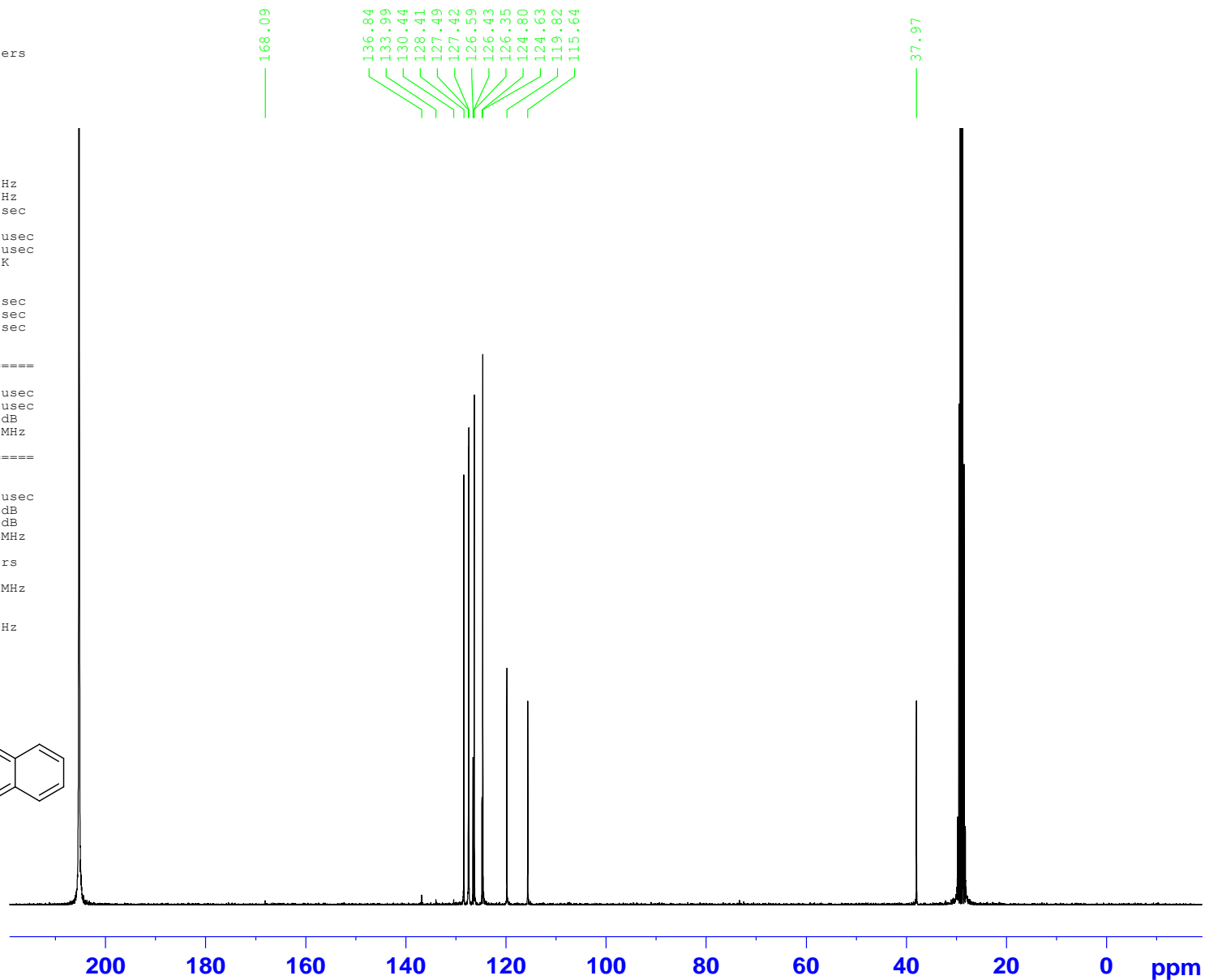
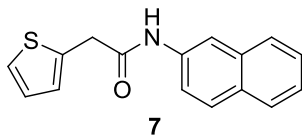
Current Data Parameters
NAME EZ-561-151
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140827
Time_ 15.43
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 1048
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.000000
CNST11 1.000000
D1 2.0000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TD0 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

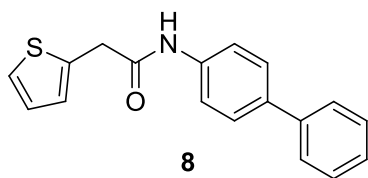


Current Data Parameters
NAME EZ-561-152
EXPNO 3
PROCNO 1

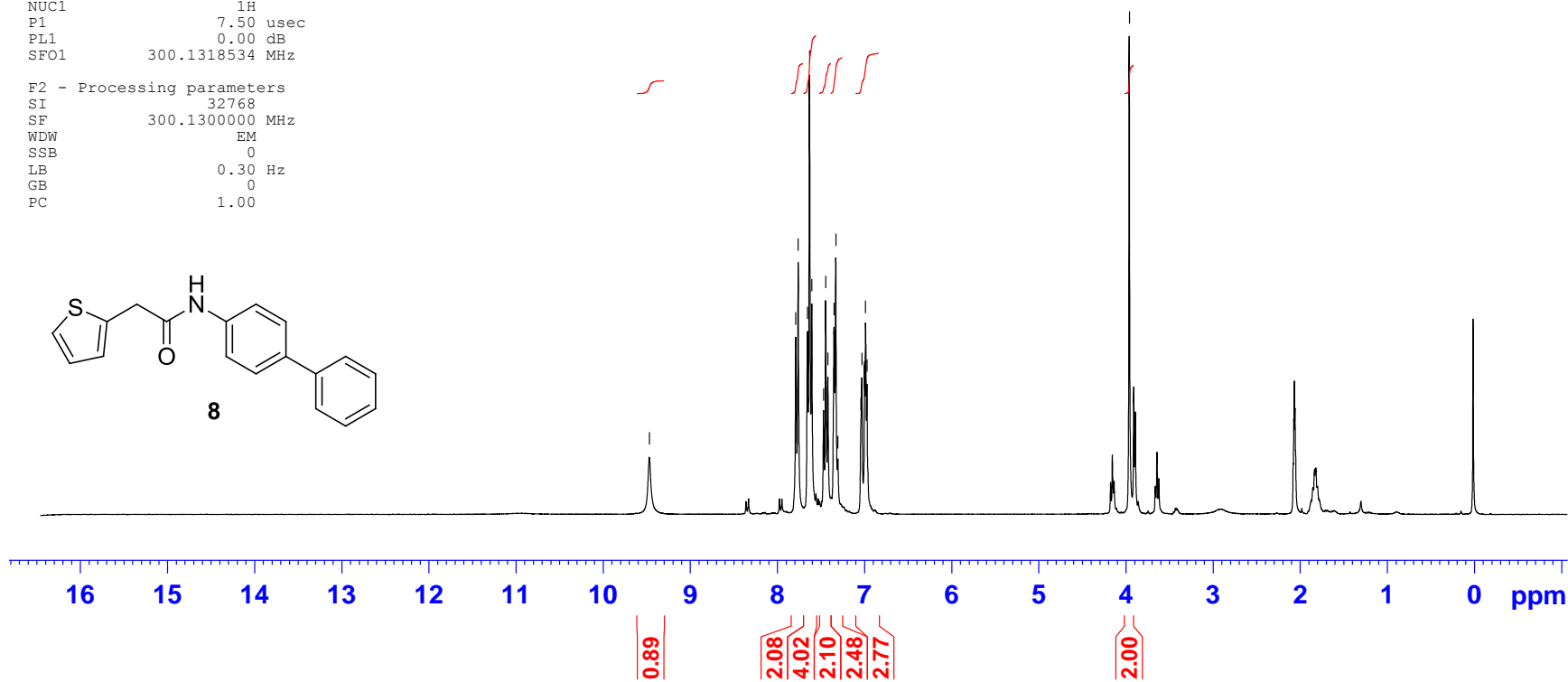
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140828
Time_ 7.28
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 161.3
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



9.470
7.791
7.763
7.655
7.633
7.605
7.472
7.447
7.421
7.350
7.330
7.308
7.042
7.032
7.002
6.989
6.972
3.961



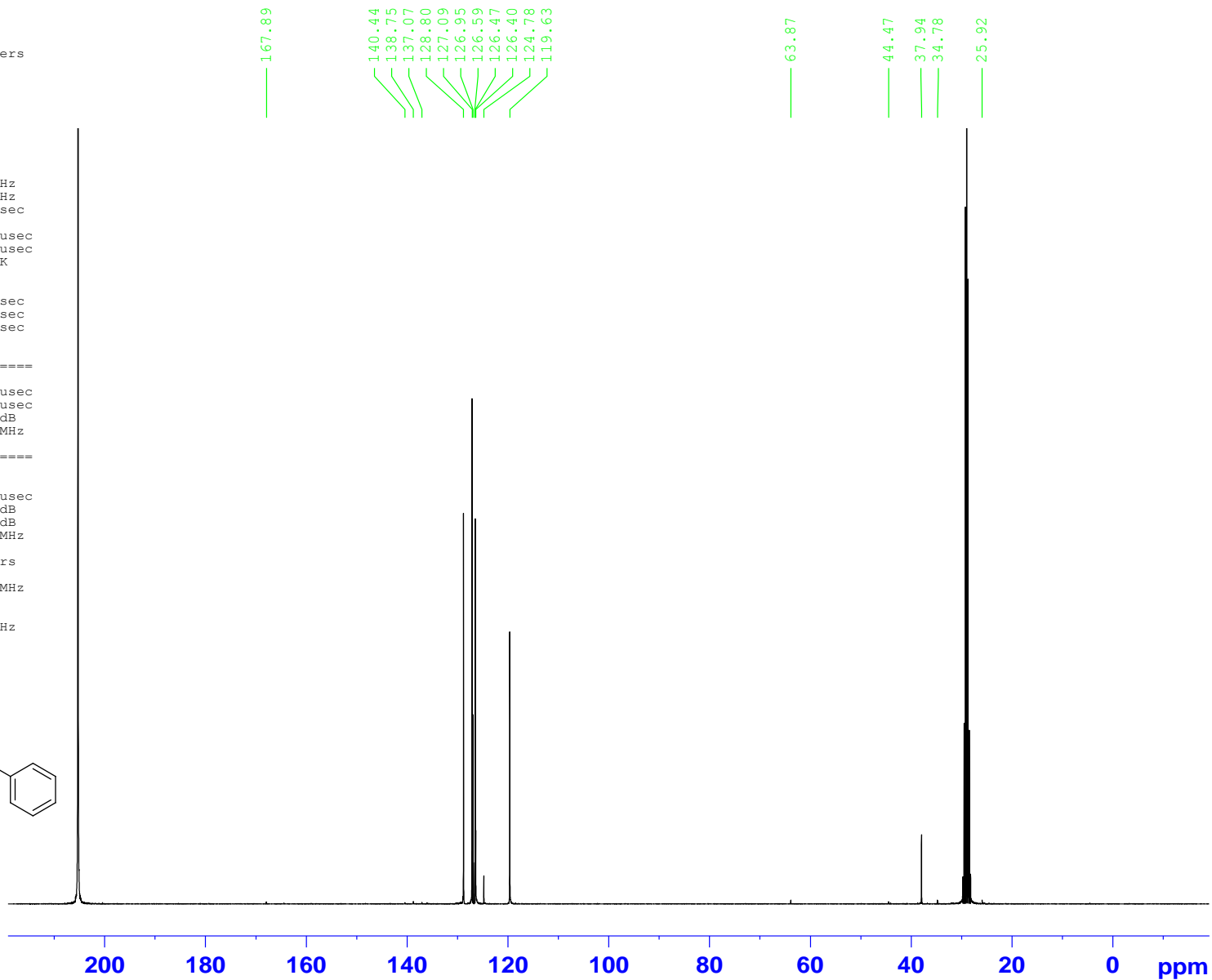
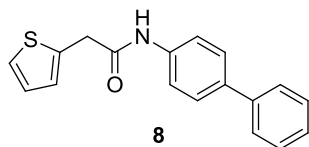
Current Data Parameters
NAME EZ-561-152
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140828
Time_ 8.46
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 1191
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TD0 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

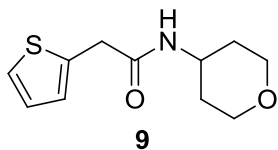


Current Data Parameters
 NAME EZ-561-155
 EXPNO 3
 PROCNO 1

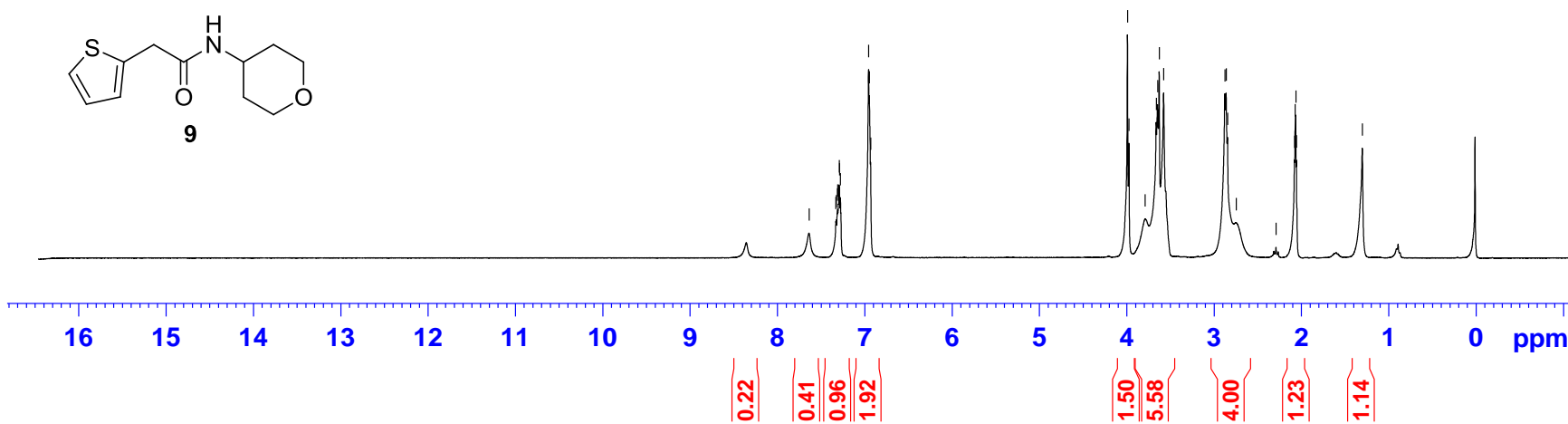
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140826
 Time_ 16.22
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT CDC13
 NS 16
 DS 2
 SWH 6172.839 Hz
 FIDRES 0.094190 Hz
 AQ 5.3084660 sec
 RG 228.1
 DW 81.000 usec
 DE 6.00 usec
 TE 295.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 7.50 usec
 PL1 0.00 dB
 SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00



7.638
 7.331
 7.326
 7.315
 7.310
 7.293
 7.288
 7.279
 6.955
 6.947
 6.933
 3.991
 3.975
 3.790
 3.662
 3.647
 3.628
 3.577
 2.876
 2.861
 2.846
 2.748
 2.289
 2.078
 2.071
 2.064
 2.057
 1.302



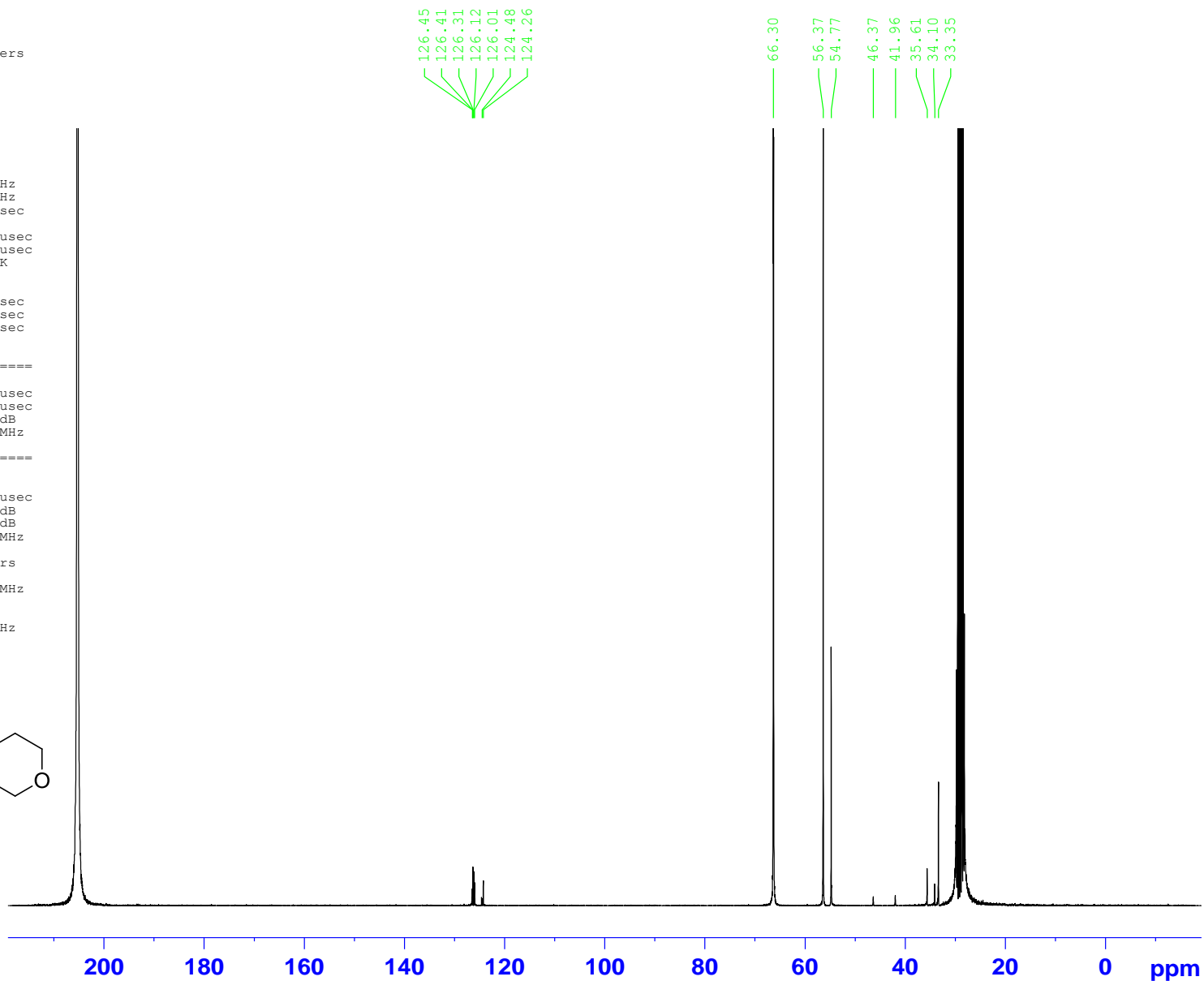
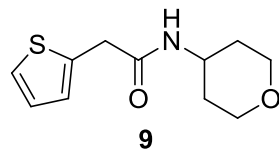
Current Data Parameters
NAME EZ-561-155
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140827
Time_ 7.22
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 13923
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TD0 1

=====
CHANNEL f1
=====
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
=====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

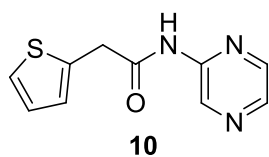


Current Data Parameters
NAME EZ-561-156
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140828
Time_ 16.05
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 362
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



9.866
9.469
8.347
8.339
8.321
8.316
8.308
7.379
7.376
7.362
7.359
7.089
7.085
7.081
7.077
7.017
7.005
7.000
6.989

4.131

2.877

Integration values: 0.89, 0.95, 1.93, 1.05, 0.97, 1.12, 2.00, 1.80

16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0 ppm

Integration values: 0.89, 0.95, 1.93, 1.05, 0.97, 1.12, 2.00, 1.80

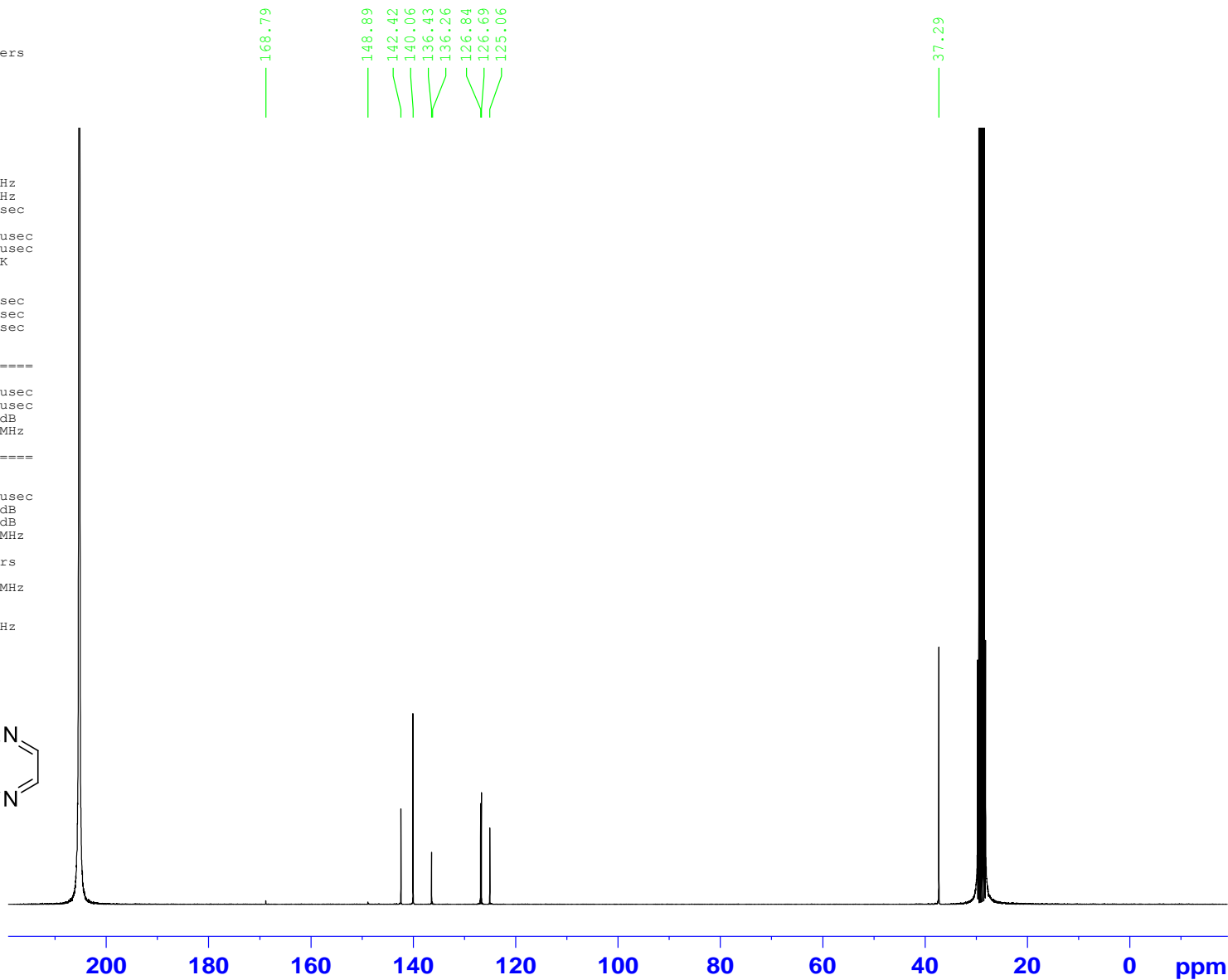
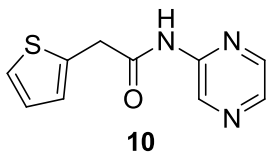
Current Data Parameters
NAME EZ-561-156
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140829
Time 7.34
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 14383
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.0000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TD0 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

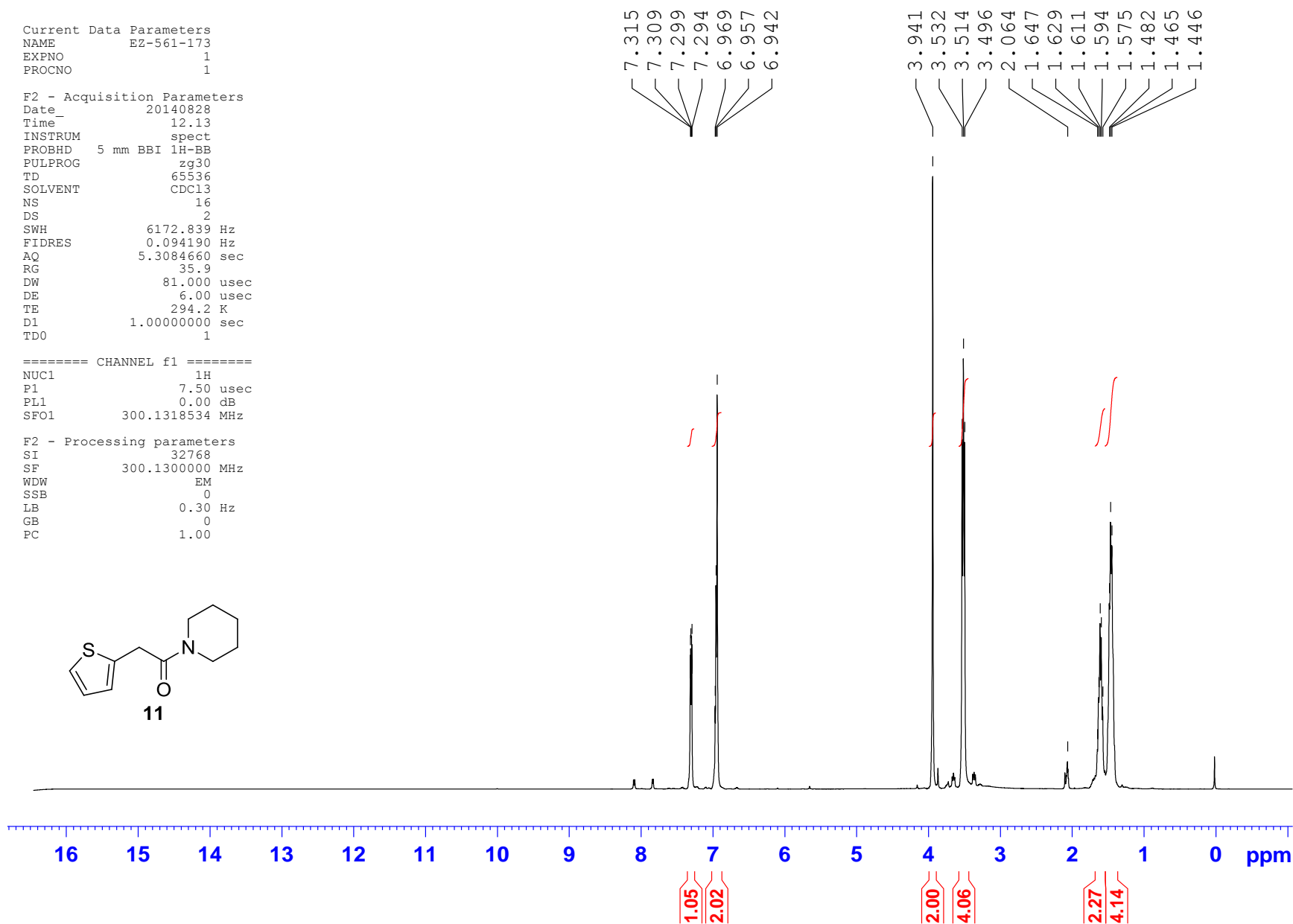
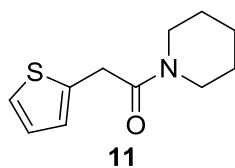


Current Data Parameters
NAME EZ-561-173
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140828
Time_ 12.13
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 35.9
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 294.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



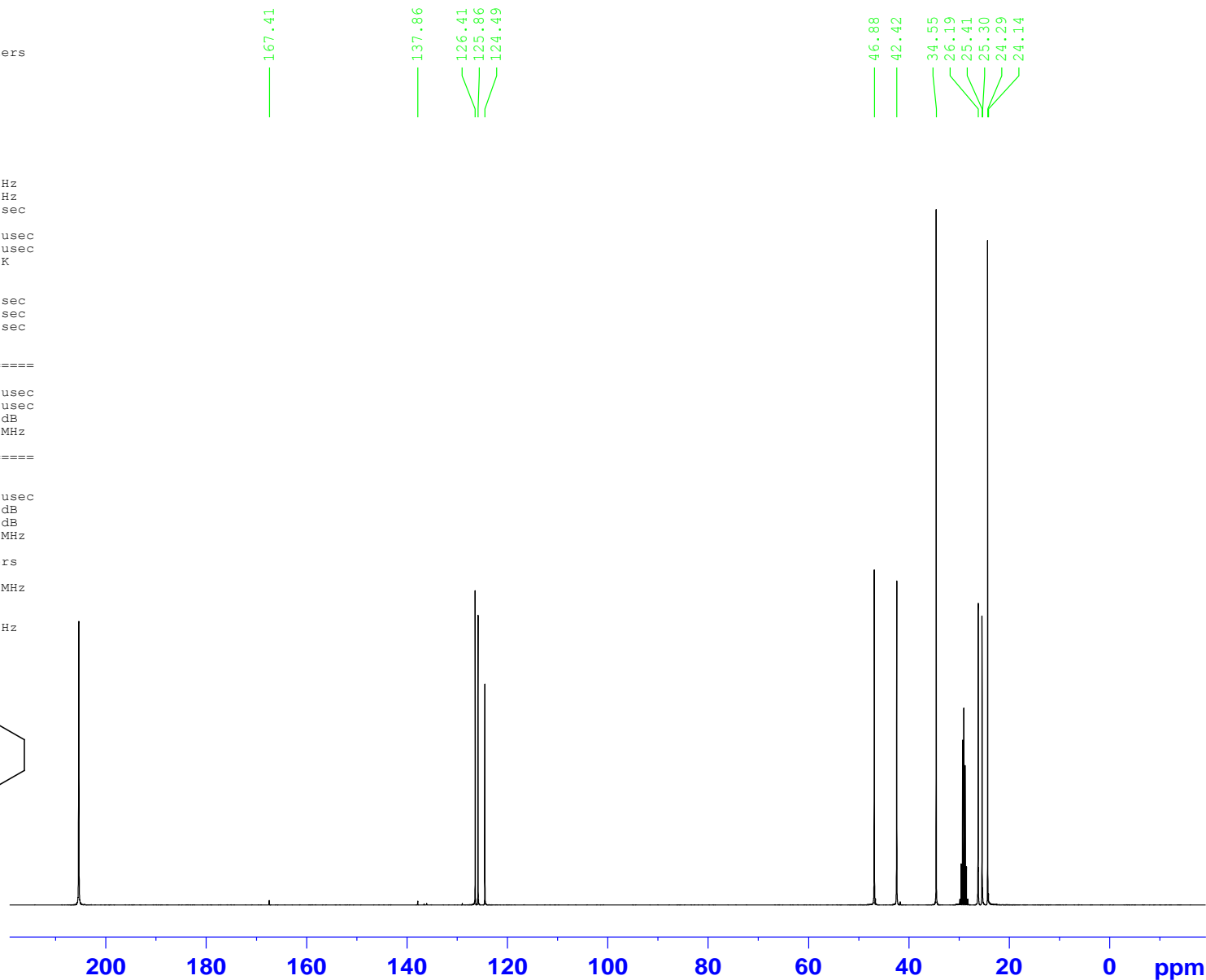
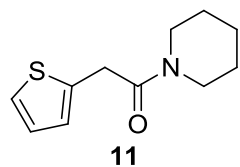
Current Data Parameters
NAME EZ-561-173
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140828
Time_ 12.52
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 562
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.000 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TDO 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

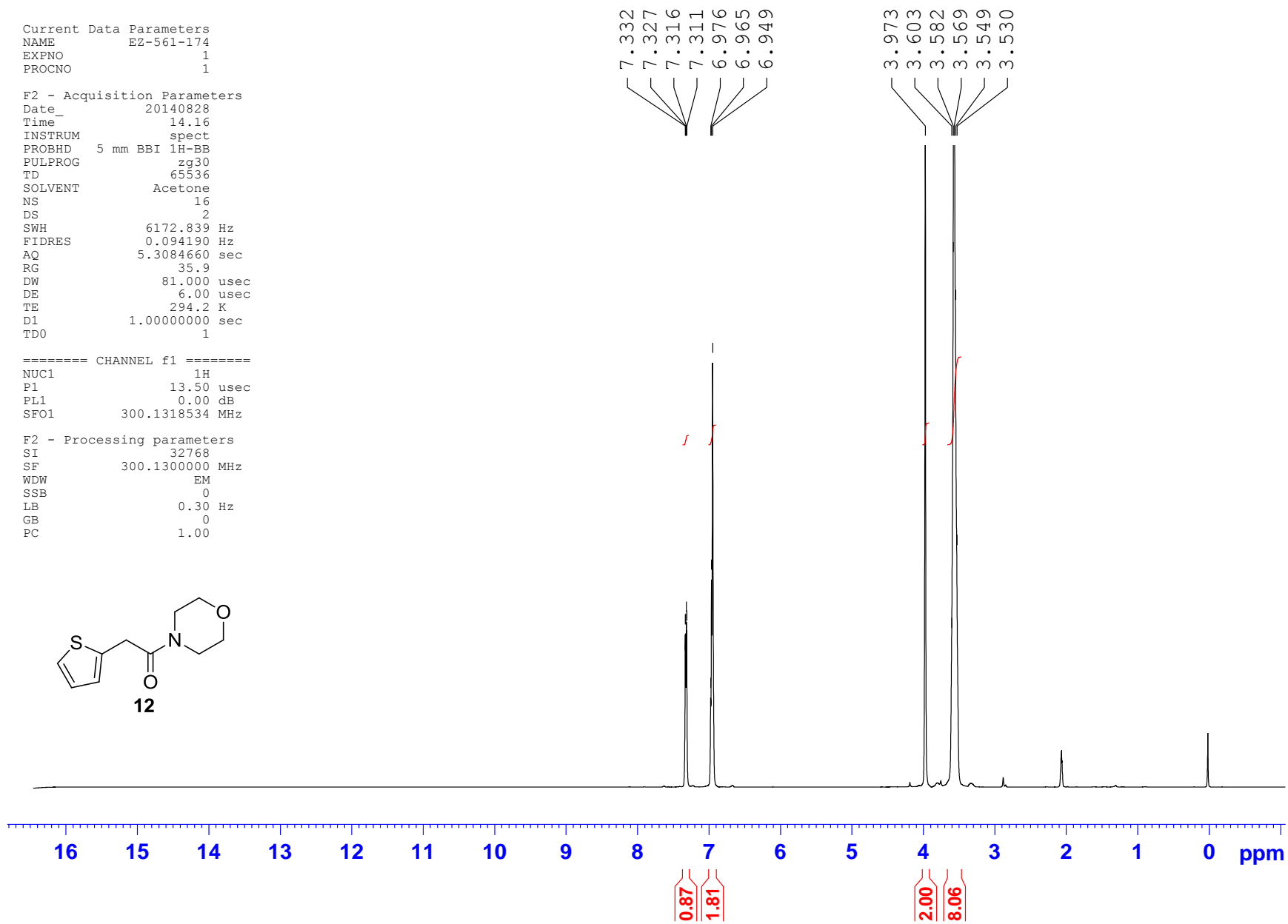
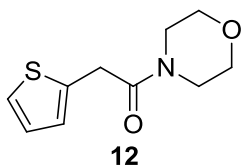


Current Data Parameters
NAME EZ-561-174
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140828
Time_ 14.16
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT Acetone
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 35.9
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 294.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 13.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



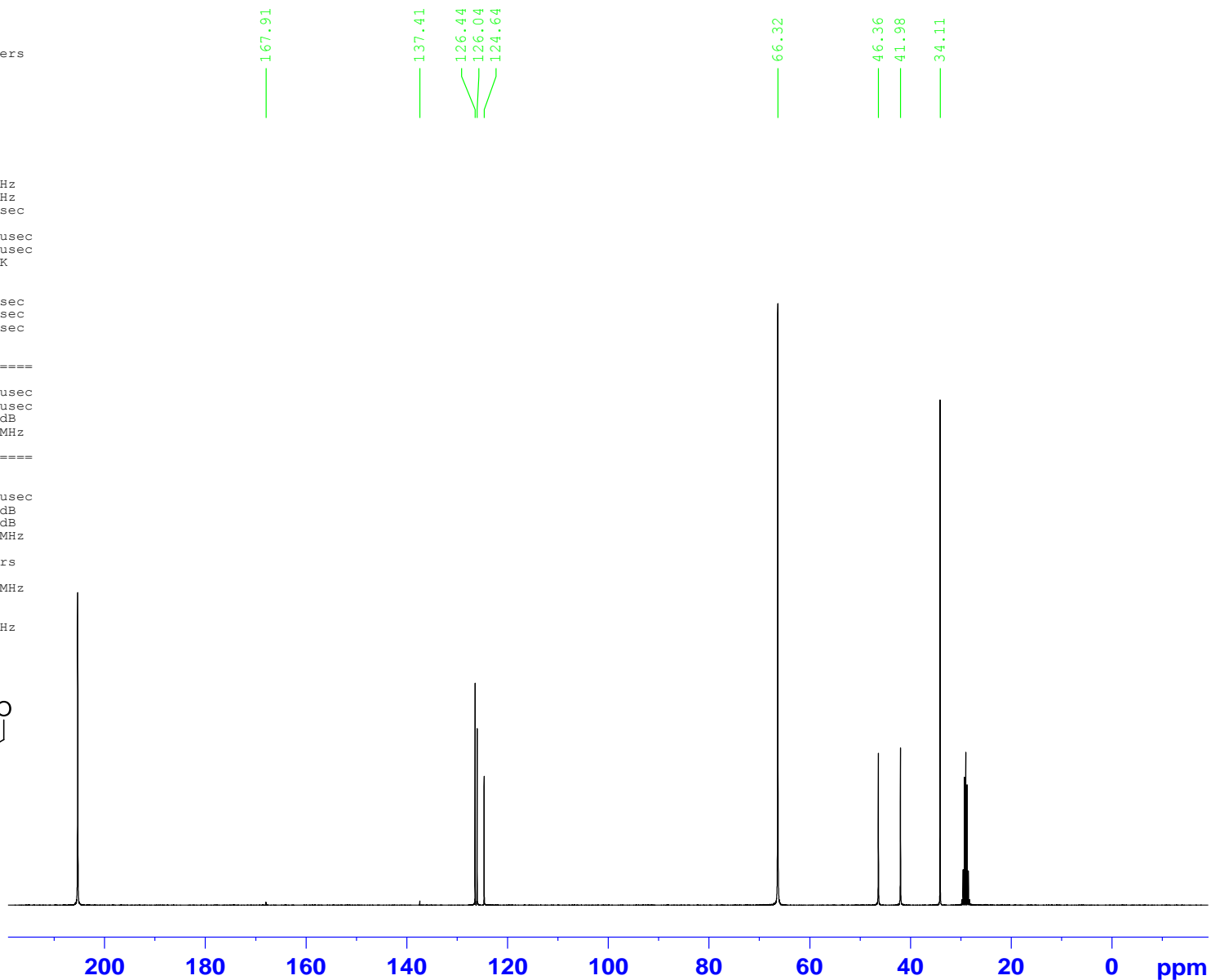
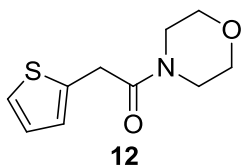
Current Data Parameters
NAME EZ-561-174
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140828
Time 14.58
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 440
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.0000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TD0 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

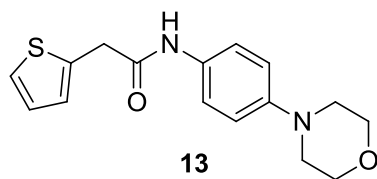


Current Data Parameters
NAME EZ-561-175
EXPNO 1
PROCNO 1

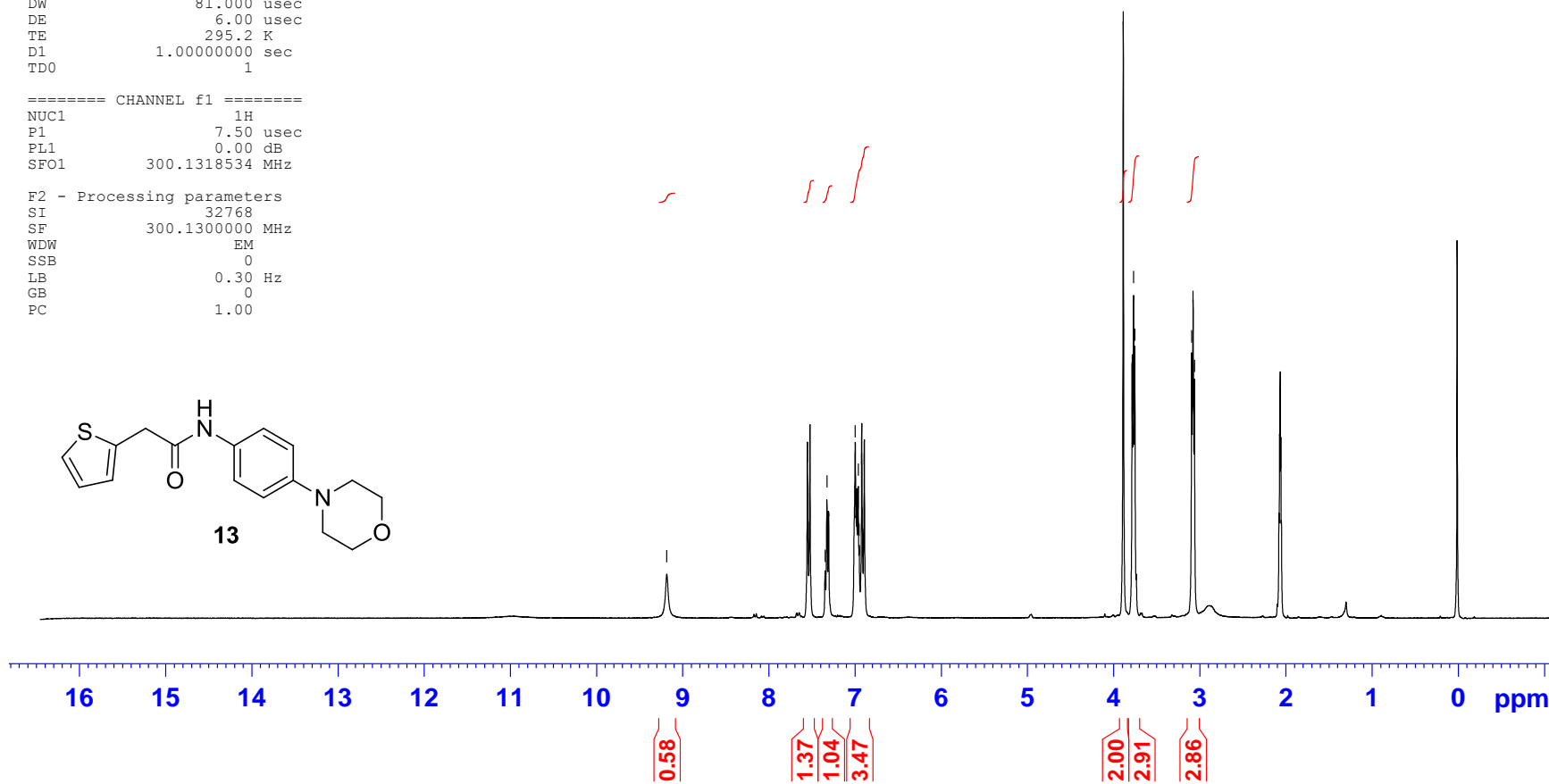
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140829
Time_ 8.16
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT Acetone
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 256
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



9.187
7.556
7.528
7.347
7.328
7.314
7.000
6.983
6.964
6.952
6.925
6.894
3.888
3.785
3.768
3.753
3.094
3.078
3.062



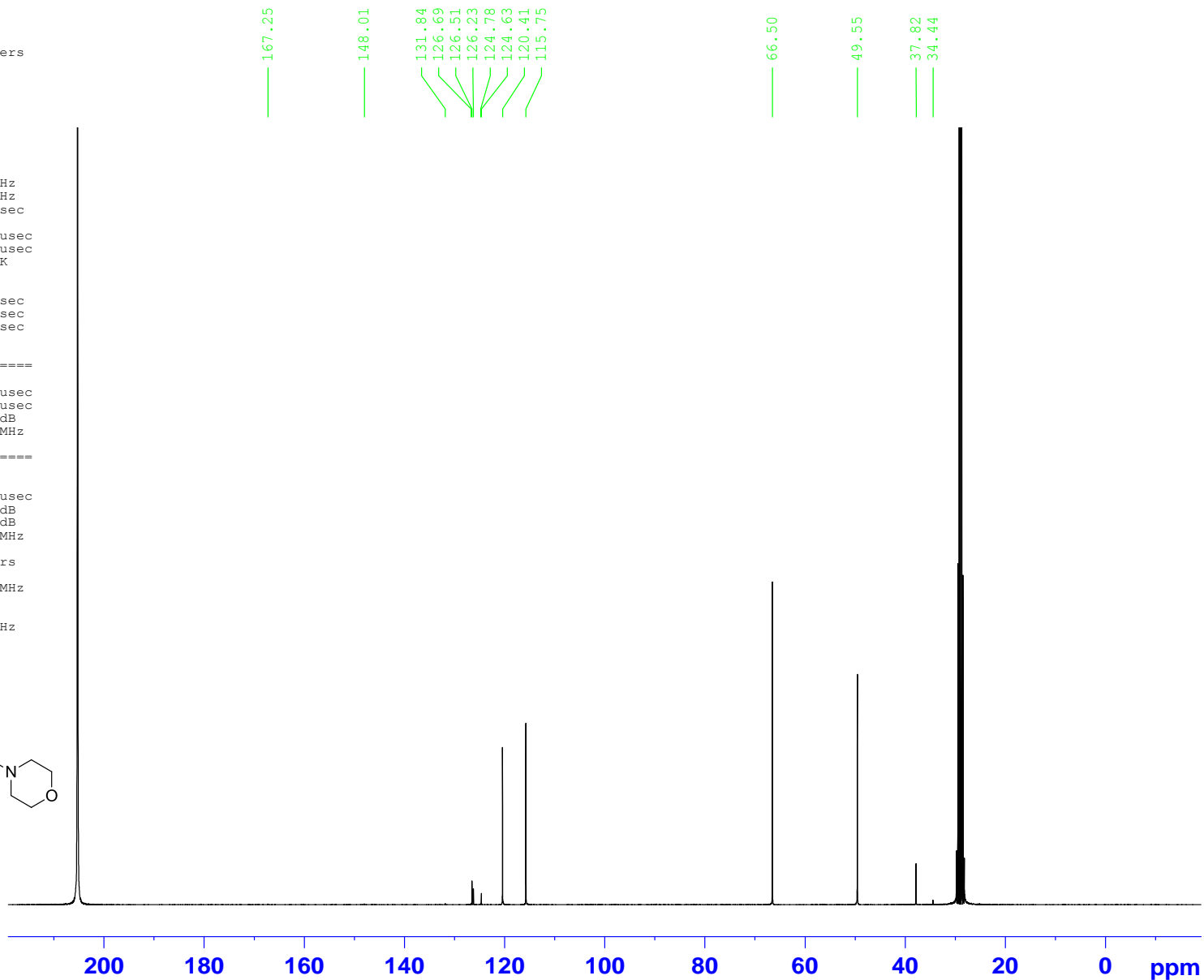
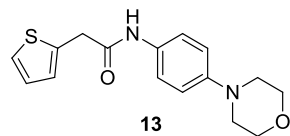
Current Data Parameters
NAME EZ-561-175
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140829
Time 11.41
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 3106
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 13004
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

==== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

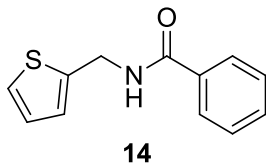


Current Data Parameters
NAME EZ-561-160
EXPNO 3
PROCNO 1

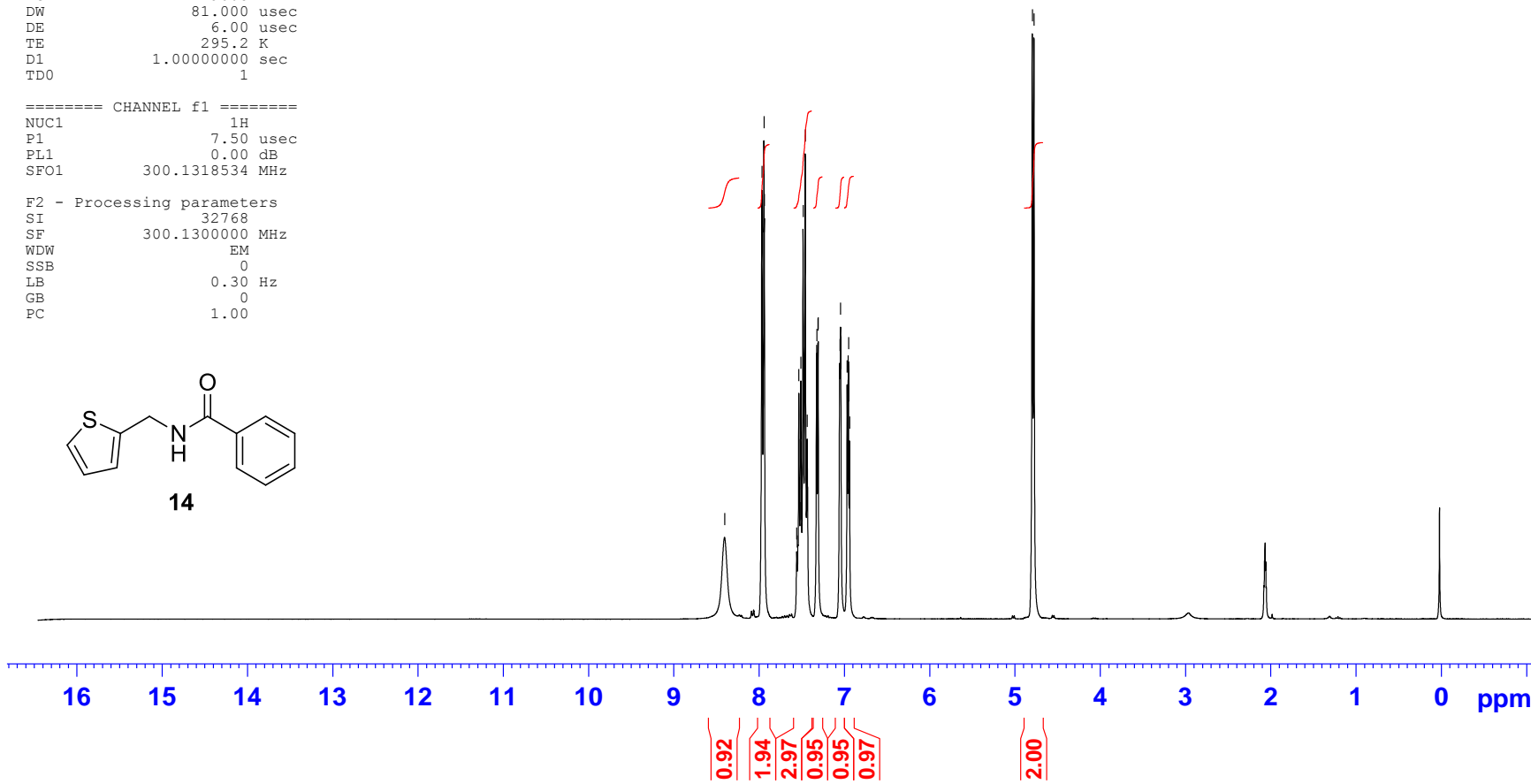
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140828
Time_ 8.53
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 90.5
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



8.405
7.967
7.943
7.939
7.559
7.555
7.534
7.527
7.515
7.511
7.484
7.459
7.436
7.327
7.324
7.311
7.307
7.053
7.045
6.968
6.956
6.951
6.939
4.796
4.776



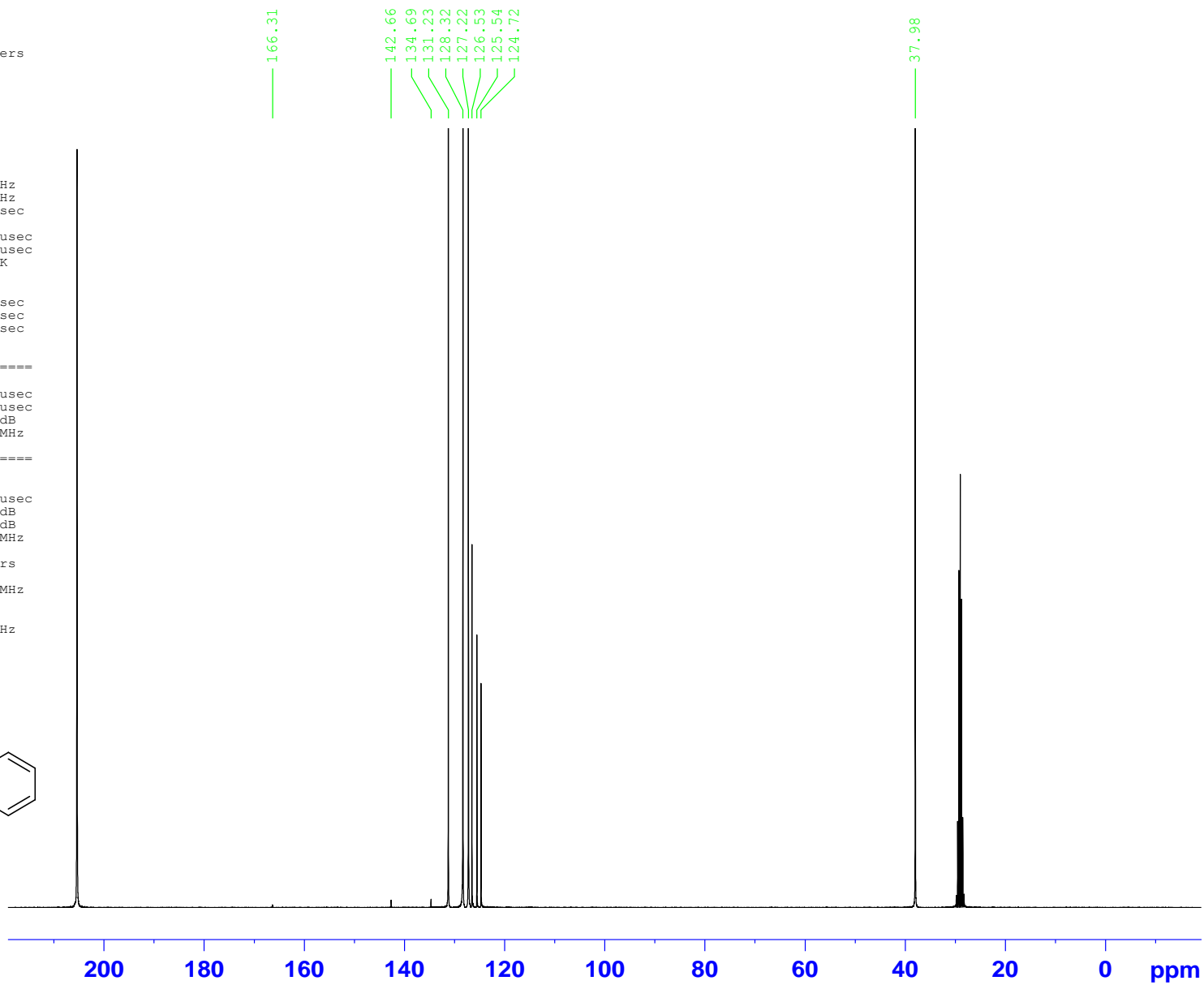
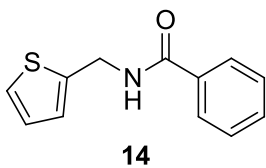
Current Data Parameters
NAME EZ-561-160
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140828
Time_ 9.56
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 964
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

==== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

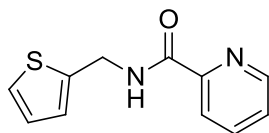


Current Data Parameters
NAME EZ-561-134
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140825
Time_ 14.47
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 101.6
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

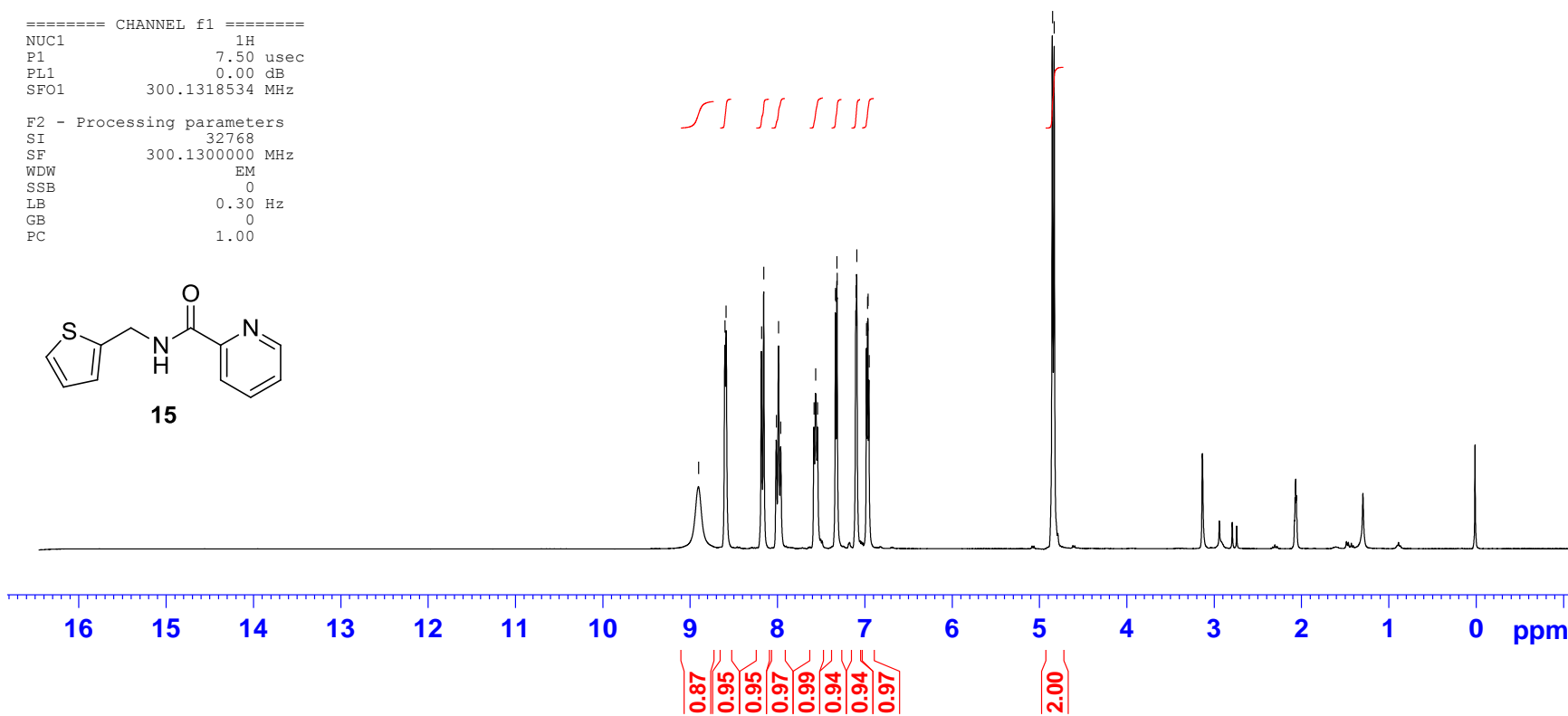
==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



15

8.904
8.601
8.587
8.183
8.158
8.013
7.988
7.962
7.582
7.564
7.542
7.336
7.333
7.319
7.316
7.101
7.093
6.980
6.968
6.964
6.952
4.851
4.830



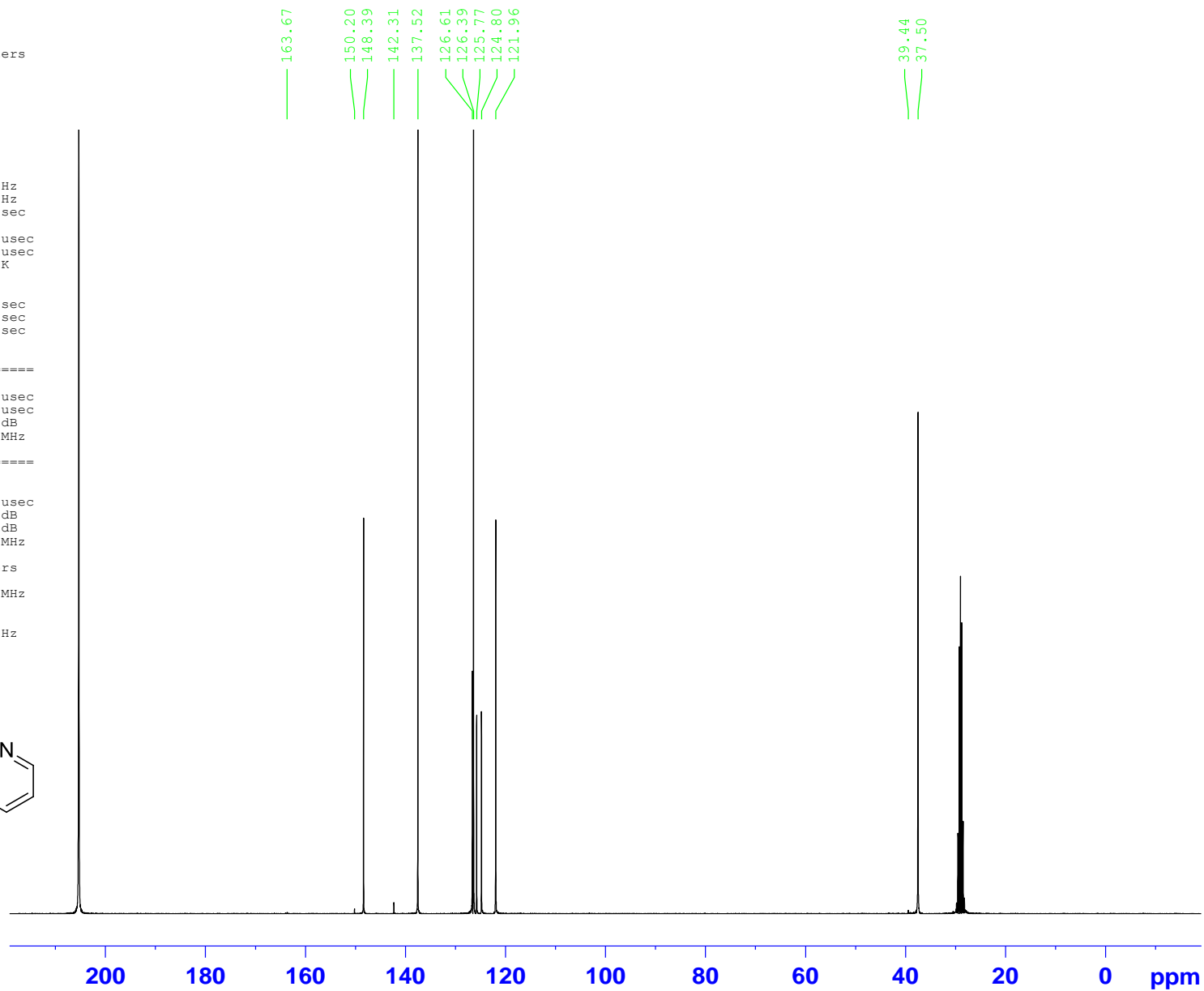
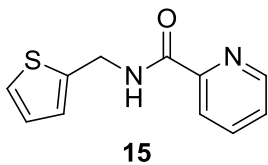
Current Data Parameters
NAME EZ-561-134
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140825
Time_ 15.59
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 1104
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
F1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

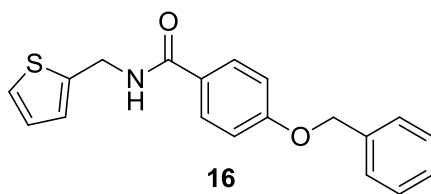


Current Data Parameters
NAME EZ-561-135
EXPNO 3
PROCNO 1

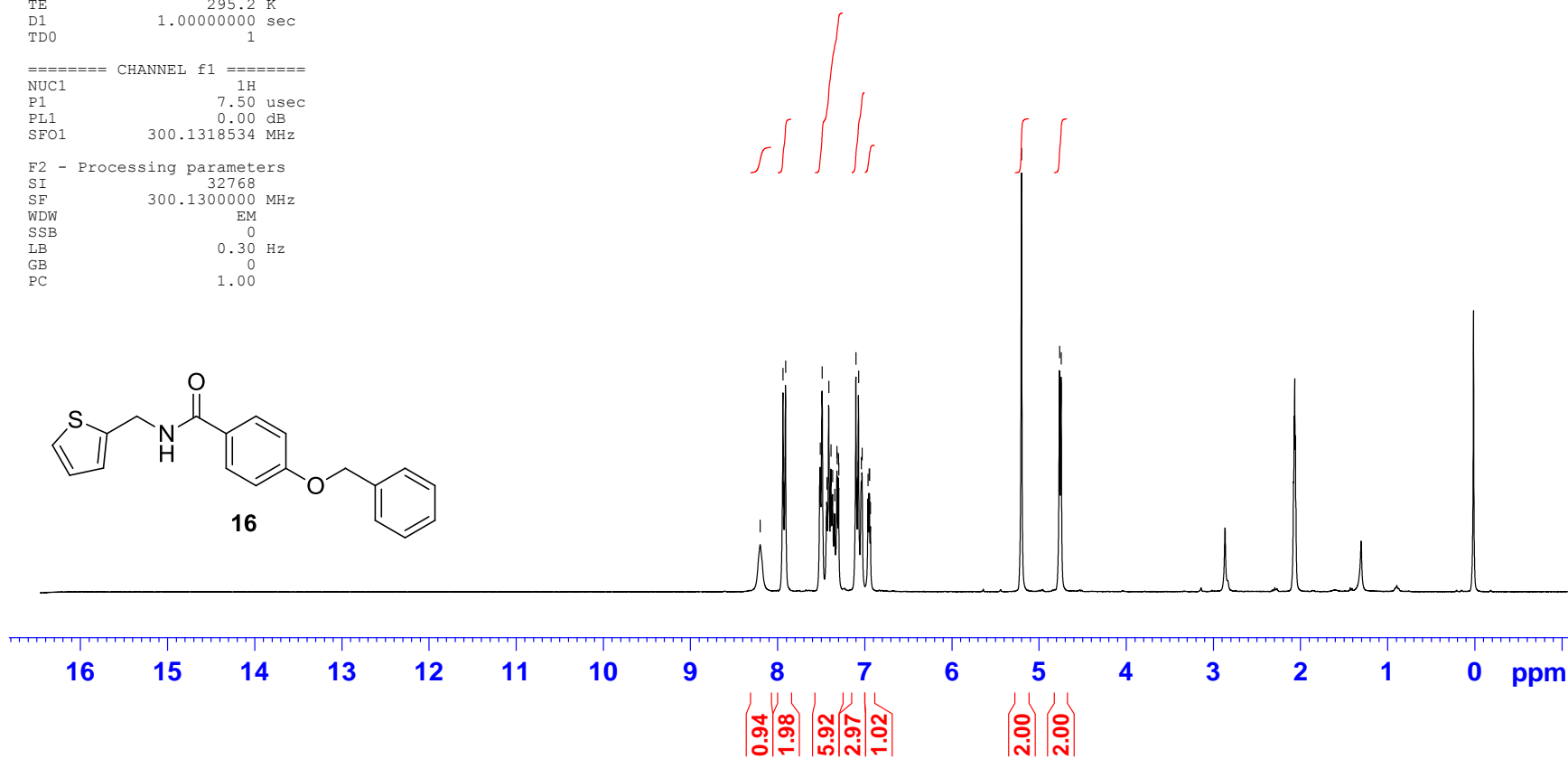
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140825
Time_ 16.06
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 287.4
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



8.200
7.939
7.909
7.512
7.489
7.435
7.412
7.388
7.369
7.346
7.319
7.316
7.302
7.298
7.101
7.072
7.040
7.032
6.962
6.950
6.946
6.934
5.200
4.765
4.746



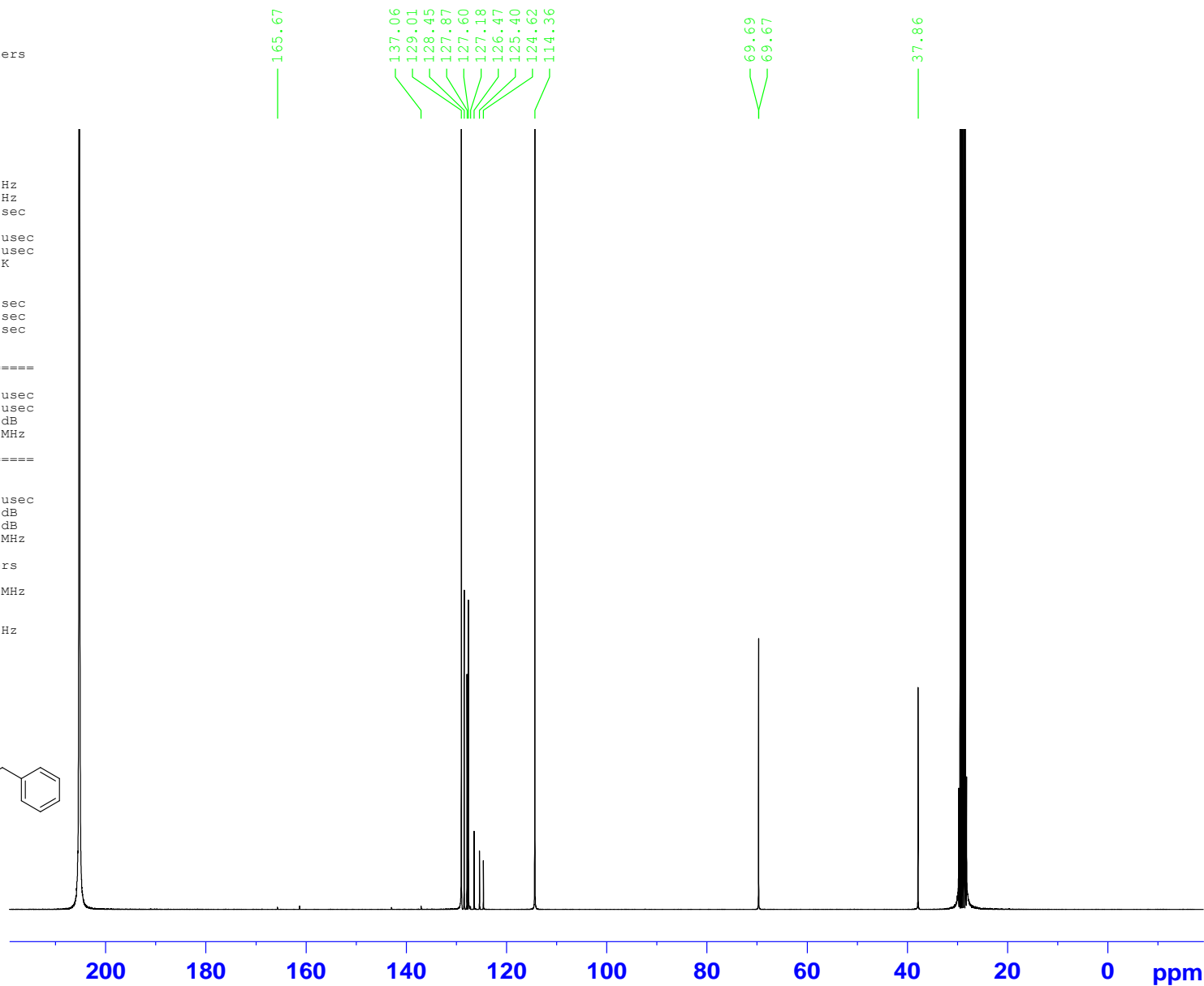
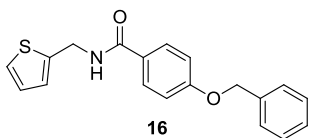
Current Data Parameters
NAME EZ-561-135
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140826
Time_ 2.52
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 10000
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 10321.3
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 294.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

==== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

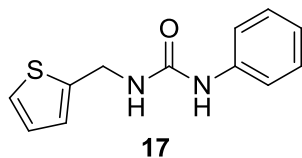


Current Data Parameters
NAME EZ-561-131
EXPNO 3
PROCNO 1

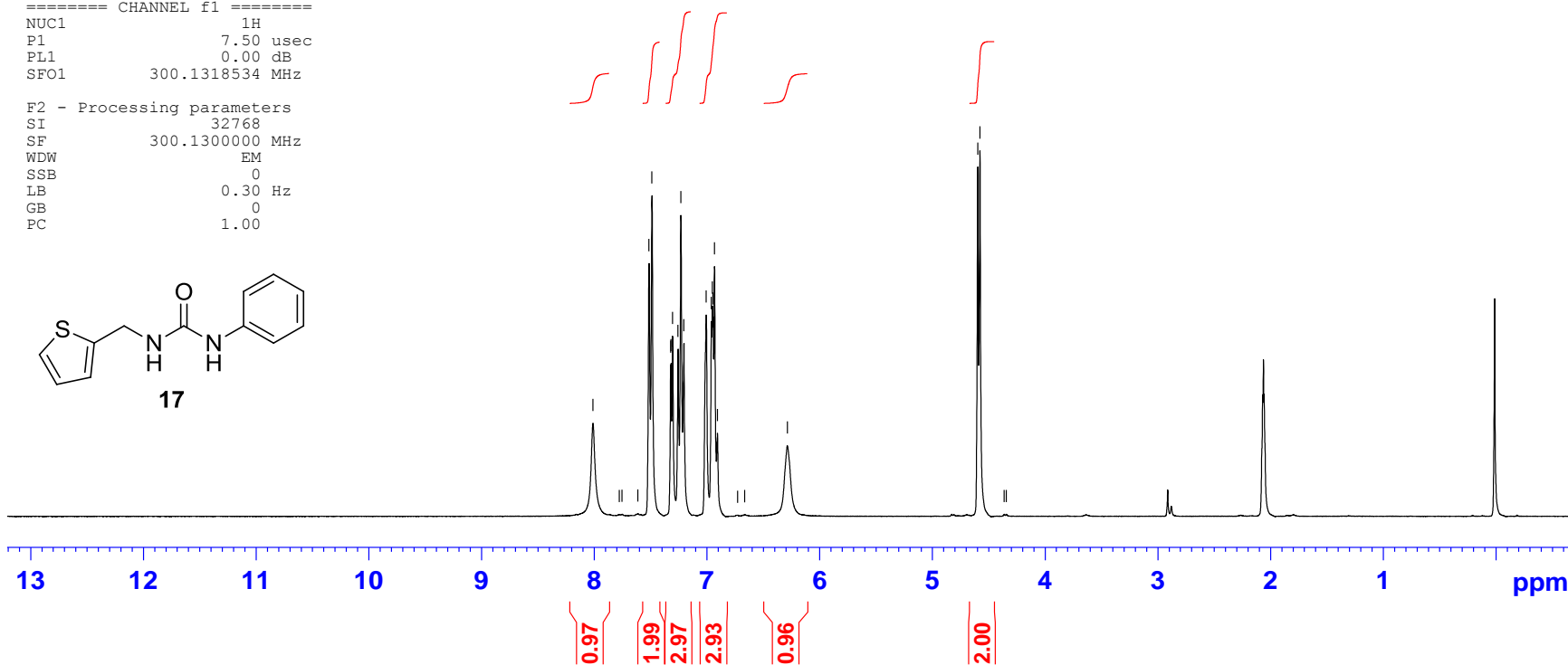
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140825
Time_ 8.34
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT Acetone
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 203.2
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



8.013
7.779
7.754
7.613
7.515
7.489
7.324
7.321
7.307
7.258
7.233
7.206
7.008
6.963
6.952
6.947
6.934
6.909
6.728
6.666
6.288
4.599
4.580
4.363
4.345



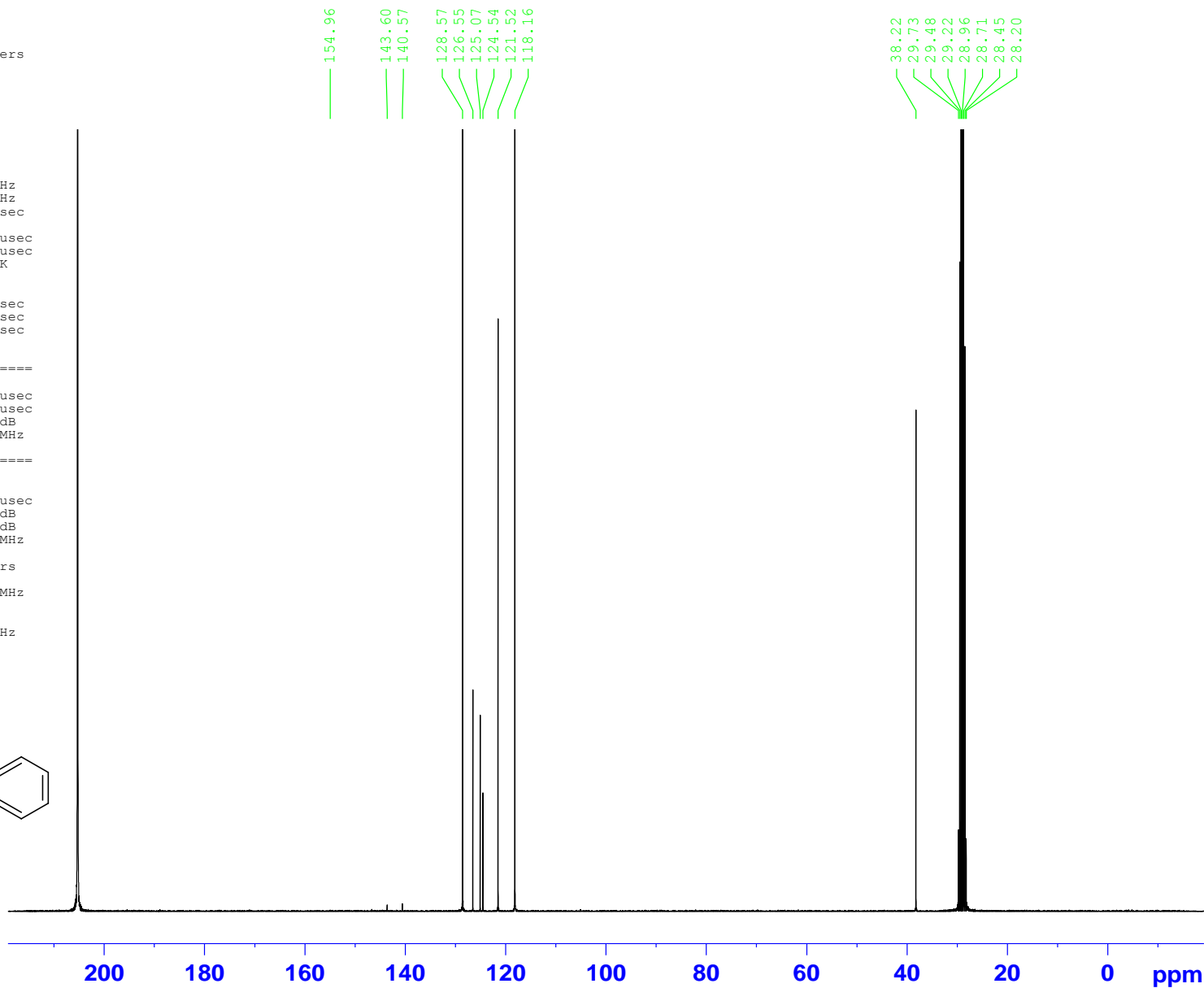
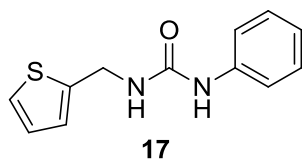
Current Data Parameters
NAME EZ-561-131
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140825
Time_ 12.53
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 3988
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TDO 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.40

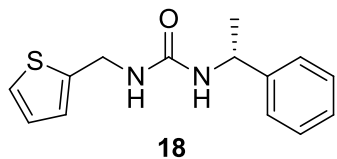


Current Data Parameters
NAME EZ-561-137
EXPNO 3
PROCNO 1

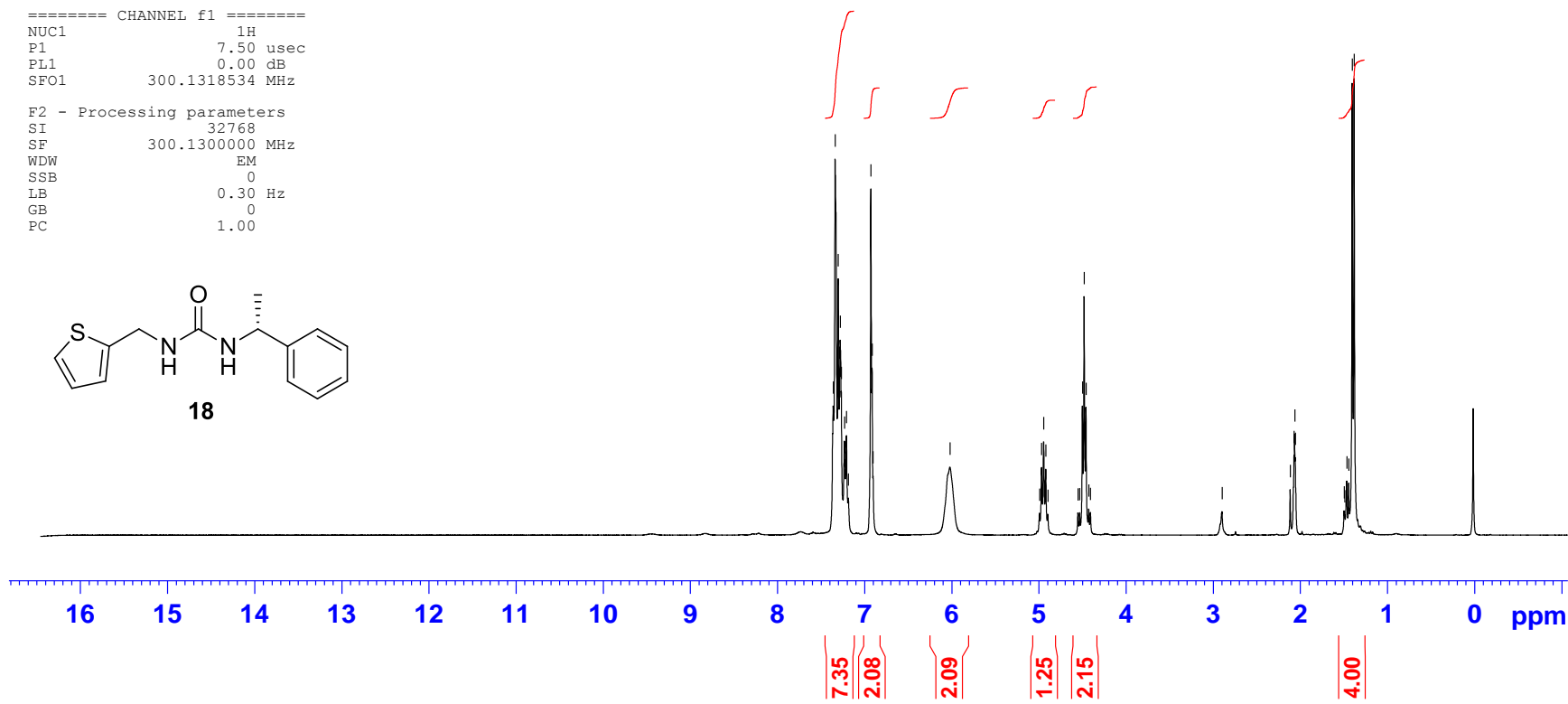
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140826
Time_ 7.34
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 143.7
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SF01 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



7.361
7.339
7.304
7.288
7.281
7.268
7.231
7.209
7.186
6.928
6.914
6.903
6.021
4.993
4.969
4.945
4.920
4.897
4.552
4.532
4.500
4.480
4.460
4.428
4.408
2.898
2.115
2.071
2.064
2.058
1.497
1.489
1.466
1.443
1.404



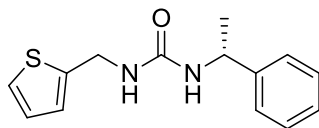
Current Data Parameters
NAME EZ-561-137
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140826
Time 9.19
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 1604
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 296.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TDO 1

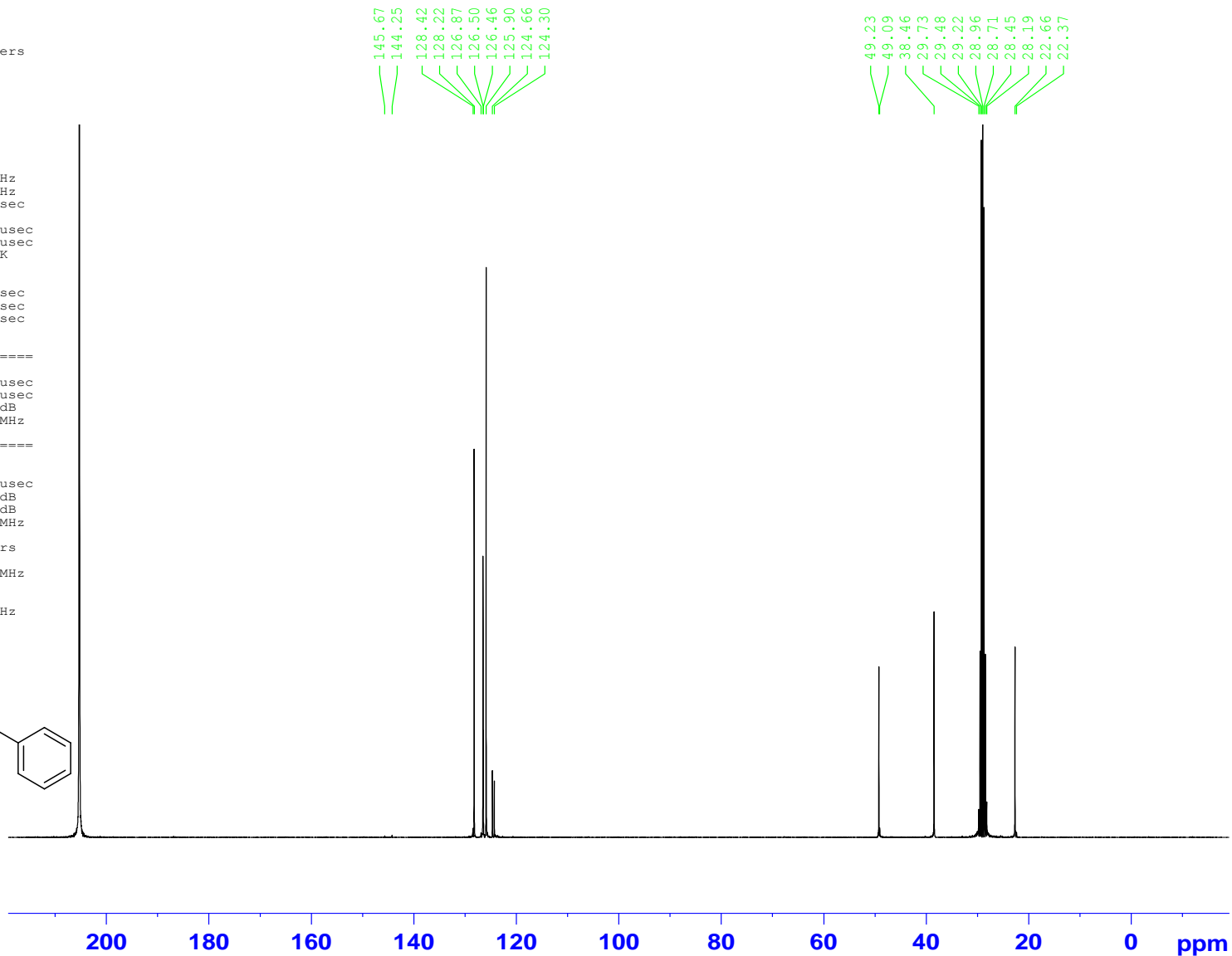
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40



18

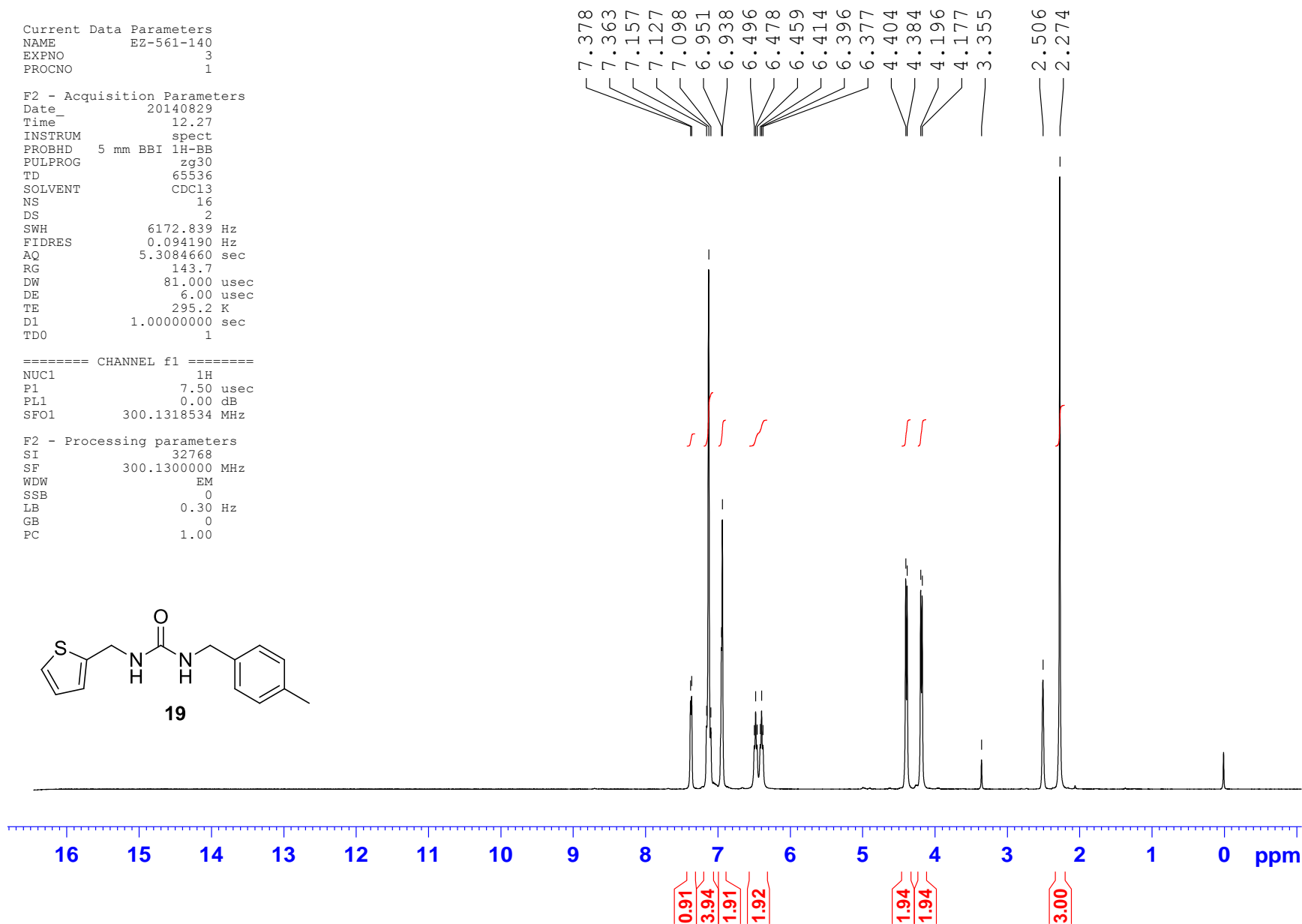
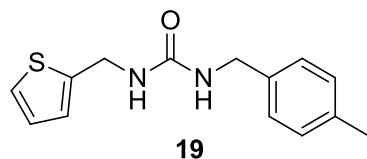


Current Data Parameters
NAME EZ-561-140
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140829
Time_ 12.27
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 143.7
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



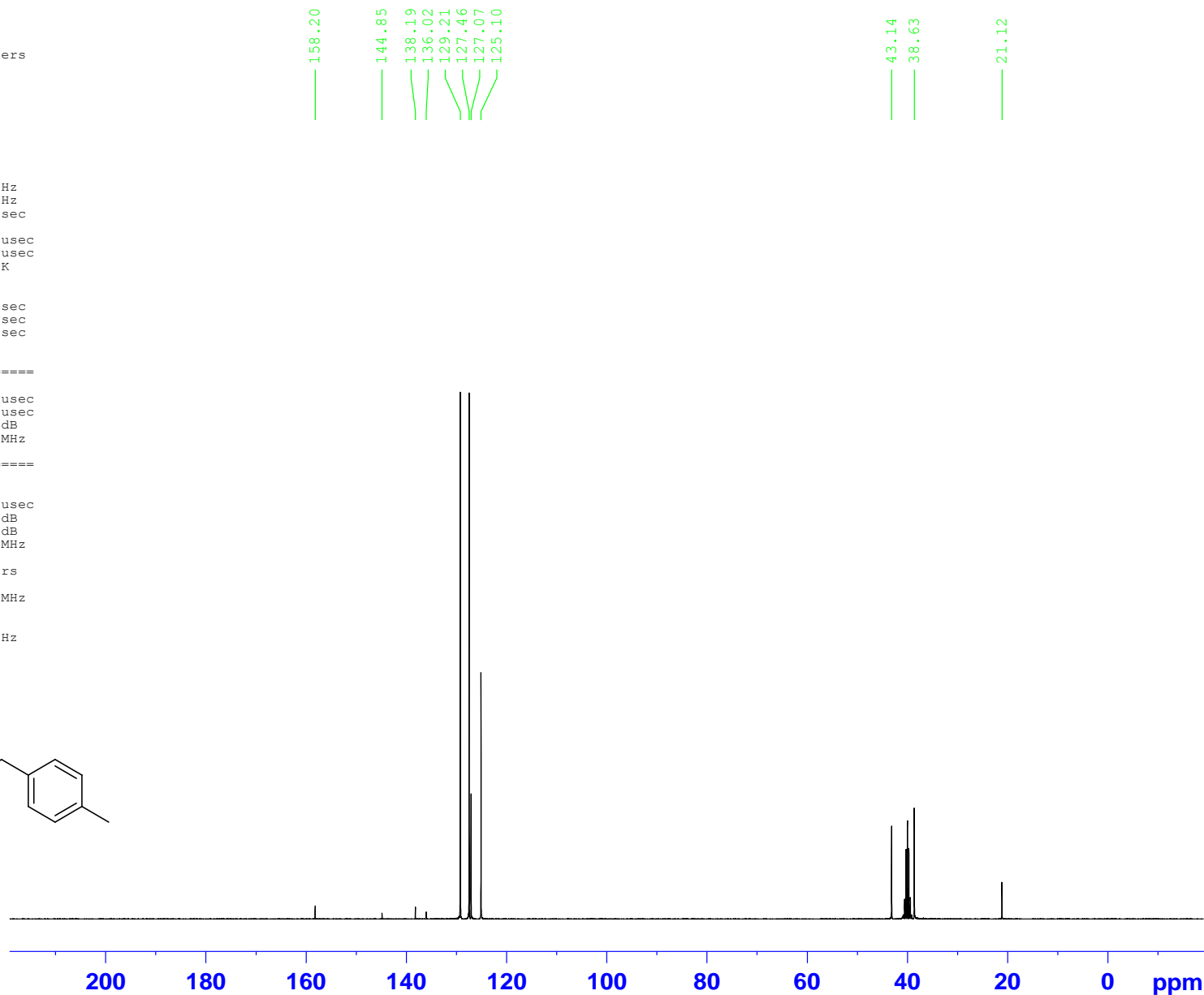
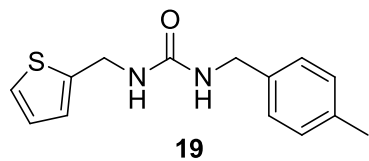
Current Data Parameters
NAME EZ-561-140
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140829
Time_ 13.03
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 534
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.0000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TDO 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

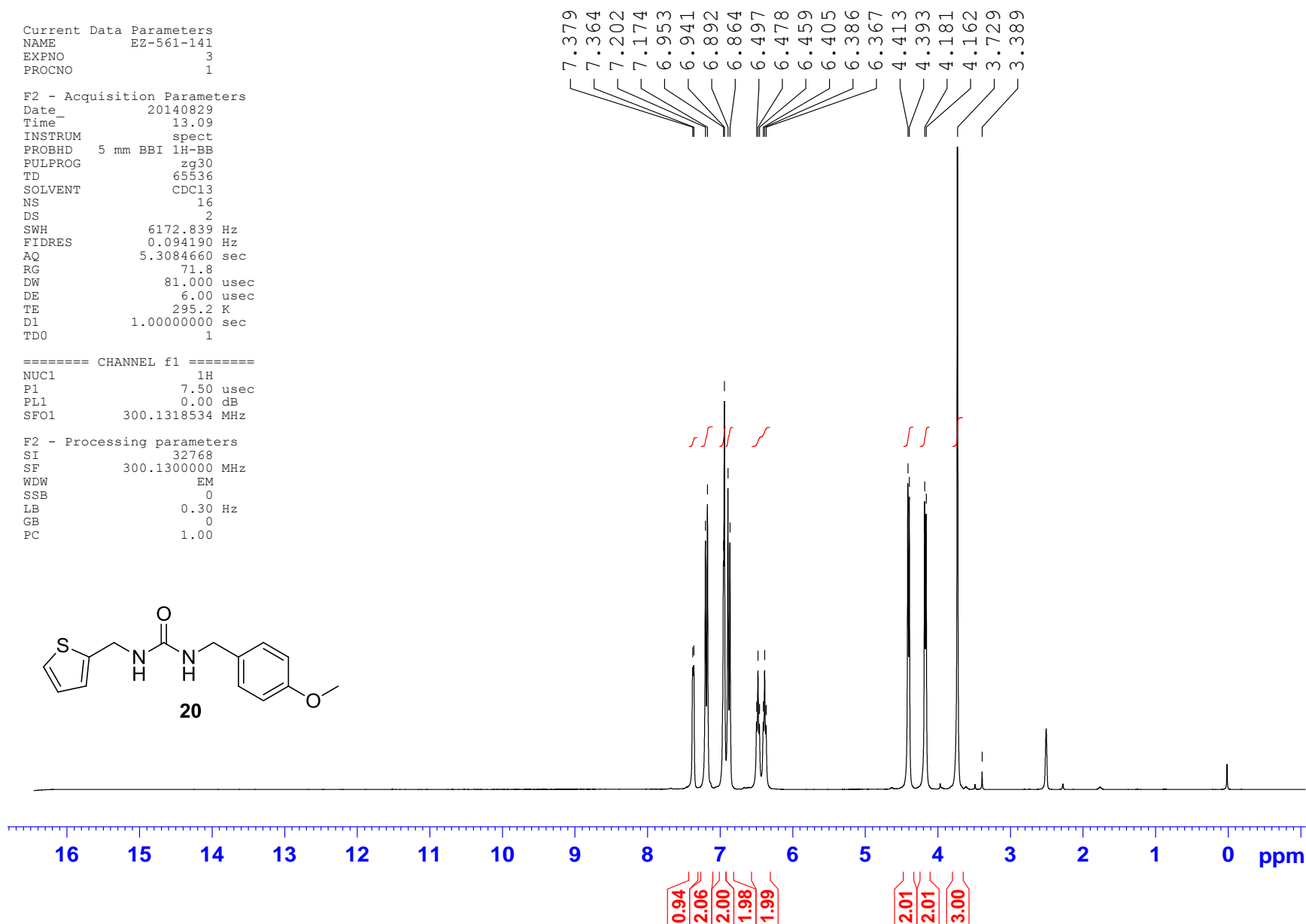
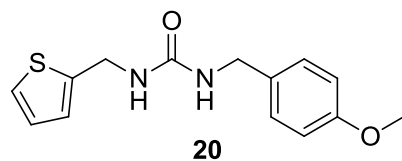


Current Data Parameters
NAME EZ-561-141
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140829
Time_ 13.09
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 71.8
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



Current Data Parameters
NAME EZ-561-141
EXPNO 2
PROCNO 1

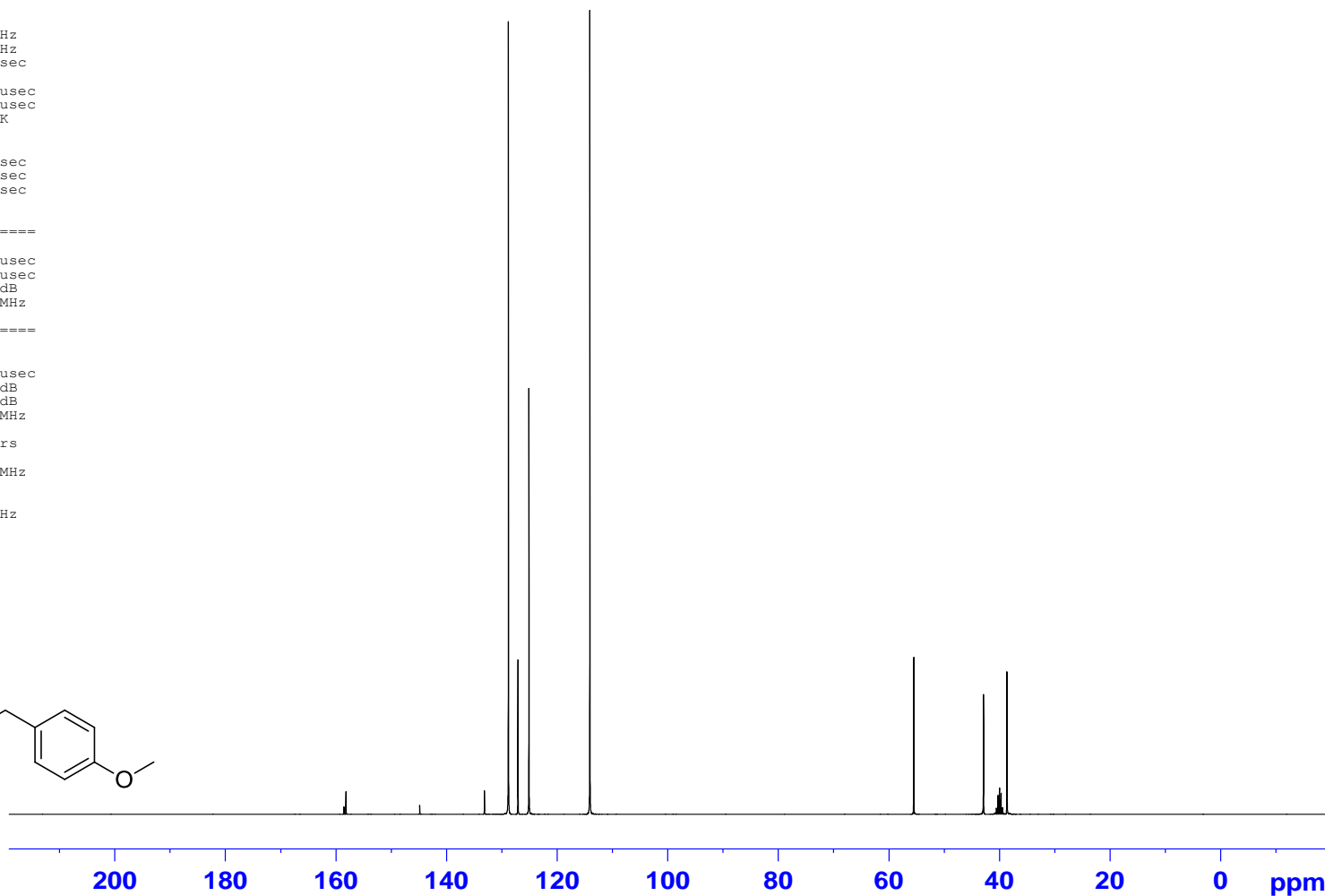
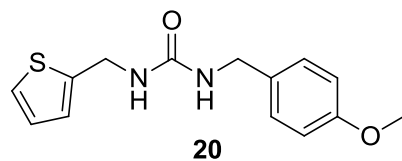
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140829
Time 13.35
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 399
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.000000
CNST11 1.000000
D1 2.0000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TD0 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
P2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

158.56
158.19
144.85
133.15
128.81
127.08
125.10
114.08
55.49
42.87
39.14

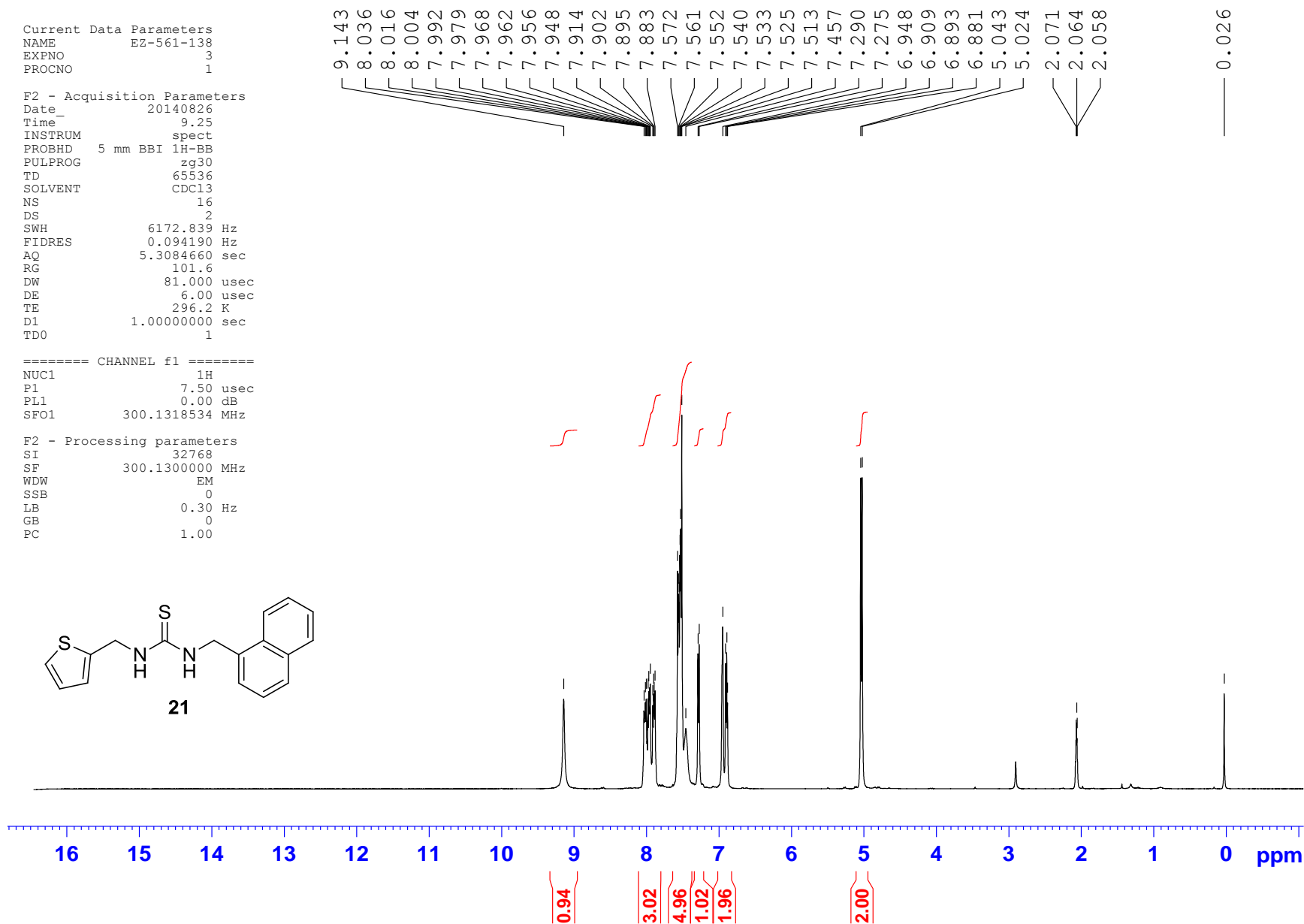
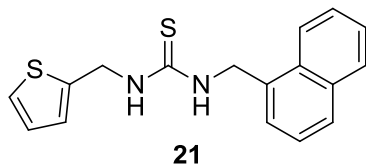


Current Data Parameters
NAME EZ-561-138
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140826
Time_ 9.25
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 101.6
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 296.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



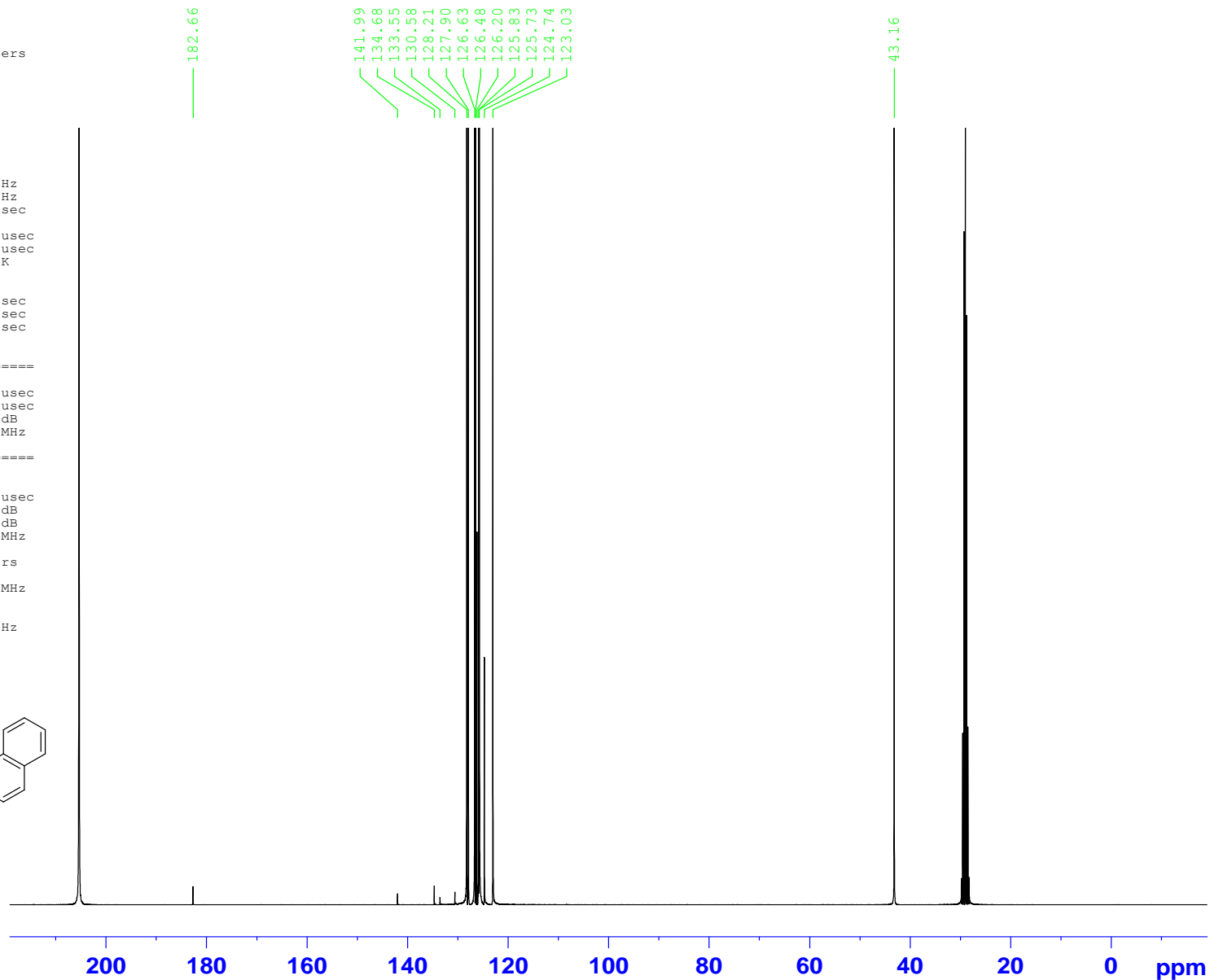
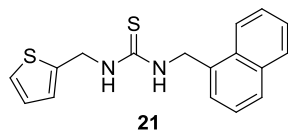
Current Data Parameters
NAME EZ-561-138
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140826
Time_ 13.01
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 3342
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TD0 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

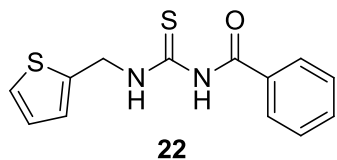


Current Data Parameters
NAME EZ-561-132
EXPNO 3
PROCNO 1

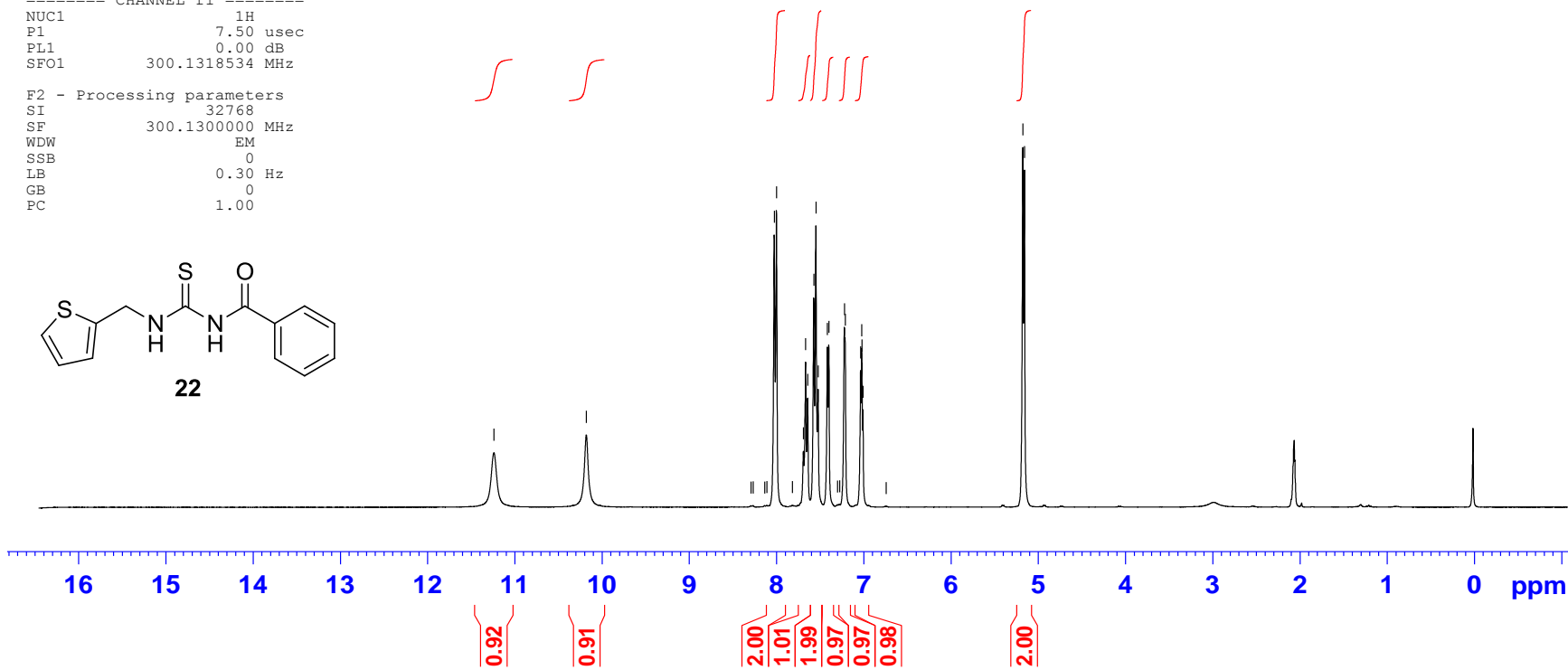
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140825
Time_ 12.59
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 101.6
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



11.241
10.181
8.294
8.269
8.138
8.113
8.026
8.001
7.819
7.692
7.667
7.643
7.574
7.548
7.523
7.418
7.401
7.302
7.277
7.222
7.213
7.037
7.025
7.021
7.008
6.743
5.176
5.157



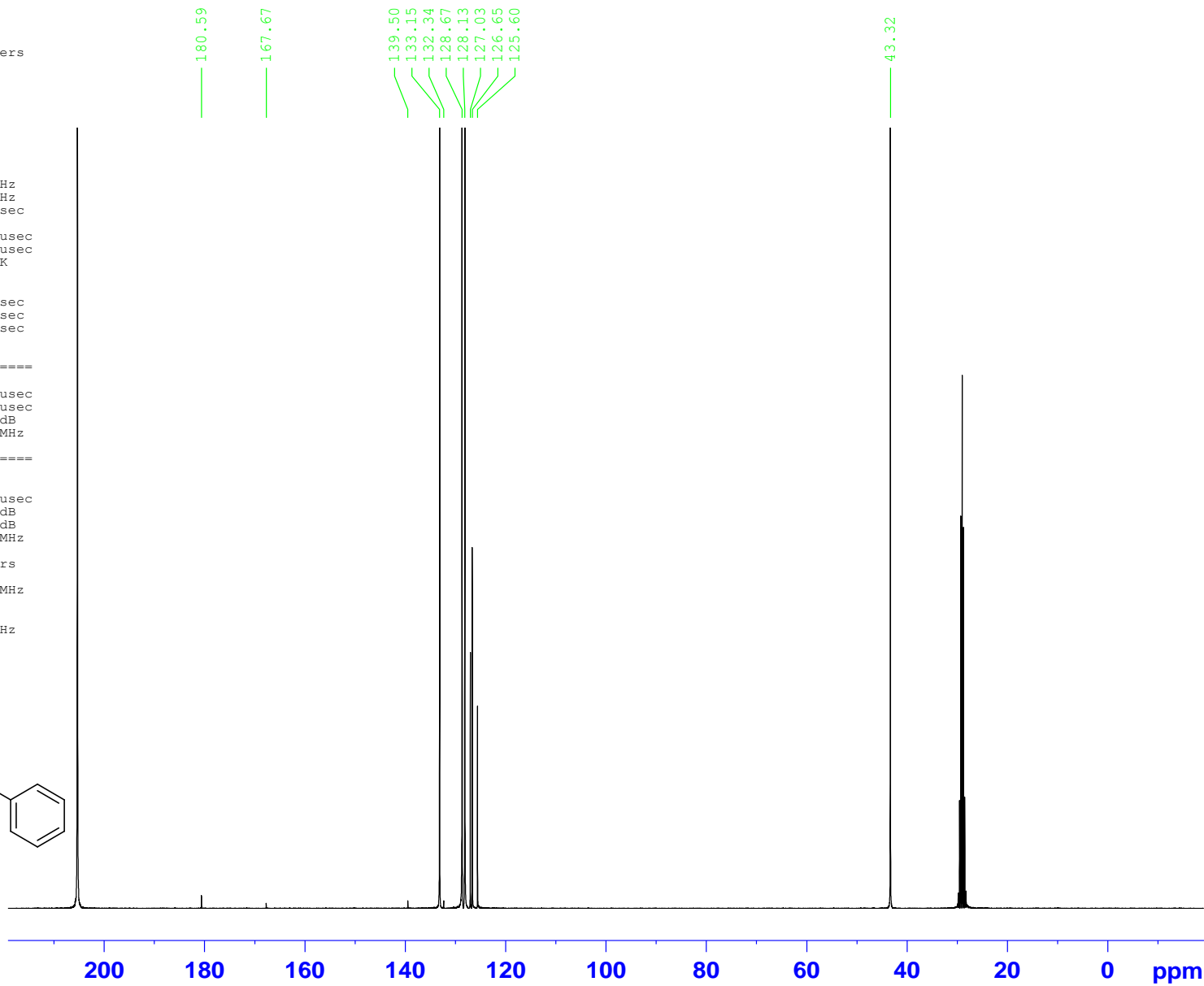
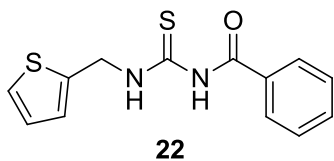
Current Data Parameters
NAME EZ-561-132
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140825
Time_ 14.38
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 1507
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 14596.5
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.000000
CNST11 1.000000
D1 2.0000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

==== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

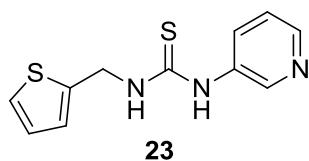


Current Data Parameters
NAME EZ-561-139
EXPNO 3
PROCNO 1

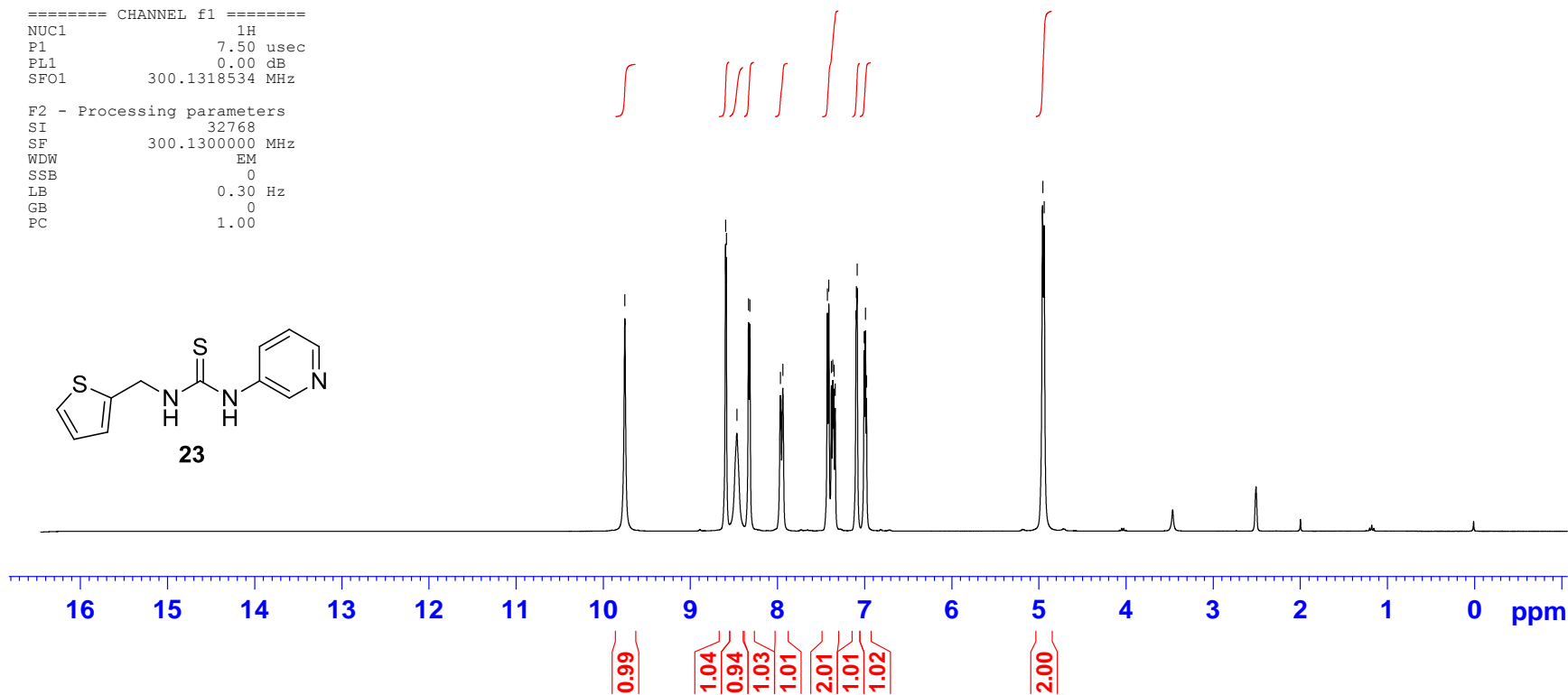
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140829
Time_ 11.48
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 50.8
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



9.751
8.595
8.587
8.467
8.332
8.318
7.967
7.938
7.428
7.411
7.380
7.366
7.352
7.337
7.096
7.086
7.007
6.992
6.978
4.956
4.938



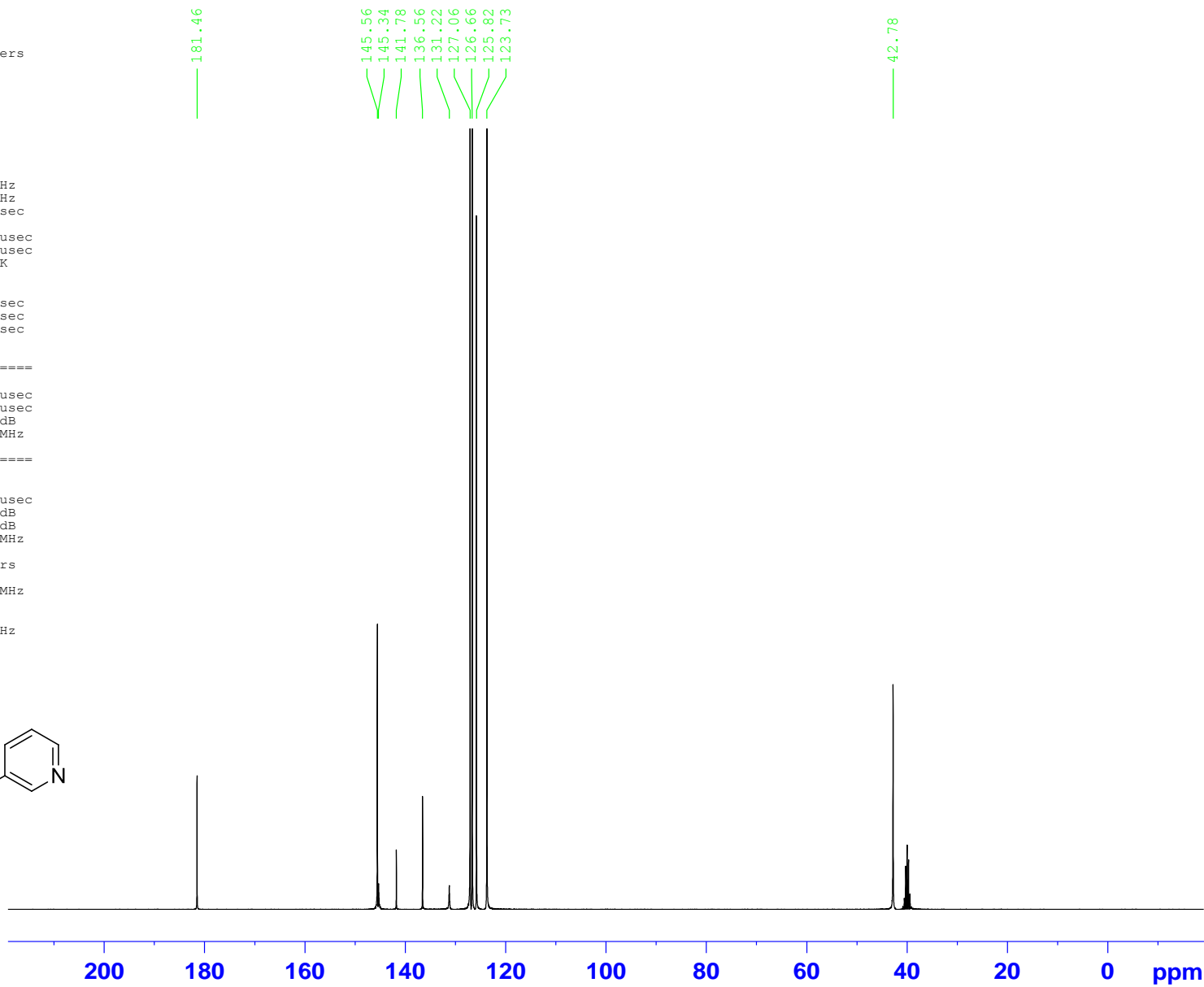
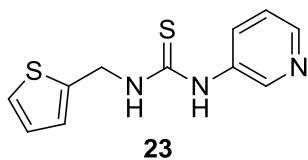
Current Data Parameters
NAME EZ-561-139
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140829
Time_ 12.21
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 504
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.000000
CNST11 1.000000
D1 2.0000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

==== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

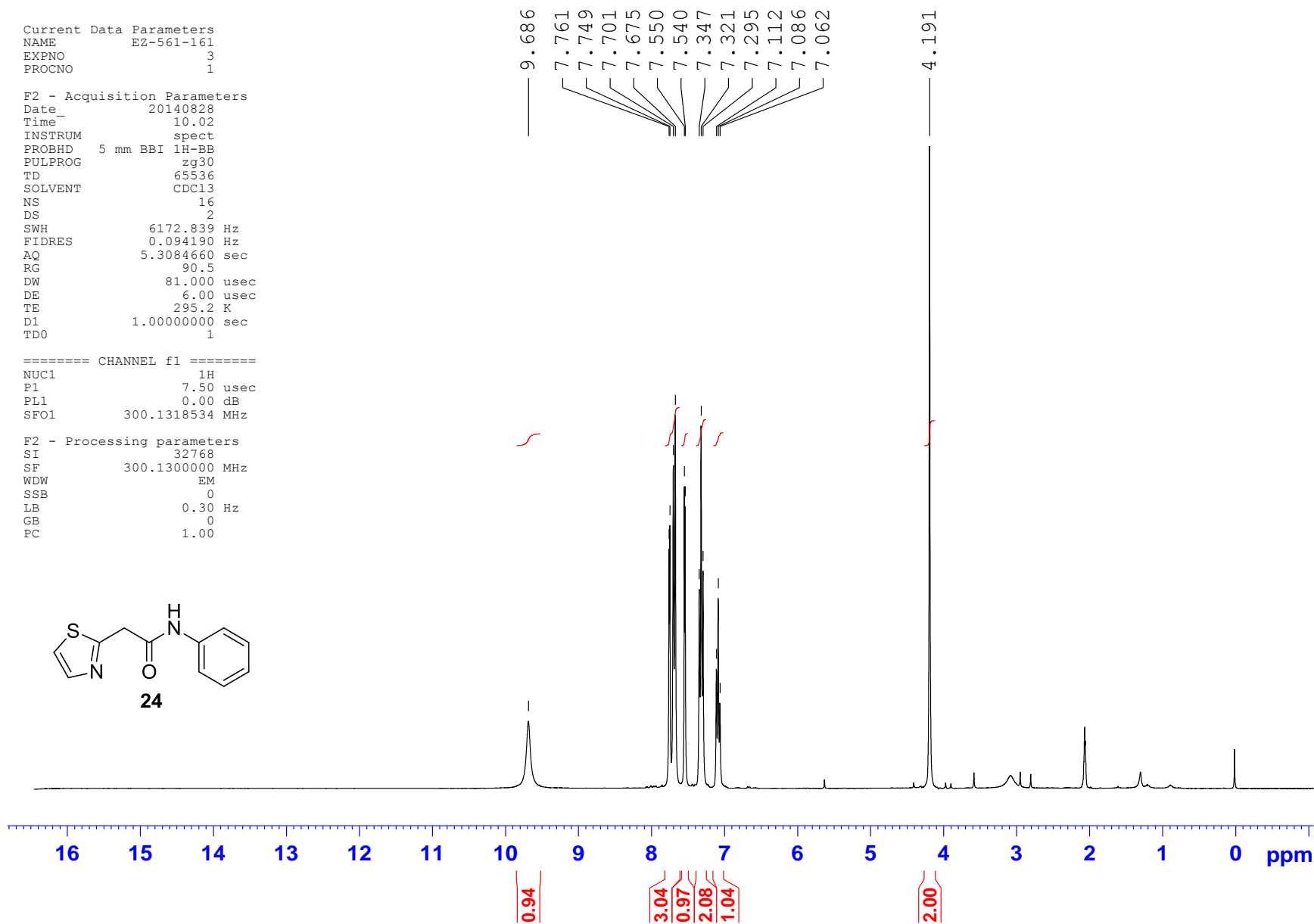
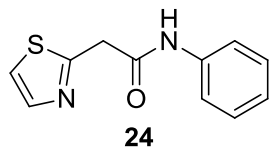


Current Data Parameters
NAME EZ-561-161
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140828
Time_ 10.02
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 90.5
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.0000000 sec
TD0 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



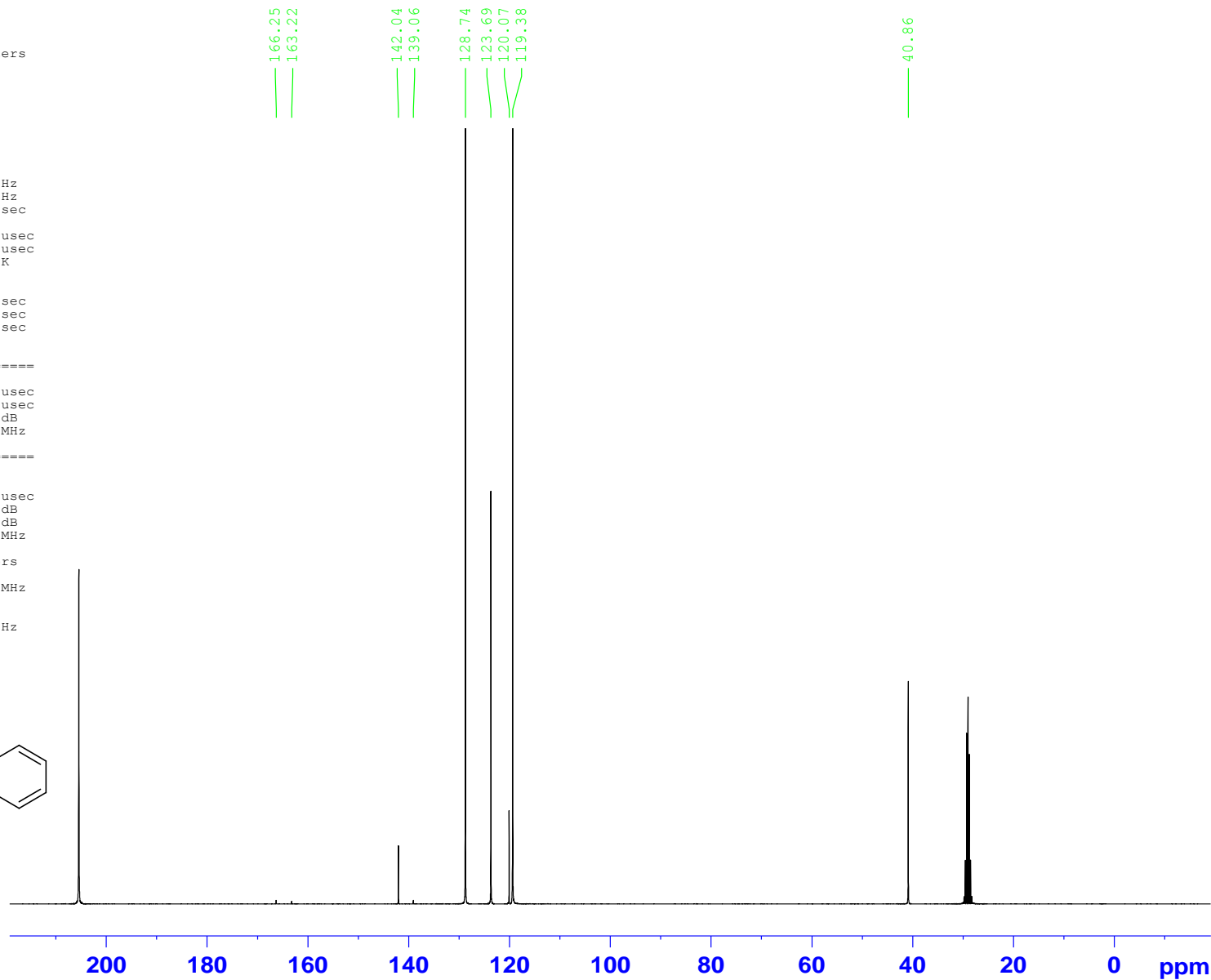
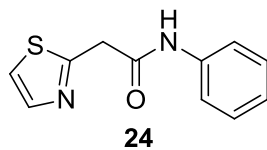
Current Data Parameters
NAME EZ-561-161
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140828
Time 10.45
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 641
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TD0 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

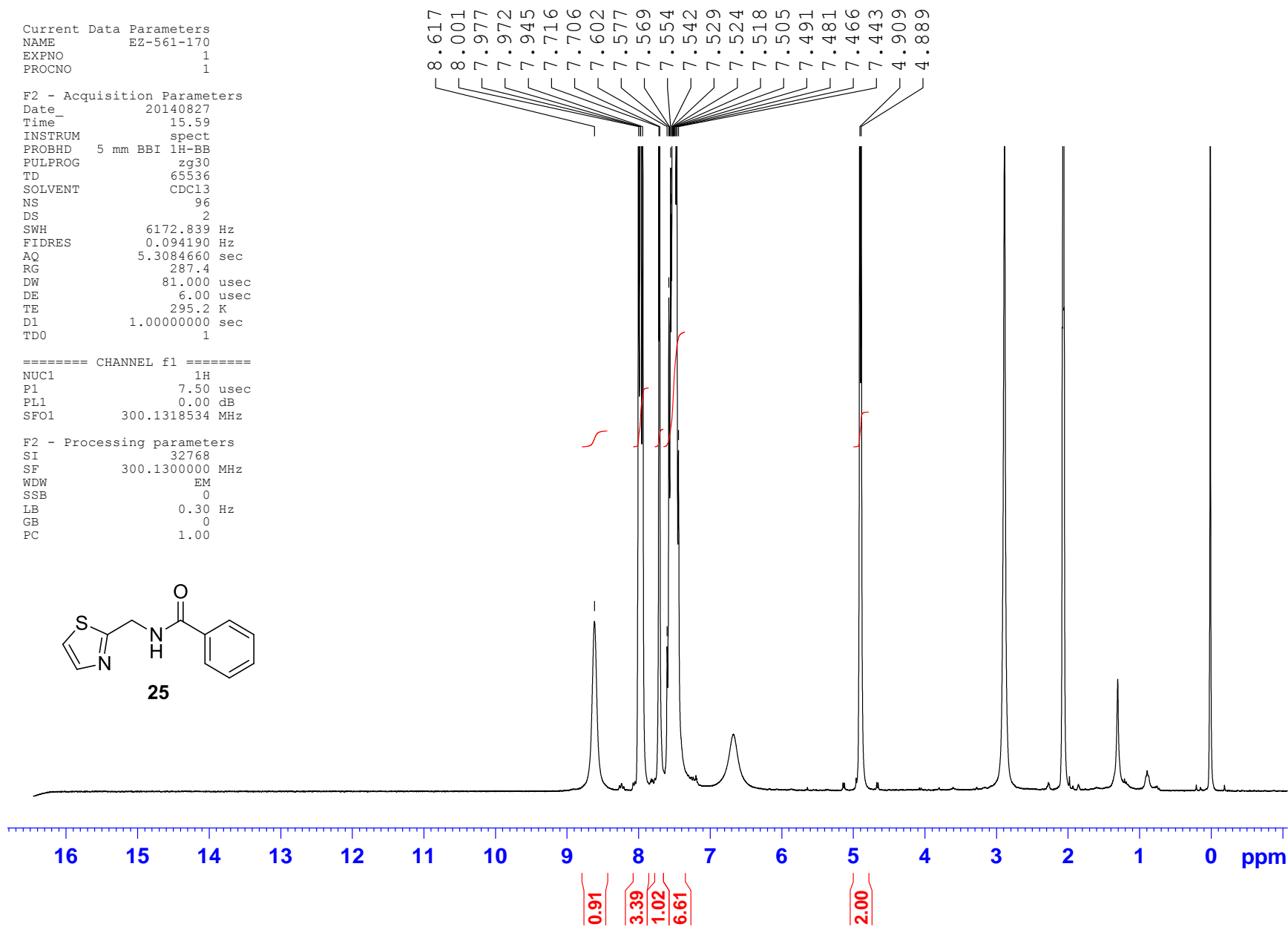
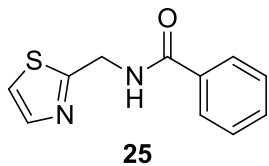


Current Data Parameters
NAME EZ-561-170
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140827
Time_ 15.59
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 96
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 287.4
DW 81.000 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 7.50 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



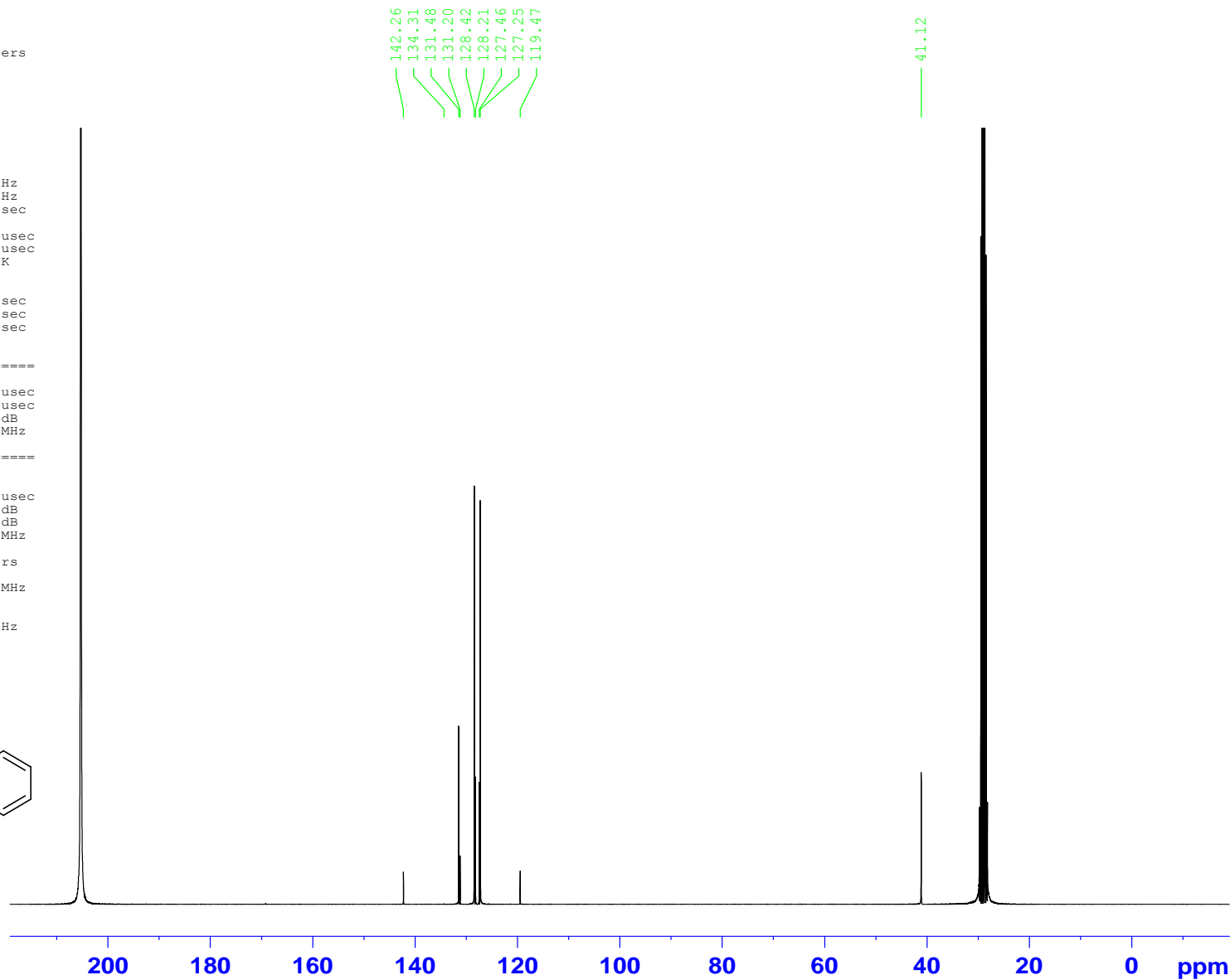
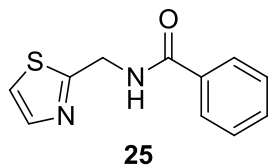
Current Data Parameters
NAME EZ-561-170
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140828
Time 7.22
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG jmod
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 14307
DS 4
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
AQ 1.8219508 sec
RG 16384
DW 27.800 usec
DE 6.00 usec
TE 295.2 K
CNST2 145.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.0000000 sec
d20 0.00689655 sec
DELTA 0.00001846 sec
TD0 1

=====
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 14.50 usec
p2 29.00 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz

=====
CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 0.00 dB
PL12 21.80 dB
SFO2 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40



References

1. **Katritzky AR, Serdyuk L, Xie L, Ghiviriga I.** 1997. Efficient Syntheses of 2-Functionalized Thiophenes, Cyclopent[b]thiophenes, and Polysubstituted Benzo[b]thiophenes from 2-(Benzotriazol-1-ylmethyl)thiophenes. *J Org Chem* **62**:6215-6221.
2. **Shen W, Kunzer A.** 2002. A Facile One-Carbon Homologation of Aryl Aldehydes to Amides. *Org Lett* **4**:1315-1317.
3. **Gupta MK, Li Z, Snowden TS.** 2014. Preparation of One-Carbon Homologated Amides from Aldehydes or Primary Alcohols. *Org Lett* **16**:1602-1605.
4. **Molander GA, Hiebel M-A.** 2010. Synthesis of Amidomethyltrifluoroborates and Their Use in Cross-Coupling Reactions. *Org Lett* **12**:4876-4879.

7. Discussão

No presente estudo foi avaliado o potencial antimicrobiano e imunomodulador do tiofenoacetamida (TAA). Avaliamos a ação bactericida do TAA, sobre o *M. tuberculosis*, o *M. bovis*-BCG, o *M. smegmatis*, e a *E. coli* usando diferentes técnicas. Estudamos a ação antimicobacteriana sobre macrófagos murinos infectados e camundongos C57/Bl6 infectados com *M. bovis*-BCG e ainda sua ação imunomoduladora avaliando a produção de citocinas, quimiocinas, PGE2 e a formação de corpúsculos lipídicos (CL) após a infecção com micobactérias.

Substâncias contendo núcleos tiofenólicos foram descritas inicialmente em diferentes espécies de plantas medicinais, apresentaram grande potencial como antivirais e antifúngicos e inseticidas, entretanto se mostraram muito citotóxicas em células de mamíferos (Hudson et al. 1989, Marles et al. 1992). Estes estudos despertaram o interesse na síntese de derivados tiofenólicos que vem representando um importante campo de investigação devido ao amplo espectro de atividades farmacológicas. Medicamentos contendo núcleos tiofenólicos vêm sendo utilizados na quimioterapia de tumores sólidos e leucemias com sucesso (Horton et al. 2005), no tratamento da hipertensão (Roxburgh et al. 2001), como antiagregante plaquetário (Jagadish et al. 2013) e modulação do sistema nervoso central (Jha et al. 2012). Apresentam propriedades analgésicas e atuam em processos inflamatórios inibindo a expressão de moléculas de adesão (Stewart et al. 2001). A atividade antibacteriana dessas substâncias vem sendo extensamente avaliada, alguns antibióticos da classe das cefalosporinas também possuem em sua estrutura um núcleo tiofênico, como cefoxitina, cefalotina e cefaloridina que atuam principalmente contra bactérias Gram positivas e algumas Gram negativas (Jha et al. 2012, Korolkovas and de Albuquerque Carneiro de França 2009/2010). Masunari, em 2007, descreveu uma nova série de análogos contendo o anel tiofênico com habilidade de matar *S.aureus* metilicina resistente (MRSA) (Masunari and Tavares 2007). No entanto estudos relacionados a atividade antimicobacteriana de derivados tiofenólicos ainda não haviam sido realizados. Em 2007 nosso grupo participou do estudo no qual foi descrita uma nova classe de agentes antimicobacterianos, análogos do TAA. Foi avaliada a ação do TAA e 21 análogos, sobre o *M. tuberculosis* (H37Rv), sendo o MIC de todas as substâncias determinado através da técnica de MABA, que avalia capacidade metabólica celular. Apenas 9 apresentaram ação micobactericida contra o *M. tuberculosis*, com MICs elevados que variaram entre 150-600 µM. O TAA foi a substância que apresentou menor MIC (150 µM) não sendo citotóxico ao hospedeiro (Silva Lourenço et al. 2007). Dando continuidade ao estudo de Silva-Lourenço

(2007), estudamos o efeito do TAA e ainda avaliamos outros 23 análogos inéditos planejados para aumentar a eficácia e solubilidade da substância.

Primeiramente, foi realizada a avaliação do MIC do TAA contra o *M. bovis*-BCG, determinado pelo método de azul de Alamar, que assim como o MABA avalia a capacidade metabólica da célula. Observamos que o MIC do TAA foi de 5,0 pM, mostrando sua capacidade de promover a morte do *M. bovis*-BCG em concentrações muito baixas. Ao compararmos os MICs do TAA sobre o *M. tuberculosis* e sobre o *M. bovis*-BCG pode-se observar uma diferença significativa quanto à potência da substância. O fato de a substância ser muito mais potente sobre o *M. bovis*-BCG (5 pM) do que sobre o *M. tuberculosis* (150 µM) poderia ser explicado pelas características fisiológicas das duas espécies. O *M. bovis*-BCG é uma cepa atenuada proveniente do *M. bovis*, que perdeu significativa porção de seu genoma que lhe conferia uma resistência maior às agressões do ambiente, resistência essa mantida pela cepa virulenta *M. tuberculosis*- H37Rv (Philipp et al. 1996).

Objetivando a melhoria na potência contra o *M. tuberculosis*, foram sintetizados 24 análogos inéditos do TAA, com substituintes no anel benzênico. Devido à presença de dois pares de elétrons livres, no anel tiofênico o enxofre encontra-se sp^2 hibridizado, isto é, um dos pares de elétrons ocupa o orbital sp^2 hibridizado que ressoa com os outros dois pares de elétrons π , o que faz com que o anel tiofênico assumira característica de uma anel benzênico, apesar de o anel tiofênico possuir apenas 5 átomos. A extrema reatividade do anel é conferida pelo outro par de elétrons que se posiciona no orbital p, extremamente reativo, essas características proporcionam grande facilidade na obtenção por síntese orgânica de análogos. A avaliação do MIC foi realizada utilizando um mutante fluorescente de *M. tuberculosis*-CHEAM3 que expressa uma proteína mCherry fluorescente (Ollinger et al. 2013), onde foi avaliada e quantificada a emissão da fluorescência micobacteriana. Foi confirmada a ação do TAA sobre o *M. tuberculosis* e avaliamos seus novos análogos. O MIC do TAA, como esperado, foi elevado- 70 µM, entretanto apresentou menor valor que o estudo anterior, fato que deve estar relacionado a diferença de técnicas utilizadas, já que no estudo de Silva-Lourenço foi realizada uma avaliação da capacidade metabólica da micobactéria e no presente trabalho foi avaliada a sobrevivência da micobactéria. Dos 23 novos análogos sintetizados foi observado que 3 tiveram atividade melhorada (**Table S1**- em destaque- página 2, *supplemental information*- resultados complementares) consistente com dados da literatura que descrevem aumento ou perda da atividade dependente dos substituintes ligados ao anel tiofênico (Hudson et al. 1989, Marles et al. 1992). Nesses estudos foi observado que a diminuição no número de anéis tiofênicos ou sua substituição por grupamentos benzênicos leva a diminuição da citotoxicidade e também da hidrofobicidade e consequente perda da

atividade bactericida (Marles et al. 1992). Entretanto foi descrito que a ação tóxica dessas substâncias estaria relacionada a formação do singlete de oxigênio gerado pela conjugação das ligações insaturadas dos politiofenos, portanto a inclusão/exclusão de substituintes promoveria alterações na estrutura molecular promovendo o equilíbrio ideal entre atividade antibacteriana e toxicidade ao hospedeiro. Recentemente Wilson (2013), descreveu uma nova classe de tiofenos capazes de matar o *M. tuberculosis*. É interessante notar que a substituição de ligantes ao anel tiofênico promove grande aumento da atividade contra o *M. tuberculosis* (0,05 μM), entretanto observa-se, também, significativo aumento a citotoxicidade em células de mamíferos (Wilson et al. 2013). Através da adição de grupamentos hidrofóbicos ao anel benzênico é possível a obtenção da conjugação de ligações insaturadas que aumentam a hidrofobicidade da molécula e levam a uma melhora da atividade bactericida. Entretanto, de acordo com Masunari (2007), outros fatores, como propriedades estéricas devem ser consideradas, já que em alguns casos a adição de grupamentos extremamente hidrofóbicos como OC_4H_9 e $\text{n-C}_4\text{H}_9$ não aumenta a ação bactericida (Masunari and Tavares 2007).

Com o intuito de avaliar a especificidade bactericida do TAA foi investigada sua ação sobre a *E. coli*, uma bactéria Gram negativa presente no trato gastrointestinal de mamíferos, e sobre o *M. smegmatis* uma micobactéria ambiental, não patogênica. Observamos que o TAA não tem capacidade bactericida sobre a *E. coli*, o que durante um tratamento oral faz-se relevante já que evita o desequilíbrio da flora gastrointestinal, evitando efeitos colaterais, observado no uso prolongado de alguns antibióticos não seletivos. Além disso, não foi observada ação micobactericida sobre o *M. smegmatis*, restringindo sua ação à micobactérias do MTC. Sabe-se que o *M. smegmatis* mantém diversos genes de seu genoma que são inexistentes em micobactérias patogênicas adaptadas a vida no hospedeiro (Ventura et al. 2007). A exclusão desses genes que se fazem presentes apenas no *M. smegmatis* se faz relevante na busca do mecanismo de ação do TAA, diminuindo o universo de possíveis alvos.

Na segunda parte deste trabalho fomos avaliar o efeito do TAA sobre macrófagos. A maioria dos fármacos utilizados na quimioterapia antibiótica atualmente tem como principal alvo o microrganismo, entretanto deve-se levar em consideração que micobactérias são patógenos intracelulares facultativos e normalmente não se encontram fora da célula hospedeira. Com o objetivo de erradicar completamente a bactéria invasora deve-se avaliar também a ação desses fármacos na célula hospedeira infectada (Gomez and McKinney 2004, Singh et al. 2010). Macrófagos são células hospedeiras com ação fagocítica comprovada e destacam-se como uma das principais populações celulares da resposta imune inata, a atuar contra a infecção por micobactérias (Gordon 2007). Apesar de macrófagos serem células programadas para a eliminação de microrganismos invasores, sabe-se que o *M. tuberculosis*

tem habilidade de evadir o sistema imune hospedeiro evitando sua eliminação (Mueller and Pieters 2006, Poirier and Av-Gay 2012, Houben, Nguyen, and Pieters 2006). Portanto, após haver sido comprovada a ação direta do TAA sobre o *M. tuberculosis* e sobre o *M. bovis*-BCG foi avaliada sua ação micobactericida sobre a micobactéria fagocitada por macrófagos. A ação micobactericida, do TAA sobre a viabilidade do *M. bovis*-BCG fagocitado, foi observada após 24 h de tratamento em todas as concentrações testadas (50 nM a 50 µM). É interessante notar que o TAA quando avaliado na infecção de macrófagos por *M. tuberculosis* não apresenta ação micobactericida na dose mais alta utilizada (70 µM), mas sim na menor dose (7,0 µM). Indicando que a substância na maior dose pode estar inibindo vias de morte da micobactéria pela célula hospedeira e que, possivelmente, na menor dose ocorra uma indução da célula hospedeira a promover a morte da micobactéria. Além disso, levantou-se a hipótese de que a substância, na maior dose, poderia estar promovendo a morte da célula hospedeira, já que derivados tiofenólicos são extremamente reativos e conhecidos por sua ação tóxica (Wade 1999, Hudson et al. 1989). Foi avaliada a citotoxicidade do TAA em macrófagos e em células Vero e observamos que nenhuma das concentrações avaliadas é capaz de promover a morte das células eucarióticas. Em macrófagos a concentração mais alta avaliada foi de 500 µM onde a sobrevivência celular foi de 95%. Ao compararmos com a concentração necessária para diminuir em 10 vezes o número de UFC (5,0 µM) observamos que o TAA mantém sua especificidade citotóxica à célula micobacteriana.

Como próximo passo foi avaliado se o TAA mantinha sua capacidade antimicrobiana quando administrado por via oral a camundongos C57BL/6 no modelo de pleurisia induzida pelo *M. bovis*-BCG. O pré-tratamento por via oral atuou já no tempo inicial de 6 h, quando observamos uma ligeira diminuição no número de UFC, indicando a rápida absorção da substância pelo trato gastrointestinal, fato que ocorre, provavelmente devido ao pequeno tamanho da molécula e sua lipofilicidade. Após 24 h da infecção o grupo tratado tem número de UFC bem inferior ao grupo controle, de acordo com os resultados *in vitro*. Na avaliação do tempo de 15 dias após a infecção ainda é possível observar a contenção da infecção. Este fato é interessante já que o tratamento foi realizado numa única dose. Farmacocineticamente consideramos pouco provável que a substância ainda estivesse circulante, entretanto mais estudos devem ser realizados, já que se sabe que muitas substâncias lipofílicas se acumulam no tecido adiposo e são liberadas lentamente na corrente sanguínea. Este dado, porém, pode ser um indicativo de que o TAA estaria atuando sobre a resposta imune do camundongo contra o *M. bovis*-BCG e não apenas diretamente sobre a micobactéria. O TAA se mostrou capaz de promover a morte do *M. bovis*-BCG tanto *in vitro* quanto *in vivo*. É importante ressaltar que assim como a rifampicina, um dos antibióticos que compõe o esquema de

tratamento da tuberculose (Arakaki-Sanchez and Brito 2011), o TAA diminuiu em torno de 10 vezes o número de UFC após 24 h de tratamento.

O presente trabalho foi capaz de demonstrar que o TAA é capaz de matar a micobactéria *in vitro* e *in vivo*. Nossas análises demonstraram que além da atividade bactericida é possível que o TAA tenha ação sobre a célula hospedeira. Por conseguinte estudamos o efeito anti-inflamatório do TAA na resposta induzida pelo *M. bovis*-BCG. Avaliando a estrutura do TAA observa-se que entre o anel benzênico e o anel tiofênico à presença de um grupamento acetamida. Trabalhos da literatura indicam que a adição do grupo acetamida a anéis aromáticos confere caráter anti-inflamatório à molécula. No modelo experimental de edema de pata induzido por formalina, observou-se que as acetamidas aromáticas aumentavam a sensibilidade à dor, apesar do edema mostrar-se diminuído. O efeito anti-inflamatório apresentado está associado a presença de amidas secundárias ou nitrilas que quando substituídas por cetonas e amidas terciárias não confere o mesmo caráter à molécula (Casadio et al. 1965, Pala et al. 1965).

O modelo *in vivo* de pleurisia induzida pelo *M. bovis*-BCG é um modelo experimental inflamatório, bem estabelecido e estudado (Menezes-de-Lima-Júnior et al. 1997, Menezes-de-Lima-Júnior and Henriques M das 1997, Werneck-Barroso et al. 2000, Souza et al. 2008, D'Avila et al. 2008), caracterizado por um influxo de neutrófilos 4 h após a infecção seguida de um acúmulo progressivo de células mononucleares (como macrófagos) e eosinófilos em 24 h. Além disso, foi descrito que 15 dias após a infecção ocorre um segundo pico leucocitário, com a presença de neutrófilos e células mononucleares (Menezes-de-Lima-Júnior et al. 1997, Souza et al. 2008). Portanto além da avaliação da ação bactericida, avaliamos a ação sobre a modulação do processo inflamatório no hospedeiro, através da dosagem de mediadores e ainda se o tratamento com o TAA seria capaz de alterar o perfil leucocitário na cavidade pleural. Observamos que não há alteração na quantidade total de leucócitos na cavidade, 24 h após o tratamento com TAA (50 mg/kg). De maneira semelhante observa-se que o tratamento não altera o acúmulo de células mononucleares, e apesar de tender a um aumento não se observou diferença significativa no acúmulo de eosinófilos, na cavidade pleural. Observamos que no tempo de 24 h há um acúmulo de neutrófilos, na cavidade pleural, após a infecção pelo *M. bovis*-BCG e que o tratamento com TAA (50 mg/kg) diminuiu esse acúmulo, assim como o tratamento com rifampicina, indicando que a migração de neutrófilos está relacionada a viabilidade da micobactéria. Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao foco infeccioso e promovem ativação e migração de monócitos, havendo liberação de diversos mediadores químicos que ampliam o processo inflamatório, além de, diretamente, fagocitar a micobactéria e auxiliar na contenção da infecção (Savill et al. 1989). Como o tratamento com

o TAA, no modelo de pleurisia induzida por *M. bovis*-BCG, foi capaz de diminuir o influxo de neutrófilos fomos avaliar a ação do TAA sobre a resposta inflamatória promovida pela infecção micobacteriana.

O sistema imune hospedeiro interage com microrganismos invasores de forma dinâmica e plástica, com o intuito de defender-se ao primeiro contato e armazenar a memória dos mecanismos de defesa que desenvolveu, caso haja uma posterior infecção. Entretanto as micobactérias desenvolveram mecanismos de escape ao sistema imune hospedeiro que vão além da inibição de sua esterilização. Micobactérias são capazes de se utilizar de mecanismos fisiológicos do hospedeiro para benefício próprio e consequente manutenção da infecção (Hughes and Sperandio 2008, Rasmussen, Reinert, and Paludan 2009). Os benefícios da imunomodulação do hospedeiro, como um complemento ao tratamento de pacientes infectados com TB foram relatados anteriormente (Hawn et al. 2013). A interação entre o patógeno e o hospedeiro é tão complexa e diversa que alguns autores têm proposto um ciclo de vida imunológico do *M. tuberculosis* no interior do hospedeiro, onde a micobactéria seria capaz de expressar ou suprimir vários genes que levam a diferentes estados, como dormência.

Estudos preliminares de avaliação de similaridade entre molécula e ligante (SEA) (Keiser et al. 2007) foram realizados. Como demonstrado na **Tabela 7.1.**, há probabilidade de interação de ligação do TAA com proteínas envolvidas na resposta inflamatória.

TABELA 7.1: Proteínas alvo de interesse e probabilidade de interação com o TAA

Proteína alvo	Valor-E	TC-Máximo
JNK-1	1.58×10^{-12}	0.58
nNOS	4.22×10^{-8}	0.31
ACAT-2	5.46×10^{-8}	0.38
eNOS	3.07×10^{-5}	0.31
JNK-3	3.05×10^{-2}	0.53
NF-κB	2.01×10^0	0.50

Tabela 7.1.: A probabilidade estatística de interação entre as proteínas alvo de interesse e o TAA foi calculada através de SEA (Keiser et al. 2007). O valor-E é o valor calculado a partir do teste Z (Zhang, Chung, and Oldenburg 1999), quanto menor o valor-E maior é a chance de interação entre ligante e alvo. O Tc (coeficiente de Tanimoto) máximo se refere a similaridade química entre o TAA e ligantes já descritos que interagem com a proteína alvo, valores de Tc > 0,57 são considerados como alta probabilidade de interação (Keiser et al. 2007).

No presente trabalho foi avaliada a ação do TAA sobre os mecanismos utilizados pelas micobactérias para a persistência da infecção. Conforme o estudo estatístico indicou, o TAA possivelmente atua na indução (ou inibição) das JNK-1,3 da e-NOS, da n-NOS, da ACAT-2 e ainda do NF-κB. O presente estudo foi realizado em macrófagos e no sistema imune de camundongos, visando observar, de que forma essa substância seria capaz de auxiliar na resolução da infecção, e principalmente, na resolução do processo inflamatório causado tanto pela micobactéria viva quanto pela micobactéria morta (Hume et al. 2001). Diversos mediadores químicos são liberados pelas células do sistema imune, durante a infecção por micobactérias e muitos desses, permanecem *in situ* mesmo após a morte da micobactéria, desencadeando um processo inflamatório intenso e prejudicial ao indivíduo (Dinarello 2010), e que muitas vezes impede a esterilização completa.

Inicialmente foi avaliada a liberação de NO por macrófagos infectados com o *M. bovis*-BCG e o efeito do TAA na liberação deste mediador por estas células, já que o NO atua no controle do crescimento e sobrevivência de micobactérias tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular de macrófagos, neutrófilos e outras células (Chan et al. 1992, MacMicking, Xie, and Nathan 1997). O aumento de NO tem sido bem descrito como um fenômeno característico de infecções micobacterianas, incluindo o ensaio de pleurisia induzida pelo *M. bovis*-BCG (Chan et al. 2001). Foi possível verificar uma diminuição significativa na dosagem de nitrito e dado semelhante foi observado após o tratamento dos macrófagos com rifampicina. Esses resultados são muito intrigantes, já que o NO é um mediador importante na defesa contra a infecção pelo *M. bovis*-BCG (Saito and Nakano 1996), indicando que o TAA além da ação bactericida promoveria uma diminuição do processo inflamatório. Esta ação do TAA pode ser explicada através do SEA do TAA, descrito acima, onde este poderia atuar como ligante à JNK-1 ou à JNK-3. Além disso, os tiofenos vêm sendo descritos como inibidores seletivos das três isoformas conhecidas de JNK e suas aplicações variam desde o tratamento de diabetes, à modulação da inflamação e tratamento de Alzheimer (De et al. 2011, Hom et al. 2010). Sabe-se que a iNOS, enzima responsável pela produção de NO em macrófagos, é regulada pela via das MKK-JNK (Chan et al. 2001), logo o TAA poderia estar atuando na inibição da JNK-1 em macrófagos, já que a JNK-3 é apenas encontrada no cérebro, inibindo a produção de NO através da inibição da iNOS. Observamos que o TAA, *in vivo* promove o aumento na liberação de NO em 24 h. Considerando os resultados da ação bactericida, podemos especular que em 24 h há um aumento de NO que auxilia na contenção da infecção a qual provavelmente declina após 24 h. Considerando as análises de SEA teorizamos que o TAA, *in vivo*, poderia estar atuando também sobre a eNOS, presente especialmente em células epiteliais e ausente em macrófagos (Ahlawat et al. 2014) já que a

pleura é uma cavidade extremamente vascularizada. O aumento de NO *in vivo* pode se dar, também, devido à viabilidade do *M. bovis*-BCG, já que o ensaio foi realizado com a micobactéria viva, sendo este um efeito secundário à ação bactericida. Observando a capacidade de atuar do TAA em diminuir o NO *in vitro* e promover seu aumento *in vivo* fomos avaliar se este tratamento seria capaz de modular outros mediadores importantes na resposta inflamatória à micobactéria.

Além do NO, inúmeras outras citocinas e quimiocinas participam da resolução da infecção por micobactérias causando um processo inflamatório intenso, local e sistêmico (Collins and Kaufmann 2001, Russell 2001). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por macrófagos ativados. Durante a infecção por micobactérias, o macrófago libera TNF- α que promove o recrutamento de neutrófilos e células mononucleares para o local da infecção (Smart and Casale 1994). Promove a ativação do endotélio que produz moléculas de adesão e citocinas como IL-1 β . Durante a infecção o TNF- α atua auxiliando na contenção da infecção e do crescimento bacteriano através da indução de formação do granuloma (Flynn et al. 1995, Bean et al. 1999, Bekker et al. 2001, Kisich et al. 2002). Em infecções graves o estímulo é muito intenso e constante e o TNF- α é produzido em altíssimas concentrações que geram respostas anômalas no indivíduo como caquexia (perda de células musculares e adiposas) e perda de apetite, gerando distúrbios metabólicos, como hipoglicemia e indução da febre (Kindler et al. 1989, Tramontana et al. 1995, Bean et al. 1999). Nosso trabalho mostra que o tratamento com o TAA promove uma diminuição na liberação de TNF- α . Esta modulação pelo TAA se mostra importante quando comparado a dados da literatura que mostram que a neutralização parcial do sTNF- α (TNF- α solúvel) auxilia na formação precoce de granulomas (e consequente contenção da infecção) e na ativação de macrófagos, na infecção pelo *M. bovis*-BCG (Guler et al. 2005). Além disso, o TNF- α atua em sinergia com o IFN- γ , ativando os mecanismos microbicidas dos macrófagos, como a produção de NO e do próprio TNF- α , auxiliando na contenção da infecção (Champsi, Bermudez, and Young 1994). Sendo assim a diminuição do TNF- α pelo TAA se torna relevante nesse processo.

O IFN- γ exerce inúmeras funções na resolução da infecção. Além de atuar em conjunto com o TNF- α , tem importante papel na indução do processamento e apresentação do antígeno. E ainda, sua presença induz a liberação de NO por macrófagos infectados (Collins and Kaufmann 2001). Estudos mostram que camundongos nocaute para IFN- γ são muito mais suscetíveis a infecções por diversos patógenos (van de Vosse and van Agtmael 2007). Nossos resultados *in vivo* nos mostram que em 24 h após a infecção há uma diminuição significativa na liberação de IFN- γ nos grupos tratados com TAA demonstrando ação semelhante à da

rifampicina. Esses dados podem sugerir que a produção desta citocina esteja relacionada a presença de bactérias viáveis.

A IL-12 é uma importante citocina envolvida no processo inflamatório decorrente da infecção por micobactérias e assim como o TNF- α está relacionada diretamente a produção de IFN- γ . É produzida por macrófagos e outras APCs, ativados pelo contato do antígeno patogênico com as mesmas. A IL-12 é capaz de induzir a liberação de IFN- γ por linfócitos T (Nolt and Flynn 2004), e tem importante papel na diferenciação e expansão de linfócitos Th1, fazendo a conexão entre resposta imune inata e adaptativa. Induz a produção de grandes quantidades de IFN- γ e inibe a liberação de IL-17 (van de Vosse and van Agtmael 2007, Brombacher, Kastelein, and Alber 2003). Em nosso trabalho avaliamos qual seria a ação do tratamento com TAA em macrófagos infectados. Observamos que nessas condições os macrófagos diminuem a liberação da IL-12, provavelmente promovendo uma regulação negativa. Observamos que *in vivo*, no lavado pleural recolhido após 24 h da infecção, assim como *in vitro*, o TAA é capaz de inibir a liberação de IL-12. Corroborando com os dados da literatura (Brombacher, Kastelein, and Alber 2003), observamos que IL-12 e IFN- γ estão intimamente relacionados na contenção da infecção por *M. bovis*-BCG em camundongos e que o tratamento com TAA induz a modulação desse processo. Observamos que após 24 h da infecção pleural quando já são observadas evidências da contenção da micobactéria, há diminuição do IFN- γ e consequente diminuição de IL-12.

Outra citocina analisada *in vitro* e *in vivo* foi a IL-6. É uma citocina pluripotente que atua tanto na imunidade natural, estimulando a produção de neutrófilos na medula, quanto na imunidade adquirida, estimulando a maturação de linfócitos B. É sintetizada por fagócitos, células endoteliais e fibroblastos, em respostas a microrganismos e a outras citocinas como TNF- α e IL-1 β (Kishimoto 2010). Experimentos com camundongos nocautes pra IL-6 mostram que esses animais se tornam muito mais susceptíveis a patógenos intracelulares e não a parasitos como o *Schistosoma mansoni* (van de Vosse and van Agtmael 2007). Evidências indicam que a IL-6 está relacionada à exacerbação da resposta inflamatória, na cronificação e no desenvolvimento de doenças autoimunes, como a artrite reumatóide, através da ativação de linfócitos Th17 e supressão de linfócitos T reguladores (Kishimoto 2010). Avaliamos se o tratamento com TAA seria capaz de modular a IL-6 durante a infecção por *M. bovis*-BCG. Observamos, *in vitro*, que o macrófago tratado com TAA tem seus níveis de IL-6 significativamente reduzidos. Fomos então avaliar se *in vivo* o TAA também seria capaz de modular os níveis de IL-6. Observamos que assim como na liberação NO o tratamento com TAA induz a liberação de IL-6. No intuito de avaliar se a ação do TAA era direta sobre a IL-6 ou via estimulação/inibição de outro estímulo, fomos avaliar se *in vivo*, a IL-1 β estava sendo

modulada. A IL-1 β é um mediador da resposta imune local, em resposta a infecções, atua sobre células endoteliais e linfócitos mediando sua adesão. Atua também, sistemicamente, na indução de IL-6 e conseqüentemente na proliferação de neutrófilos.

No presente trabalho observamos que o tratamento com TAA é capaz de modular a liberação de IL-1 β . Observamos que o tratamento com o TAA leva a uma diminuição nos níveis de IL-1 β . Este dado não coincide com os aumentos de IL-6 encontrados, indicando que a ação do TAA sobre a IL-6 não é via IL-1 β . A indução da IL-6 pode ocorrer por outras vias, como a indução via TNF- α ou via ativação direta do antígeno à célula hospedeira.

Após a avaliação da ação do TAA sobre a liberação dos mediadores citados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, considerou-se que o TAA provavelmente teria ação sobre o a translocação de NF- κ B. A infecção por micobactérias do MTC induz a translocação de NF- κ B para o núcleo na célula hospedeira. A translocação do fator para o núcleo promove a transcrição de diversas proteínas importantes na resposta à micobactérias incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e da iNOS (Morris et al. 2003, Islam et al. 2004, Blackwell and Christman 1997). Foi demonstrado no presente trabalho, de forma semi-quantitativa, que a infecção de macrófagos pelo *M. bovis*-BCG induziu a translocação do NF- κ B e que o tratamento com o TAA inibe sua translocação. Nossos dados indicam que a ação inibitória do TAA sobre esses mediadores, seria através da inibição da translocação do NF- κ B para o núcleo, já que coincide com a inibição da liberação de NO, de TNF- α , IL-12, IFN- γ e IL-1 β e também com os dados de SEA que indicam significativa interação direta entre TAA e NF- κ B. Além da ação direta do TAA sobre o fator poderia ocorrer sua ação indireta sobre a JNK-1 que também levaria a inibição da translocação de NF- κ B (Darieva et al. 2004) e conseqüente inibição da produção dos mediadores citados (Blackwell and Christman 1997).

Macrófagos ativados pela infecção bacteriana desencadeiam a modulação de lipídios celulares, além da liberação de citocinas e NO, com o intuito de eliminar a micobactéria. Sabe-se que CL atuam como reservatório de AA e sítio de produção de eicosanoides. São formados por estímulos extracelulares como o aumento do colesterol extracelular e durante processos infecciosos (Nicolaou, Goodall, and Erridge 2012). D'Avila (2006) descreveu que após a infecção por *M. bovis*-BCG observa-se um grande aumento de CL no interior dos macrófagos infectados, e ainda sua associação a TLR, a citocinas como IL-10 e TNF- α e ainda à PGE2 (D'Avila et al. 2006). Avaliamos, portanto, qual seria a ação do TAA na formação de CL induzidos pela infecção pelo *M. bovis*-BCG. Foi observado que a infecção de macrófagos por *M. bovis*-BCG induz a formação de CL que é reduzida pelo tratamento com o AAS e pelo tratamento com a rifampicina. Entretanto a substância em estudo, TAA, induz, significativamente, o aumento na formação desta organela. Fato que nos deixou intrigados, já

que o aumento no número de CL está relacionado com um mecanismo de escape da micobactéria. Uma das hipóteses levantadas para o observado seria o fato de estarmos utilizando uma coloração pelo tetróxido de ósmio. O tetróxido de ósmio cora lipídios totais e micobactérias apresentam espessa parede com diversos tipos de lipídios (Singh et al. 2010), portanto poderia haver a coloração não apenas de CL, mas também de micobactérias. Com intuito de elucidar a origem dos lipídios marcados pelo tetróxido de ósmio realizamos um ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpo α -ADRP (proteína relacionada com a diferenciação adiposa). O ADRP é uma proteína importante na construção e biogênese de CL é encontrada apenas em CL e em retículo endoplasmático (RE) de células de mamíferos. Portanto a marcação de ADRP é específica para CL e RE (Tansey et al. 2004, Robenek et al. 2006). Ao observamos as células que foram marcadas com anticorpo α -ADRP constatamos que o resultado é o mesmo daquele observado quando realizamos a coloração por tetróxido de ósmio. Acreditamos que esta ação é uma ação imunomoduladora independente da morte da micobactéria já que ao compararmos com a rifampicina, um antibiótico clássico anti-TB, observamos ações opostas. Entretanto observou-se que o tratamento com TAA em macrófagos infectados com *M. tuberculosis* promove uma diminuição significativa no número de CL. Diminuição dos CL coincide com a diminuição do número de UFC no interior do macrófago. Sabe-se que o *M. tuberculosis* é capaz de ativar vias na célula hospedeira, não ativadas pelo *M. bovis*-BCG e que essa característica está diretamente associada à virulência da cepa. Singh (2012) descreveu que a secreção de ESAT-6, proteína excretada por *M. tuberculosis* e não *M. bovis*-BCG, estaria diretamente relacionada a estimulação do receptor anti-lipolítico GPR109A (Singh et al. 2012). O *M. tuberculosis* ao promover a ativação da via anti-lipolítica promoveria o acúmulo de CL no interior de macrófagos, via que não ocorreria na infecção por *M. bovis*-BCG e que poderia estar sendo alterada pelo TAA já que observamos a inibição no acúmulo de CL apenas em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*.

É descrito que o aumento de CL está diretamente relacionado ao aumento de PGE2 (D'Avila et al. 2006) que por sua vez relaciona-se também ao aumento de IL-10 e na inibição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (Abraham et al. 1992, Mancini and Di Battista 2011). Como no presente trabalho foi observado que o tratamento com o TAA é capaz de inibir a produção de TNF- α e aumentar o acúmulo de CL em macrófagos infectados com o *M. bovis*-BCG, avaliamos a produção de PGE2 por macrófagos. A produção de PGE2 pode ocorrer no interior dos CL, evitando a ruptura de membranas celulares para obtenção do AA, que está armazenado na forma de éster no interior dessas organelas. O tratamento com o TAA inibiu a produção de PGE2 apesar do grande aumento na formação de CL. Apesar da aparente

contradição do dado, o TAA gera um aumento na produção de IL-10, o que explicaria a diminuição de PGE2, já que na presença de grandes quantidades de IL-10 ocorre a inibição da liberação de PGE2 (Moore et al. 2001).

Ao observamos que o tratamento com o TAA foi capaz de diminuir o número de UFC, coincidindo com a diminuição do número de CL e gerando a diminuição de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Levantamos hipótese relacionadas as vias de atuação no hospedeiro que o TAA poderia estar modulando. Entre os processos fisiológicos de controle da micobactéria pela célula hospedeira devemos ressaltar a inter-relação entre a formação de CL, ativação de PPAR- γ e autofagia.

O receptor PPAR- γ é reconhecido por participar de uma série de processos celulares. Incluindo a regulação de metabolismo lipídico, apoptose e na resposta inflamatória. Sua ativação é capaz de induzir uma intensa resposta anti-inflamatória em diversos tipos celulares, incluindo macrófagos (Almeida et al. 2012). Almeida (2014) demonstrou que a ativação de PPAR- γ , via TLR2, em macrófagos infectados com *M. bovis*-BCG leva a um acúmulo de CL e que a inibição de PPAR- γ promove uma diminuição significativa no número de CL o que levaria a uma contenção da infecção (Almeida et al. 2014). Nossos dados sugerem que o TAA utilizado no tratamento de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* estaria inibindo PPAR- γ , já que observamos a diminuição de CL nos macrófagos. Entretanto outros parâmetros foram observados apenas na infecção dos macrófagos por *M. bovis*-BCG, onde além de observamos a inibição da translocação de NF- κ B e aumento de citocinas com perfil anti-inflamatório como a IL-10 e diminuição de TNF- α , observamos também um aumento no acúmulo de CL. Definitivamente mais estudos devem ser realizados para esclarecer a importância do PPAR- γ na modulação produzida pelo tratamento com o TAA.

Com o intuito de elucidar por qual via fisiológica do hospedeiro o TAA poderia estar atuando, levantamos a hipótese de sua ação sobre a autofagia. A autofagia é um processo fisiológico importante na eliminação do *M. tuberculosis*. Foi descrito que a micobactéria é capaz de inibir a autofagia com intenção de inibir a morte micobacteriana (Gutierrez et al. 2004) e que a indução da autofagia por nitazoxanide (NTZ) promove a diminuição de UFC (Lam et al. 2012). Além disso, Singh (2012) demonstrou que a inibição de ACAT-1,2, por CI-976 conduz a inibição da formação de CL em macrófagos infectados com *M. tuberculosis* e que a micobactéria se encontrava co-localizada com o autofagossomo. Na ausência do inibidor, o *M. tuberculosis* foi observado co-localizado com CL e não havia nenhum sinal de autofagia (Singh et al. 2012) demonstrando a importância da autofagia na destruição de CL e consequente diminuição de lipídios disponíveis para o consumo micobacteriano. Teorizamos que o TAA poderia atuar sobre a enzima ACAT-2, inibindo-a, já que o ensaio SEA- indicou

grande probabilidade de interação entre o TAA e a enzima- e esta inibição levaria a inibição do acúmulo de CL, fato observado após a infecção com *M. tuberculosis* e posterior tratamento com o TAA, e possivelmente a indução da autofagia.

Levamos ainda a hipótese do TAA atuar sobre a interação da micobactéria com TLR. As vias de sinalização intracelular via TLR necessitam da associação a proteínas adaptadoras como o MyD88, necessária na ativação da cascata de TLR2 e 9 e que participa de uma das vias ativadas pelo TLR4 (Heldwein and Fenton 2002, Doherty and Arditi 2004). Sendo estas três importantes vias ativadas por micobactérias e que atuam na defesa do hospedeiro. Avaliamos o efeito da infecção por *M. bovis*-BCG sobre macrófagos nocautes para MyD88. A ideia originalmente era observar se os macrófagos MyD88 nocautes, infectados se comportariam de forma semelhante aquelas infectadas e tratadas, o que seria um indicativo sobre qual proteína o TAA poderia estar atuando. Entretanto observou-se que macrófagos nocautes para MyD88, infectados com *M. bovis*-BCG não apresentaram aumento na formação de CL, mas sim na liberação de PGE2. A indução de PGE2, provocada pelo *M. bovis*-BCG em macrófagos nocautes é exatamente oposta àquela observada em macrófagos tratados com o TAA. Esse dado indica que neste modelo e nesta dose de TAA o aumento ou inibição de PGE2 não está associado à formação dos CL e é independente de MyD88, indício de que nestas condições experimentais a indução/inibição de PGE2 poderia ser via TLR4 ou ainda independente da via de TLR.

Com intuito de elucidar se a ação micobactericida do TAA seria dependente da ação sobre o hospedeiro utilizamos como estímulo o *M. bovis*-BCG irradiado com radiação gama, eliminando assim a variável da ação micobactericida do TAA. Foi possível observar que a liberação, de TNF- α , IL-6 e PGE2, foi inibida assim como quando utilizado o estímulo com *M. bovis*-BCG vivo, entretanto observa-se que a indução de IL-10 não é mantida. Foi descrito que a micobactéria quando irradiada apesar de manter sua estrutura celular praticamente intacta há perda de LAM, que atuaria como indutor de uma resposta anti-inflamatória, agindo como um mecanismo de escape (Kang et al. 2005), indicando que o balanço entre PGE2 e IL-10 induzido pelo tratamento com o TAA é dependente da viabilidade da bactéria. Outros antibióticos são conhecidos por sua ação sobre o hospedeiro independente da ação bactericida. Como os macrolídeos que são conhecidos por sua ação anti-inflamatória independente de sua ação bactericida, o tratamento com roxitromicina, *in vivo*, levou a diminuição de PGE2 e *in vitro* observou-se a diminuição de IL-1 β , IL-6 e NO (Ianaro et al. 2000). Além disso, a rifampicina foi descrita por sua ação na inibição da autofagia induzida por rapamicina, também independente da ação bactericida (Park et al. 2008).

Nossos dados mostram que o TAA tem potente ação micobactericida sobre o *M. bovis*-BCG. Sua ação sobre o *M. tuberculosis* não é tão eficiente, entretanto é muito aumentada quando o *M. tuberculosis* encontra-se no interior de macrófagos. Além disso, o TAA se mostrou uma interessante ferramenta para o estudo da infecção por micobactérias com real possibilidade de melhora na ação através de mudanças nos ligantes ao anel tiofênico. Definitivamente mais estudos devem ser realizados para determinação de qual via o TAA é capaz de inibir o crescimento do *M. tuberculosis*. No entanto aqui nós mostramos uma substância que tem sua habilidade em matar o *M. tuberculosis*, melhorada pela interação com o hospedeiro sugerindo um importante alvo terapêutico a ser explorado. Levantamos ainda algumas hipóteses a respeito da via do hospedeiro que o TAA é capaz de modular auxiliando-o na esterilização do *M. tuberculosis*.

8. Conclusões

- O TAA foi capaz de matar micobactérias do MTC, não demonstrando atividade contra outras espécies bacterianas. O TAA é capaz de promover a morte de micobactérias em cultura (em fase exponencial de crescimento), *in vitro* (fagocitadas por macrófagos) e *in vivo* (no modelo de infecção pleural), sem gerar a toxicidade à célula hospedeira.

- O TAA é capaz de promover a resolução da inflamação causada pela infecção *in vivo* e *in vitro*, como a liberação de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como exemplificados na **Figura 8.1.a**. A ação do TAA parece estar relacionada à via de translocação de NF- κ B gerando inibição na transcrição de mediadores envolvidos na manutenção da infecção (**Figura 8.1.b**). Além disso, o tratamento com o TAA é capaz de alterar o acúmulo de CL e promove a morte da micobactéria, sugerindo que CL e suas vias de formação podem ser um importante alvo terapêutico no tratamento da tuberculose (**Figura 8.1.b**).

- Mudanças nos radicais ligados ao anel tiofênico geraram análogos com melhorias na potência contra o *M. tuberculosis*. Além disso, o TAA apresenta interessante aumento de potência contra a micobactéria fagocitada, ação não compartilhada por seu análogo. Interessantes características que podem ser exploradas objetivando um melhor fármaco para o tratamento da tuberculose

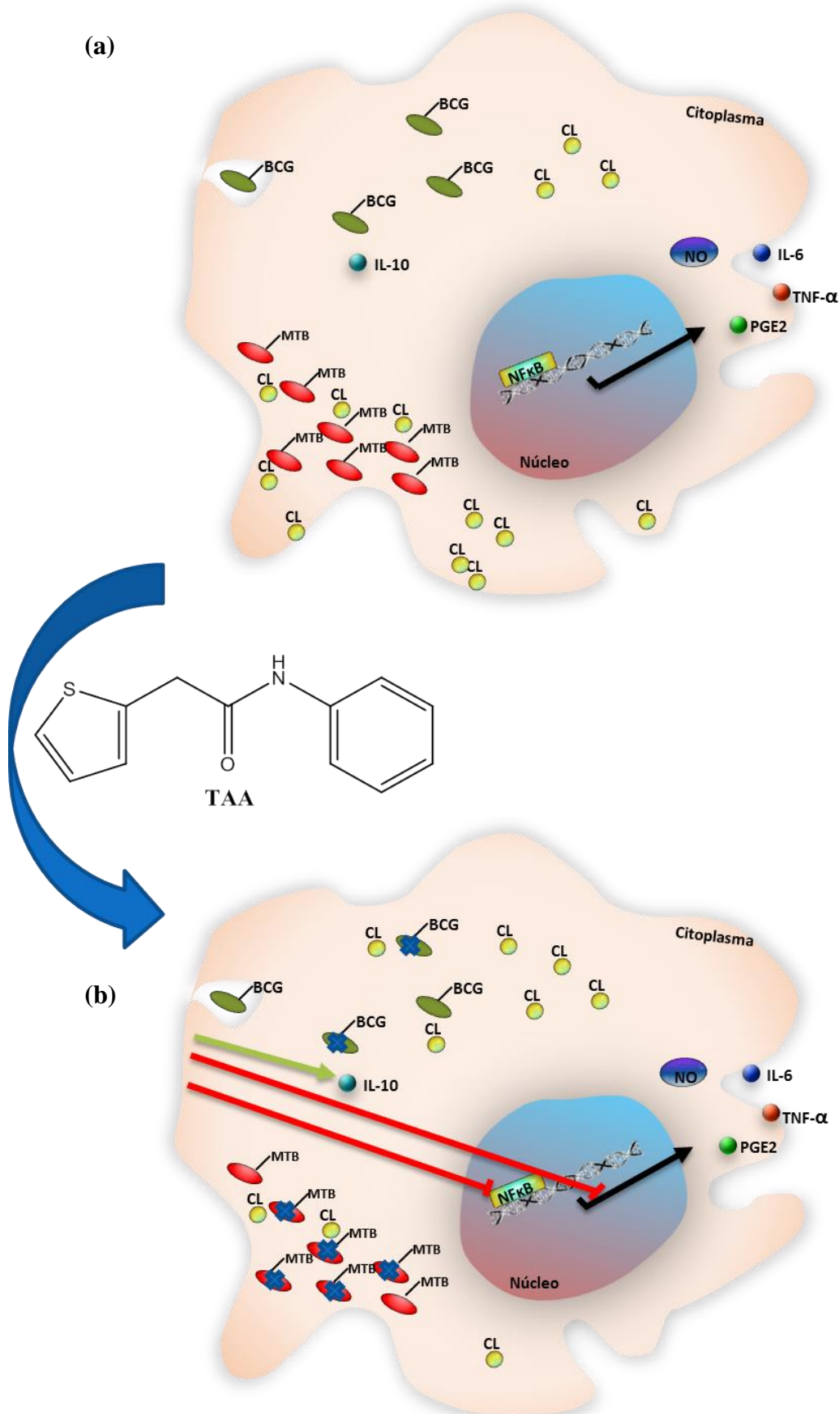


Figura 8.1: Representação gráfica: **(a)** da indução da liberação de citocinas e mediadores pró-inflamatórios e acúmulo de CL no citoplasma da célula hospedeira infectada por micobactérias do MTC; **(b)** da ação antimicobacteriana do TAA sobre a célula hospedeira infectada e sobre a inibição da translocação de NF-κB para o núcleo e liberação de mediadores inflamatórios e ainda alteração no acúmulo de CL.

9. Referências bibliográficas

- Abbas, Abul K., Andrew H. Lichtman, and Shiv Pillai. 2008. *Imunologia Celular e Molecular*. 6th ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Abraham, E. P., E. Chain, C. M. Fletcher, H. W. Florey, A. D. Gardner, N. G. Heatley, and M. A. Jennings. 1992. "Further observations on penicillin. 1941." *Eur J Clin Pharmacol* no. 42 (1):3-9.
- Agarwal, N., G. Lamichhane, R. Gupta, S. Nolan, and W. R. Bishai. 2009. "Cyclic AMP intoxication of macrophages by a Mycobacterium tuberculosis adenylate cyclase." *Nature* no. 460 (7251):98-102. doi: 10.1038/nature08123.
- Ahlawat, A., A. Rana, N. Goyal, and S. Sharma. 2014. "Potential role of nitric oxide synthase isoforms in pathophysiology of neuropathic pain." *Inflammopharmacology* no. 22 (5):269-78. doi: 10.1007/s10787-014-0213-0.
- Alexander, C., and E. T. Rietschel. 2001. "Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity." *J Endotoxin Res* no. 7 (3):167-202.
- Almeida, P. E., A. B. Carneiro, A. R. Silva, and P. T. Bozza. 2012. "PPAR γ Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing." *PPAR Res* no. 2012:383829. doi: 10.1155/2012/383829.
- Almeida, P. E., N. R. Roque, K. G. Magalhães, K. A. Mattos, L. Teixeira, C. Maya-Monteiro, C. J. Almeida, H. C. Castro-Faria-Neto, B. Ryffel, V. F. Quesniaux, and P. T. Bozza. 2014. "Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by Mycobacterium bovis BCG infection." *Biochim Biophys Acta* no. 1841 (1):97-107. doi: 10.1016/j.bbailip.2013.10.008.
- Alvarez, Nelson. 2010. Sanatório Naval de Nova Friburgo: Cem anos de presença da Marinha em nossa cidade. Nova Friburgo- RJ: Centro de documentação D. João VI- Pró Memória de Nova Friburgo.
- Andries, K., P. Verhasselt, J. Guillemont, H. W. Göhlmann, J. M. Neefs, H. Winkler, J. Van Gestel, P. Timmerman, M. Zhu, E. Lee, P. Williams, D. de Chaffoy, E. Huitric, S. Hoffner, E. Cambau, C. Truffot-Pernot, N. Lounis, and V. Jarlier. 2005. "A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis." *Science* no. 307 (5707):223-7. doi: 10.1126/science.1106753.
- Anes, E., P. Peyron, L. Staali, L. Jordao, M. G. Gutierrez, H. Kress, M. Hagedorn, I. Maridonneau-Parini, M. A. Skinner, A. G. Wildeman, S. A. Kalamidas, M. Kuehnel, and G. Griffiths. 2006. "Dynamic life and death interactions between Mycobacterium smegmatis and J774 macrophages." *Cellular microbiology* no. 8 (6):939-60.
- Arakaki-Sanchez, Denise, and Rossana Coimbra Brito. 2011. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. edited by Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação-Geral do Programa Nacional de Controle da and Tuberculose. Brasília: Editora MS – OS 2011/0109.
- Balasubramanian, V., S. Solapure, H. Iyer, A. Ghosh, S. Sharma, P. Kaur, R. Deepthi, V. Subbulakshmi, V. Ramya, V. Ramachandran, M. Balganes, L. Wright, D. Melnick,

- S. L. Butler, and V. K. Sambandamurthy. 2014. "Bactericidal activity and mechanism of action of AZD5847, a novel oxazolidinone for treatment of tuberculosis." *Antimicrob Agents Chemother* no. 58 (1):495-502. doi: 10.1128/AAC.01903-13.
- Balcewicz-Sablinska, M. K., J. Keane, H. Kornfeld, and H. G. Remold. 1998. "Pathogenic Mycobacterium tuberculosis evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha." *J Immunol* no. 161 (5):2636-41.
- Barry Iii, Clifton E., Richard E. Lee, Khisimusi Mdluli, Andrea E. Sampson, Benjamin G. Schroeder, Richard A. Slayden, and Ying Yuan. 1998. "Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions." *Progress in Lipid Research* no. 37 (2-3):143-179. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827\(98\)00008-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827(98)00008-3).
- Beamer, G. L., D. K. Flaherty, B. D. Assogba, P. Stromberg, M. Gonzalez-Juarrero, R. de Waal Malefyt, B. Vesosky, and J. Turner. 2008. "Interleukin-10 promotes Mycobacterium tuberculosis disease progression in CBA/J mice." *J Immunol* no. 181 (8):5545-50.
- Bean, A. G., D. R. Roach, H. Briscoe, M. P. France, H. Korner, J. D. Sedgwick, and W. J. Britton. 1999. "Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin." *J Immunol* no. 162 (6):3504-11.
- Bekker, L. G., S. Freeman, P. J. Murray, B. Ryffel, and G. Kaplan. 2001. "TNF-alpha controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways." *J Immunol* no. 166 (11):6728-34.
- Bhakta, S., G. S. Besra, A. M. Upton, T. Parish, C. Sholto-Douglas-Vernon, K. J. Gibson, S. Knutton, S. Gordon, R. P. DaSilva, M. C. Anderton, and E. Sim. 2004. "Arylamine N-acetyltransferase is required for synthesis of mycolic acids and complex lipids in Mycobacterium bovis BCG and represents a novel drug target." In *J Exp Med*, 1191-9. United States.
- Bi, Wei, Lihong Zhu, Chuanming Wang, Yanran Liang, Jun Liu, Qiaoyun Shi, and Enxiang Tao. 2011. "Rifampicin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation." *Brain Research* no. 1395 (0):12-20. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.04.019>.
- Blackwell, T. S., and J. W. Christman. 1997. "The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation." *Am J Respir Cell Mol Biol* no. 17 (1):3-9. doi: 10.1165/ajrcmb.17.1.f132.
- Bozza, P. T., K. G. Magalhães, and P. F. Weller. 2009. "Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation." *Biochim Biophys Acta* no. 1791 (6):540-51. doi: 10.1016/j.bbailip.2009.01.005.
- Brombacher, F., R. A. Kastelein, and G. Alber. 2003. "Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses." *Trends Immunol* no. 24 (4):207-12.
- Calmette, Albert. 1928. "LA PREMUNITION OU VACCINATION PREVENTIVE DES NOUVEAU-NÉS CONTRE LA TUBERCULOSE PAR LE BCG." *ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR* no. 42 (1):34.

- Casadio, S, G Pala, T Bruzzese, E Crescenzi, E Marazzi-Uberti, and G Coppi. 1965. "Synthesis and pharmacological evaluation of alpha,alpha-disubstituted derivatives of phenylacetamide and 1-naphthylacetamide." *J Med Chem* no. 8 (5):594-8.
- Champagne, D. E., J. T. Arnason, B. J. Philogène, P. Morand, and J. Lam. 1986. "Light-mediated allelochemical effects of naturally occurring polyacetylenes and thiophenes from asteraceae on herbivorous insects." *J Chem Ecol* no. 12 (4):835-58. doi: 10.1007/BF01020255.
- Champsi, JH, LE Bermudez, and LS Young. 1994. "The role of cytokines in mycobacterial infection." *Biotherapy* no. 7 (3-4):187-93.
- Chan, E. D., K. R. Morris, J. T. Belisle, P. Hill, L. K. Remigio, P. J. Brennan, and D. W. Riches. 2001. "Induction of inducible nitric oxide synthase-NO* by lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis is mediated by MEK1-ERK, MKK7-JNK, and NF-kappaB signaling pathways." *Infect Immun* no. 69 (4):2001-10. doi: 10.1128/IAI.69.4.2001-2010.2001.
- Chan, J., Y. Xing, R. S. Magliozzo, and B. R. Bloom. 1992. "Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages." *J Exp Med* no. 175 (4):1111-22.
- Clay, H., H. E. Volkman, and L. Ramakrishnan. 2008. "Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death." *Immunity* no. 29 (2):283-94. doi: 10.1016/j.immuni.2008.06.011.
- Collins, HL, and SH Kaufmann. 2001. "The many faces of host responses to tuberculosis." *Immunology* no. 103 (1):1-9. doi: imm1236 [pii].
- D'Avila, H., R. C. Melo, G. G. Parreira, E. Werneck-Barroso, H. C. Castro-Faria-Neto, and P. T. Bozza. 2006. "Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo." *J Immunol* no. 176 (5):3087-97.
- D'Avila, H., N. R. Roque, R. M. Cardoso, H. C. Castro-Faria-Neto, R. C. Melo, and P. T. Bozza. 2008. "Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages." *Cellular microbiology* no. 10 (12):2589-604.
- Daniel, T. M. 2006. "The history of tuberculosis." *Respir Med* no. 100 (11):1862-70. doi: 10.1016/j.rmed.2006.08.006.
- Darieva, Z, EB Lasunskaja, MN Campos, TL Kipnis, and WD Da Silva. 2004. "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and c-Jun-N-terminal kinase cascades enhances NF-kappaB-dependent gene transcription in BCG-stimulated macrophages through promotion of p65/p300 binding." *J Leukoc Biol* no. 75 (4):689-97. doi: jlb.0603280 [pii]
- 10.1189/jlb.0603280.
- De, S. K., E. Barile, V. Chen, J. L. Stebbins, J. F. Cellitti, T. Machleidt, C. B. Carlson, L. Yang, R. Dahl, and M. Pellecchia. 2011. "Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of thiophene-3-carboxamide derivatives as dual inhibitors of the c-

- Jun N-terminal kinase." *Bioorg Med Chem* no. 19 (8):2582-8. doi: 10.1016/j.bmc.2011.03.017.
- de Souza, M. V. 2006. "Current status and future prospects for new therapies for pulmonary tuberculosis." *Curr Opin Pulm Med* no. 12 (3):167-71. doi: 10.1097/01.mcp.0000219264.42686.c9.
- de Souza, Marcus Vinícius Nora, and Thatyana Rocha Alves Vasconcelos. 2005. "Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro." *Química Nova* no. 28 (4):678-682.
- de Souza, MV, Mde L Ferreira, AC Pinheiro, MF Saraiva, MV de Almeida, and MS Valle. 2008. "Synthesis and biological aspects of mycolic acids: an important target against *Mycobacterium tuberculosis*." *ScientificWorldJournal* no. 8:720-51. doi: 10.1100/tsw.2008.99.
- Denis, M, DN Wedlock, and BM Buddle. 2005. "IFN-gamma enhances bovine macrophage responsiveness to *Mycobacterium bovis*: Impact on bacterial replication, cytokine release and macrophage apoptosis." *Immunol Cell Biol* no. 83 (6):643-50. doi: ICB1386 [pii]
- 10.1111/j.1440-1711.2005.01386.x.
- Diacon, AH, A Pym, M Grobusch, R Patientia, R Rustomjee, L Page-Shipp, C Pistorius, R Krause, M Bogoshi, G Churchyard, A Venter, J Allen, JC Palomino, T De Marez, RP van Heeswijk, N Lounis, P Meyvisch, J Verbeeck, W Parys, K de Beule, K Andries, and DF Mc Neeley. 2009. "The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis." *N Engl J Med* no. 360 (23):2397-405. doi: 360/23/2397 [pii]
- 10.1056/NEJMoa0808427.
- Dinarello, C. A. 2010. "Anti-inflammatory Agents: Present and Future." *Cell* no. 140 (6):935-50. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.043.
- Doherty, TM, and M Arditi. 2004. "TB, or not TB: that is the question -- does TLR signaling hold the answer?" *J Clin Invest* no. 114 (12):1699-703. doi: 10.1172/JCI23867.
- Dorman, SE, JL Johnson, S Goldberg, G Muzanye, N Padayatchi, L Bozeman, CM Heilig, J Bernardo, S Choudhri, JH Grosset, E Guy, P Guyadeen, MC Leus, G Maltas, D Menzies, EL Nuermberger, M Villarino, A Vernon, RE Chaisson, and Tuberculosis Trials Consortium. 2009. "Substitution of moxifloxacin for isoniazid during intensive phase treatment of pulmonary tuberculosis." *Am J Respir Crit Care Med* no. 180 (3):273-80. doi: 200901-0078OC [pii]
- 10.1164/rccm.200901-0078OC.
- Dowdy, D. W., J. E. Golub, R. E. Chaisson, and V. Saraceni. 2012. "Heterogeneity in tuberculosis transmission and the role of geographic hotspots in propagating epidemics." *Proc Natl Acad Sci U S A* no. 109 (24):9557-62. doi: 10.1073/pnas.1203517109.
- Ellis, R. C., and L. A. Zabrowarny. 1993. "Safer staining method for acid fast bacilli." *J Clin Pathol* no. 46 (6):559-60.

- Ernst, JD. 1998. "Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis." *Infect Immun* no. 66 (4):1277-81.
- Fleming, Alexander. 1929. "On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. influenza." *British Journal of Experimental Pathology* (10):10.
- Floss, HG, and TW Yu. 2005. "Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis." *Chem Rev* no. 105 (2):621-32. doi: 10.1021/cr030112j.
- Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak, and B. R. Bloom. 1995. "Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice." *Immunity* no. 2 (6):561-72.
- Fremond, C. M., D. Togbe, E. Doz, S. Rose, V. Vasseur, I. Maillet, M. Jacobs, B. Ryffel, and V. F. Quesniaux. 2007. "IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to Mycobacterium tuberculosis infection." *J Immunol* no. 179 (2):1178-89.
- Gler, M. T., V. Skripconoka, E. Sanchez-Garavito, H. Xiao, J. L. Cabrera-Rivero, D. E. Vargas-Vasquez, M. Gao, M. Awad, S. K. Park, T. S. Shim, G. Y. Suh, M. Danilovits, H. Ogata, A. Kurve, J. Chang, K. Suzuki, T. Tupasi, W. J. Koh, B. Seaworth, L. J. Geiter, and C. D. Wells. 2012. "Delamanid for multidrug-resistant pulmonary tuberculosis." *N Engl J Med* no. 366 (23):2151-60. doi: 10.1056/NEJMoa1112433.
- Gomez, J. E., and J. D. McKinney. 2004. "M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance." *Tuberculosis (Edinb)* no. 84 (1-2):29-44.
- Gordon, S. 2007. "The macrophage: past, present and future." *Eur J Immunol* no. 37 Suppl 1:S9-17. doi: 10.1002/eji.200737638.
- Guler, R., M. L. Olleros, D. Vesin, R. Parapanov, and I. Garcia. 2005. "Differential effects of total and partial neutralization of tumor necrosis factor on cell-mediated immunity to Mycobacterium bovis BCG infection." *Infect Immun* no. 73 (6):3668-76. doi: 10.1128/IAI.73.6.3668-3676.2005.
- Gutierrez, M. G., S. S. Master, S. B. Singh, G. A. Taylor, M. I. Colombo, and V. Deretic. 2004. "Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages." *Cell* no. 119 (6):753-66. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.038.
- Haagsma, A. C., I. Podasca, A. Koul, K. Andries, J. Guillemont, H. Lill, and D. Bald. 2011. "Probing the interaction of the diarylquinoline TMC207 with its target mycobacterial ATP synthase." *PLoS One* no. 6 (8):e23575. doi: 10.1371/journal.pone.0023575.
- Hawn, T. R., A. I. Matheson, S. N. Maley, and O. Vandal. 2013. "Host-directed therapeutics for tuberculosis: can we harness the host?" *Microbiol Mol Biol Rev* no. 77 (4):608-27. doi: 10.1128/MMBR.00032-13.
- Heldwein, KA, and MJ Fenton. 2002. "The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection." *Microbes Infect* no. 4 (9):937-44. doi: S1286457902016118 [pii].

- Henriques, MG, VB Weg, MA Martins, PM Silva, PD Fernandes, RS Cordeiro, and BB Vargaftig. 1990. "Differential inhibition by two hetrazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse." *Br J Pharmacol no.* 99 (1):164-8.
- Hershkovitz, I., H. D. Donoghue, D. E. Minnikin, G. S. Besra, O. Y. Lee, A. M. Gernaey, E. Galili, V. Eshed, C. L. Greenblatt, E. Lemma, G. K. Bar-Gal, and M. Spigelman. 2008. "Detection and molecular characterization of 9,000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean." *PLoS One no.* 3 (10):e3426. doi: 10.1371/journal.pone.0003426.
- Hom, R. K., S. Bowers, J. M. Sealy, A. P. Truong, G. D. Probst, M. L. Neitzel, R. J. Neitz, L. Fang, L. Brogley, J. Wu, A. W. Konradi, H. L. Sham, G. Tóth, H. Pan, N. Yao, D. R. Artis, K. Quinn, J. M. Sauer, K. Powell, Z. Ren, F. Bard, T. A. Yednock, and I. Griswold-Prenner. 2010. "Design and synthesis of disubstituted thiophene and thiazole based inhibitors of JNK." *Bioorg Med Chem Lett no.* 20 (24):7303-7. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.10.066.
- Horton, T. M., S. M. Blaney, A. M. Langevin, J. Kuhn, B. Kamen, S. L. Berg, M. Bernstein, and S. Weitman. 2005. "Phase I trial and pharmacokinetic study of raltitrexed in children with recurrent or refractory leukemia: a pediatric oncology group study." *Clin Cancer Res no.* 11 (5):1884-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1676.
- Houben, E.N.G., L. Nguyen, and J. Pieters. 2006. "Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system." *Current Opinion in Microbiology no.* 9 (1):76-85. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2005.12.014>.
- Hudson, J.B., E.A. Graham, N. Miki, G.H.N. Towers, L.L. Hudson, R. Rossi, A. Carpita, and D. Neri. 1989. "Photoactive antiviral and cytotoxic activities of synthetic thiophenes and their acetylenic derivatives " *Chemosphere no.* Volume 19 (Issues 8-9):Pages 1329-1343. doi: 10.1016/0045-6535(89)90080-5.
- Hughes, DT, and V Sperandio. 2008. "Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts." *Nat Rev Microbiol no.* 6 (2):111-20. doi: nrmicro1836 [pii] 10.1038/nrmicro1836.
- Hume, D. A., D. M. Underhill, M. J. Sweet, A. O. Ozinsky, F. Y. Liew, and A. Aderem. 2001. "Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state." *BMC Immunol no.* 2:11.
- Ianaro, A., A. Ialenti, P. Maffia, L. Sautebin, L. Rombolà, R. Carnuccio, T. Iuvone, F. D'Acquisto, and M. Di Rosa. 2000. "Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics." *J Pharmacol Exp Ther no.* 292 (1):156-63.
- Islam, N, AR Kanost, L Teixeira, J Johnson, R Hejal, H Aung, RJ Wilkinson, CS Hirsch, and Z Toossi. 2004. "Role of cellular activation and tumor necrosis factor-alpha in the early expression of *Mycobacterium tuberculosis* 85B mRNA in human alveolar macrophages." *J Infect Dis no.* 190 (2):341-51. doi: JID31836 [pii] 10.1086/421522.
- Ivanyi, J., and A. Zumla. 2013. "Nonsteroidal antiinflammatory drugs for adjunctive tuberculosis treatment." *J Infect Dis no.* 208 (2):185-8. doi: 10.1093/infdis/jit153.

- Jagadish, E.R., S. Mohan, J. Saravanan, D. Satyendra, S.P. Swetha, T. Apurba, K. Manoj, and K.S. Rama. 2013. "Synthesis and in-vitro Anti-platelet aggregation activity of some New substituted Thiophenes." *Hygeia.J.D.Med. no. 5 (2):87-96.*
- Jha, K. K., S. Kumar, I. Tomer, and R. Mishra. 2012. "Thiophene: The molecule of diverse medicinal importance." *Journal of Pharmacy Research no. 5 (1):560-566.*
- Kang, P. B., A. K. Azad, J. B. Torrelles, T. M. Kaufman, A. Beharka, E. Tibesar, L. E. DesJardin, and L. S. Schlesinger. 2005. "The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis." *J Exp Med no. 202 (7):987-99. doi: 10.1084/jem.20051239.*
- Kawai, T., and S. Akira. 2010. "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol no. 11 (5):373-84. doi: 10.1038/ni.1863.*
- Kawai, T., and S. Akira. 2011. "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." *Immunity no. 34 (5):637-50. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.*
- Keiser, M. J., B. L. Roth, B. N. Armbruster, P. Ernsberger, J. J. Irwin, and B. K. Shoichet. 2007. "Relating protein pharmacology by ligand chemistry." *Nat Biotechnol no. 25 (2):197-206. doi: 10.1038/nbt1284.*
- Kindler, V., A. P. Sappino, G. E. Grau, P. F. Piguet, and P. Vassalli. 1989. "The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection." *Cell no. 56 (5):731-40.*
- Kishimoto, T. 2010. "IL-6: from its discovery to clinical applications." *Int Immunol no. 22 (5):347-52. doi: 10.1093/intimm/dxq030.*
- Kisich, K. O., M. Higgins, G. Diamond, and L. Heifets. 2002. "Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of Mycobacterium tuberculosis by human neutrophils." *Infect Immun no. 70 (8):4591-9.*
- Klopper, M., R. M. Warren, C. Hayes, N. C. Gey van Pittius, E. M. Streicher, B. Müller, F. A. Sirgel, M. Chabula-Nxiweni, E. Hoosain, G. Coetzee, P. David van Helden, T. C. Victor, and A. P. Trolip. 2013. "Emergence and spread of extensively and totally drug-resistant tuberculosis, South Africa." *Emerg Infect Dis no. 19 (3):449-55. doi: 10.3201//EID1903.120246.*
- Koch, Robert. 1891. *Über bakteriologische Forschung. In X. Internationalen Medizinischen Kongresses, Berlin 1890. Berlin: August Hirschwald.*
- Korolkovas, Andrejus, and Francisco Faustino de Albuquerque Carneiro de França. 2009/2010. *Dicionário Terapêutico Guanabara. 16.ed. ed. Rio de Janeiro- RJ- Brasil: Editora Guanabara Koogan S.A.*
- Lam, K. K., X. Zheng, R. Forestieri, A. D. Balgi, M. Nodwell, S. Vollett, H. J. Anderson, R. J. Andersen, Y. Av-Gay, and M. Roberge. 2012. "Nitazoxanide stimulates autophagy and inhibits mTORC1 signaling and intracellular proliferation of Mycobacterium tuberculosis." *PLoS Pathog no. 8 (5):e1002691. doi: 10.1371/journal.ppat.1002691.*
- Lee, M., J. Lee, M. W. Carroll, H. Choi, S. Min, T. Song, L. E. Via, L. C. Goldfeder, E. Kang, B. Jin, H. Park, H. Kwak, H. Kim, H. S. Jeon, I. Jeong, J. S. Joh, R. Y. Chen, K. N.

- Olivier, P. A. Shaw, D. Follmann, S. D. Song, J. K. Lee, D. Lee, C. T. Kim, V. Dartois, S. K. Park, S. N. Cho, and C. E. Barry. 2012. "Linezolid for treatment of chronic extensively drug-resistant tuberculosis." *N Engl J Med* no. 367 (16):1508-18. doi: 10.1056/NEJMoa1201964.
- Liew, F. Y., D. Xu, E. K. Brint, and L. A. O'Neill. 2005. "Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses." *Nat Rev Immunol* no. 5 (6):446-58. doi: 10.1038/nri1630.
- Lin, P. L., V. Dartois, P. J. Johnston, C. Janssen, L. Via, M. B. Goodwin, E. Klein, C. E. Barry, and J. L. Flynn. 2012. "Metronidazole prevents reactivation of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in macaques." *Proc Natl Acad Sci U S A* no. 109 (35):14188-93. doi: 10.1073/pnas.1121497109.
- Liu, Philip T., and Robert L. Modlin. 2008. "Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*." *Current Opinion in Immunology* no. 20 (4):371-376. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2008.05.014>.
- MacMicking, J., Q. W. Xie, and C. Nathan. 1997. "Nitric oxide and macrophage function." *Annu Rev Immunol* no. 15:323-50. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323.
- Mancini, A. D., and J. A. Di Battista. 2011. "The cardinal role of the phospholipase A(2)/cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase/prostaglandin E(2) (PCPP) axis in inflammotasis." *Inflamm Res* no. 60 (12):1083-92. doi: 10.1007/s00011-011-0385-7.
- Mani, S., W. Dou, and M. R. Redinbo. 2013. "PXR antagonists and implication in drug metabolism." *Drug Metab Rev* no. 45 (1):60-72. doi: 10.3109/03602532.2012.746363.
- Marles, R. J., J. B. Hudson, E. A. Graham, C. Soucy-Breau, P. Morand, R. L. Compadre, C. M. Compadre, G. H. Towers, and J. T. Arnason. 1992. "Structure-activity studies of photoactivated antiviral and cytotoxic tricyclic thiophenes." *Photochem Photobiol* no. 56 (4):479-87.
- Masunari, A., and L. C. Tavares. 2007. "A new class of nifuroxazide analogues: synthesis of 5-nitrothiophene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*." *Bioorg Med Chem* no. 15 (12):4229-36. doi: 10.1016/j.bmc.2007.03.068.
- Mdluli, K., T. Kaneko, and A. Upton. 2014. "Tuberculosis drug discovery and emerging targets." *Ann N Y Acad Sci*. doi: 10.1111/nyas.12459.
- Medzhitov, R. 2001. "Toll-like receptors and innate immunity." *Nat Rev Immunol* no. 1 (2):135-45. doi: 10.1038/35100529.
- Melo, R. C., H. D'Avila, H. C. Wan, P. T. Bozza, A. M. Dvorak, and P. F. Weller. 2011. "Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques." *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* no. 59 (5):540-56.
- Menezes-de-Lima-Júnior, O., and G. Henriques M das. 1997. "Mechanisms of cell accumulation induced by *Mycobacterium bovis* BCG." *Mem Inst Oswaldo Cruz* no. 92 Suppl 2:227-32.

- Menezes-de-Lima-Júnior, O., E. Werneck-Barroso, R. S. Cordeiro, and M. G. Henriques. 1997. "Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin in mouse pleurisy." *J Leukoc Biol* no. 62 (6):778-85.
- Mishra, R., I. Tomer, and S. Kumar. 2012. "Synthesis and antimicrobial evaluation of novel thiophene derivatives." *Der Pharmacia Sinica* no. 3 (3):332-336.
- Mitscher, LA. 2005. "Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents." *Chem Rev* no. 105 (2):559-92. doi: 10.1021/cr030101q.
- Mlambo, G., and L. B. Sigola. 2003. "Rifampicin and dexamethasone have similar effects on macrophage phagocytosis of zymosan, but differ in their effects on nitrite and TNF-alpha production." *Int Immunopharmacol* no. 3 (4):513-22. doi: 10.1016/S1567-5769(03)00022-5.
- Moncada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs. 1991. "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* no. 43 (2):109-42.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annu Rev Immunol* no. 19:683-765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
- Moreau, A., M. J. Vilarem, P. Maurel, and J. M. Pascussi. 2008. "Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response." *Mol Pharm* no. 5 (1):35-41. doi: 10.1021/mp700103m.
- Morris, KR, RD Lutz, HS Choi, T Kamitani, K Chmura, and ED Chan. 2003. "Role of the NF-kappaB signaling pathway and kappaB cis-regulatory elements on the IRF-1 and iNOS promoter regions in mycobacterial lipoarabinomannan induction of nitric oxide." *Infect Immun* no. 71 (3):1442-52.
- Mosmann, T. 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* no. 65 (1-2):55-63. doi: 0022-1759(83)90303-4 [pii].
- Mueller, P., and J. Pieters. 2006. "Modulation of macrophage antimicrobial mechanisms by pathogenic mycobacteria." *Immunobiology* no. 211 (6-8):549-56. doi: 10.1016/j.imbio.2006.06.004.
- Nicolaou, G., A. H. Goodall, and C. Erridge. 2012. "Diverse bacteria promote macrophage foam cell formation via Toll-like receptor-dependent lipid body biosynthesis." *J Atheroscler Thromb* no. 19 (2):137-48.
- Nikonenko, BV, M Protopopova, R Samala, L Einck, and CA Nacy. 2007. "Drug therapy of experimental tuberculosis (TB): improved outcome by combining SQ109, a new diamine antibiotic, with existing TB drugs." *Antimicrob Agents Chemother* no. 51 (4):1563-5. doi: AAC.01326-06 [pii]
- 10.1128/AAC.01326-06.
- Nolt, D, and JL Flynn. 2004. "Interleukin-12 therapy reduces the number of immune cells and pathology in lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun* no. 72 (5):2976-88.

- Nuermberger, EL, T Yoshimatsu, S Tyagi, K Williams, I Rosenthal, RJ O'Brien, AA Vernon, RE Chaisson, WR Bishai, and JH Grosset. 2004. "Moxifloxacin-containing regimens of reduced duration produce a stable cure in murine tuberculosis." *Am J Respir Crit Care Med no. 170* (10):1131-4. doi: 200407-885OC [pii]
- 10.1164/rccm.200407-885OC.
- Oishi, H, T Noto, H Sasaki, K Suzuki, T Hayashi, H Okazaki, K Ando, and M Sawada. 1982. "Thiolactomycin, a new antibiotic. I. Taxonomy of the producing organism, fermentation and biological properties." *J Antibiot (Tokyo) no. 35* (4):391-5.
- Ollinger, J., M. A. Bailey, G. C. Moraski, A. Casey, S. Florio, T. Alling, M. J. Miller, and T. Parish. 2013. "A Dual Read-Out Assay to Evaluate the Potency of Compounds Active against *Mycobacterium tuberculosis*." *PLoS One no. 8* (4):e60531. doi: 10.1371/journal.pone.0060531.
- Organization, World Health. 21-22 March 2012. "**Totally Drug-Resistant TB**": a WHO consultation on the diagnostic definition and treatment options. Geneva, Switzerland: WHO/HQ.
- Ozeki, S., J. Cheng, K. Tauchi-Sato, N. Hatano, H. Taniguchi, and T. Fujimoto. 2005. "Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane." *J Cell Sci no. 118* (Pt 12):2601-11. doi: 10.1242/jcs.02401.
- Pala, G, S Casadio, T Bruzzese, E Crescenzi, and E Marazzi-Uberti. 1965. "Structure-activity relationships in antiinflammatory and analgesic compounds chemically related to alpha-isopropyl-alpha-(2-dimethylaminoethyl)-1-naphthylacetamide." *J Med Chem no. 8* (5):698-700.
- Park, I. H., C. E. Yeum, G. T. Chae, and S. B. Lee. 2008. "Effect of rifampicin to inhibit rapamycin-induced autophagy via the suppression of protein phosphatase 2A activity." *Immunopharmacology and immunotoxicology no. 30* (4):837-49.
- Philipp, W. J., S. Nair, G. Guglielmi, M. Lagranderie, B. Gicquel, and S. T. Cole. 1996. "Physical mapping of *Mycobacterium bovis* BCG pasteur reveals differences from the genome map of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and from *M. bovis*." *Microbiology no. 142* (Pt 11):3135-45.
- Poirier, Valérie, and Yossef Av-Gay. 2012. "Mycobacterium tuberculosis modulators of the macrophage's cellular events." *Microbes and Infection no. 14* (13):1211-1219.
- Portevin, D., S. Sukumar, M. Coscolla, G. Shui, B. Li, X. L. Guan, A. K. Bendt, D. Young, S. Gagneux, and M. R. Wenk. 2014. "Lipidomics and genomics of *Mycobacterium tuberculosis* reveal lineage-specific trends in mycolic acid biosynthesis." *Microbiologyopen no. 3* (6):823-35. doi: 10.1002/mbo3.193.
- Protopopova, M, C Hanrahan, B Nikonenko, R Samala, P Chen, J Gearhart, L Einck, and CA Nacy. 2005. "Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines." *J Antimicrob Chemother no. 56* (5):968-74. doi: dki319 [pii]

10.1093/jac/dki319.

Rahman, A., P. Sobia, N. Gupta, L. V. Kaer, and G. Das. 2014. "Mycobacterium tuberculosis subverts the TLR-2-MyD88 pathway to facilitate its translocation into the cytosol." *PLoS One* no. 9 (1):e86886. doi: 10.1371/journal.pone.0086886.

Raja, A. 2004. "Immunology of tuberculosis." *Indian J Med Res* no. 120 (4):213-32.

Ramachandra, L., J. L. Smialek, S. S. Shank, M. Convery, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2005. "Phagosomal processing of Mycobacterium tuberculosis antigen 85B is modulated independently of mycobacterial viability and phagosome maturation." *Infect Immun* no. 73 (2):1097-105. doi: 10.1128/IAI.73.2.1097-1105.2005.

Rang, H. P., M. Maureen. Dale, J. M. Ritter, and P. K. Moore. 2003. *Pharmacology / H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, P.K. Moore ; illustrations by Peter Lamb. Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone.*

Rao, V., N. Fujiwara, S. A. Porcelli, and M. S. Glickman. 2005. "Mycobacterium tuberculosis controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule." *J Exp Med* no. 201 (4):535-43. doi: 10.1084/jem.20041668.

Rasmussen, S. B., L. S. Reinert, and S. R. Paludan. 2009. "Innate recognition of intracellular pathogens: detection and activation of the first line of defense." *APMIS* no. 117 (5-6):323-37. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02456.x.

Robenek, Horst, Oliver Hofnagel, Insa Buers, Mirko J. Robenek, David Troyer, and Nicholas J. Severs. 2006. "Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis." *Journal of Cell Science* no. 119 (20).

Rodríguez, JC, M Ruiz, A Climent, and G Royo. 2001. "In vitro activity of four fluoroquinolones against Mycobacterium tuberculosis." *Int J Antimicrob Agents* no. 17 (3):229-31. doi: S0924-8579(00)00337-X [pii].

Rosenthal, IM, M Zhang, KN Williams, CA Peloquin, S Tyagi, AA Vernon, WR Bishai, RE Chaisson, JH Grosset, and EL Nuermberger. 2007. "Daily dosing of rifapentine cures tuberculosis in three months or less in the murine model." *PLoS Med* no. 4 (12):e344. doi: 07-PLME-RA-0634 [pii]

10.1371/journal.pmed.0040344.

Roxburgh, C. J., C. R. Ganellin, S. Athmani, A. Bisi, W. Quaglia, D. C. Benton, M. A. Shiner, M. Malik-Hall, D. G. Haylett, and D. H. Jenkinson. 2001. "Synthesis and structure-activity relationships of cetiedil analogues as blockers of the Ca(2+)-activated K⁺ permeability of erythrocytes." *J Med Chem* no. 44 (20):3244-53.

Ruffino-Netto, A. 2002. "[Tuberculosis: the neglected calamity]." *Rev Soc Bras Med Trop* no. 35 (1):51-8.

Russell, D. G., P. J. Cardona, M. J. Kim, S. Allain, and F. Altare. 2009. "Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma." *Nat Immunol* no. 10 (9):943-8. doi: 10.1038/ni.1781.

- Russell, D. G., B. C. VanderVen, W. Lee, R. B. Abramovitch, M. J. Kim, S. Homolka, S. Niemann, and K. H. Rohde. 2010. "Mycobacterium tuberculosis wears what it eats." *Cell host & microbe* no. 8 (1):68-76.
- Russell, DG. 2001. "Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow." *Nat Rev Mol Cell Biol* no. 2 (8):569-77. doi: 35085034 [pii]
- 10.1038/35085034.
- Saito, S., and M. Nakano. 1996. "Nitric oxide production by peritoneal macrophages of Mycobacterium bovis BCG-infected or non-infected mice: regulatory role of T lymphocytes and cytokines." *J Leukoc Biol* no. 59 (6):908-15.
- Savill, JS, AH Wyllie, JE Henson, MJ Walport, PM Henson, and C Haslett. 1989. "Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages." *J Clin Invest* no. 83 (3):865-75. doi: 10.1172/JCI113970.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri. 2012. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." *Nat Methods* no. 9 (7):671-5.
- Senior, S. J., P. A. Illarionov, S. S. Gurucha, I. B. Campbell, M. L. Schaeffer, D. E. Minnikin, and G. S. Besra. 2004. "Acetylene-based analogues of thiolactomycin, active against Mycobacterium tuberculosis mtFabH fatty acid condensing enzyme." *Bioorg Med Chem Lett* no. 14 (2):373-6.
- Sensi, P. 1983. "History of the development of rifampin." *Rev Infect Dis* no. 5 Suppl 3:S402-6.
- Sequeira, P. C., R. H. Senaratne, and L. W. Riley. 2014. "Inhibition of toll-like receptor 2 (TLR-2)-mediated response in human alveolar epithelial cells by mycolic acids and Mycobacterium tuberculosis mce1 operon mutant." *Pathog Dis* no. 70 (2):132-40. doi: 10.1111/2049-632X.12110.
- Silva Lourenço, M. C., F. Rodrigues Vicente, M. de Oliveira Henriques, A. L. Peixoto Candéa, R. S. Borges Gonçalves, T. C. Nogueira, M. de Lima Ferreira, and M. V. Nora de Souza. 2007. "Synthesis and biological evaluation of N-(aryl)-2-thiophen-2-ylacetamides series as a new class of antitubercular agents." *Bioorg Med Chem Lett* no. 17 (24):6895-8. doi: 10.1016/j.bmcl.2007.09.096.
- Singh, B., J. Ghosh, N. M. Islam, S. Dasgupta, and L. A. Kirsebom. 2010. "Growth, cell division and sporulation in mycobacteria." *Antonie Van Leeuwenhoek* no. 98 (2):165-77. doi: 10.1007/s10482-010-9446-0.
- Singh, R, U Manjunatha, HI Boshoff, YH Ha, P Niyomrattanakit, R Ledwidge, CS Dowd, IY Lee, P Kim, L Zhang, S Kang, TH Keller, J Jiricek, and CE 3rd Barry. 2008. "PA-824 kills nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by intracellular NO release." *Science* no. 322 (5906):1392-5. doi: 322/5906/1392 [pii]
- 10.1126/science.1164571.
- Singh, R., S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, K. Tanaka, A. M. Cuervo, and M. J. Czaja. 2009. "Autophagy regulates lipid metabolism." *Nature* no. 458 (7242):1131-5.

- Singh, V., S. Jamwal, R. Jain, P. Verma, R. Gokhale, and Kanury V. S. Rao. 2012. "Mycobacterium tuberculosis-Driven Targeted Recalibration of Macrophage Lipid Homeostasis Promotes the Foamy Phenotype." *Cell Host & Microbe* no. 12 (5):669-681.
- Smart, S. J., and T. B. Casale. 1994. "Pulmonary epithelial cells facilitate TNF-alpha-induced neutrophil chemotaxis. A role for cytokine networking." *J Immunol* no. 152 (8):4087-94.
- Solovic, I., M. Sester, J. J. Gomez-Reino, H. L. Rieder, S. Ehlers, H. J. Milburn, B. Kampmann, B. Hellmich, R. Groves, S. Schreiber, R. S. Wallis, G. Sotgiu, E. H. Schölvinck, D. Goletti, J. P. Zellweger, R. Diel, L. Carmona, F. Bartalesi, P. Ravn, A. Bossink, R. Duarte, C. Erkens, J. Clark, G. B. Migliori, and C. Lange. 2010. "The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement." *Eur Respir J* no. 36 (5):1185-206. doi: 10.1183/09031936.00028510.
- Souza, M. C., C. Penido, M. F. Costa, and M. G. Henriques. 2008. "Mechanisms of T-lymphocyte accumulation during experimental pleural infection induced by *Mycobacterium bovis* BCG." *Infect Immun* no. 76 (12):5686-93. doi: 10.1128/IAI.00133-08.
- Stewart, A. O., P. A. Bhatia, C. M. McCarty, M. V. Patel, M. A. Staeger, D. L. Arendsen, I. W. Gunawardana, L. M. Melcher, G. D. Zhu, S. A. Boyd, D. G. Fry, B. L. Cool, L. Kifle, K. Lartey, K. C. Marsh, A. J. Kempf-Grote, P. Kilgannon, W. Wisdom, J. Meyer, W. M. Gallatin, and G. F. Okasinski. 2001. "Discovery of inhibitors of cell adhesion molecule expression in human endothelial cells. 1. Selective inhibition of ICAM-1 and E-selectin expression." *J Med Chem* no. 44 (6):988-1002.
- Stover, CK, P Warrener, DR VanDevanter, DR Sherman, TM Arain, MH Langhorne, SW Anderson, JA Towell, Y Yuan, DN McMurray, BN Kreiswirth, CE Barry, and WR Baker. 2000. "A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis." *Nature* no. 405 (6789):962-6. doi: 10.1038/35016103.
- Tahlan, K., R. Wilson, D. B. Kastinsky, K. Arora, V. Nair, E. Fischer, S. W. Barnes, J. R. Walker, D. Alland, C. E. Barry, and H. I. Boshoff. 2012. "SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*." *Antimicrob Agents Chemother* no. 56 (4):1797-809. doi: 10.1128/AAC.05708-11.
- Tailleux, L., S. J. Waddell, M. Pelizzola, A. Mortellaro, M. Withers, A. Tanne, P. R. Castagnoli, B. Gicquel, N. G. Stoker, P. D. Butcher, M. Foti, and O. Neyrolles. 2008. "Probing host pathogen cross-talk by transcriptional profiling of both *Mycobacterium tuberculosis* and infected human dendritic cells and macrophages." *PLoS One* no. 3 (1):e1403. doi: 10.1371/journal.pone.0001403.
- Tangallapally, R. P., R. Yendapally, R. E. Lee, K. Hevener, V. C. Jones, A. J. Lenaerts, M. R. McNeil, Y. Wang, and S. Franzblau. 2004. "Synthesis and evaluation of nitrofuranyl amides as novel antituberculosis agents." *J Med Chem* no. 47 (21):5276-83. doi: 10.1021/jm049972y.
- Tanigawa, K., Y. Degang, A. Kawashima, T. Akama, A. Yoshihara, Y. Ishido, M. Makino, N. Ishii, and K. Suzuki. 2012. "Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the

- maintenance of lipid storage in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages." *Microbial Pathogenesis* no. 52 (5):285-291.
- Tansey, J. T., C. Sztalryd, E. M. Hlavin, A. R. Kimmel, and C. Londres. 2004. "The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis." *IUBMB life* no. 56 (7):379-85.
- Tauchi-Sato, K., S. Ozeki, T. Houjou, R. Taguchi, and T. Fujimoto. 2002. "The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition." *J Biol Chem* no. 277 (46):44507-12. doi: 10.1074/jbc.M207712200.
- Tramontana, J. M., U. Utaipat, A. Molloy, P. Akarasewi, M. Burroughs, S. Makonkawkeyoon, B. Johnson, J. D. Klausner, W. Rom, and G. Kaplan. 1995. "Thalidomide treatment reduces tumor necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary tuberculosis." *Mol Med* no. 1 (4):384-97.
- Tsukamura, M., S. Mizuno, and H. Toyama. 1985. "Taxonomic studies on the *Mycobacterium tuberculosis* series." *Microbiol Immunol* no. 29 (4):285-99.
- Udwadia, Z. F., S. Jain, C. Rodrigues, and A. Mehta. 2007. "XDR tuberculosis in India: what's in a name?" *Lancet Infect Dis* no. 7 (7):441-2. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70141-X.
- Uhlin, M., J. Andersson, A. Zumla, and M. Maeurer. 2012. "Adjunct immunotherapies for tuberculosis." *J Infect Dis* no. 205 Suppl 2:S325-34. doi: 10.1093/infdis/jis197.
- van de Vosse, E, and MA van Agtmael. 2007. "Targets of anticytokine therapy and the risk of infections in humans and mice." *Curr Opin Rheumatol* no. 19 (6):626-35. doi: 00002281-200711000-00017 [pii]
- 10.1097/BOR.0b013e3282f05c6d.
- van der Meer-Janssen, Y. P. M., J. van Galen, J. J. Batenburg, and J. B. Helms. 2010. "Lipids in hostpathogen interactions: Pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome." *Progress in Lipid Research* no. 49 (1):1-26.
- van Soolingen, D., T. Hoogenboezem, P. E. de Haas, P. W. Hermans, M. A. Koedam, K. S. Teppema, P. J. Brennan, G. S. Besra, F. Portaels, J. Top, L. M. Schouls, and J. D. van Embden. 1997. "A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa." *Int J Syst Bacteriol* no. 47 (4):1236-45.
- Velasco-Velázquez, MA, D Barrera, A González-Arenas, C Rosales, and J Agramonte-Hevia. 2003. "Macrophage--*Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3." *Microb Pathog* no. 35 (3):125-31. doi: S0882401003000998 [pii].
- Velayati, A. A., M. R. Masjedi, P. Farnia, P. Tabarsi, J. Ghanavi, A. H. Ziazarifi, and S. E. Hoffner. 2009. "Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran." *Chest* no. 136 (2):420-5. doi: 10.1378/chest.08-2427.
- Ventura, M., C. Canchaya, A. Tauch, G. Chandra, G. F. Fitzgerald, K. F. Chater, and D. van Sinderen. 2007. "Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an

- ancient phylum." *Microbiol Mol Biol Rev* no. 71 (3):495-548. doi: 10.1128/MMBR.00005-07.
- Wade, L. G. 1999. *Organic Chemistry. 4th ed.* Upper Saddle River, New Jersey, USA: Prentice Hall.
- Wallis, R. S., R. Dawson, S. O. Friedrich, A. Venter, D. Paige, T. Zhu, A. Silvia, J. Gobey, C. Ellery, Y. Zhang, K. Eisenach, P. Miller, and A. H. Diacon. 2014. "Mycobactericidal activity of sutezolid (PNU-100480) in sputum (EBA) and blood (WBA) of patients with pulmonary tuberculosis." *PLoS One* no. 9 (4):e94462. doi: 10.1371/journal.pone.0094462.
- Wallis, R. S., W. Jakubiec, M. Mitton-Fry, L. Ladutko, S. Campbell, D. Paige, A. Silvia, and P. F. Miller. 2012. "Rapid evaluation in whole blood culture of regimens for XDR-TB containing PNU-100480 (sutezolid), TMC207, PA-824, SQ109, and pyrazinamide." *PLoS One* no. 7 (1):e30479. doi: 10.1371/journal.pone.0030479.
- Werneck-Barroso, E., A. C. Novaes Moura, P. Dias Fernandes, E. Cruz Rosas, J. Assreuy, and M. das Gracas M O Henriques. 2000. "Nitric oxide production by BCG-infected pleural macrophages from C57Bl/6 and DBA-2 mice." *Int J Mol Med* no. 5 (1):95-9.
- WHO. 2014. *Global tuberculosis report 2013. France: World Health Organization.*
- Wilson, R., P. Kumar, V. Parashar, C. Vilchèze, R. Veyron-Churlet, J. S. Freundlich, S. W. Barnes, J. R. Walker, M. J. Szymonifka, E. Marchiano, S. Shenai, R. Colangeli, W. R. Jacobs, M. B. Neiditch, L. Kremer, and D. Alland. 2013. "Antituberculosis thiophenes define a requirement for Pks13 in mycolic acid biosynthesis." *Nat Chem Biol* no. 9 (8):499-506. doi: 10.1038/nchembio.1277.
- Yuhaz, Y., E. Berent, R. Cohen, and S. Ashkenazi. 2009. "Roles of NF-kappaB activation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibition in the effect of rifampin on inducible nitric oxide synthase transcription in human lung epithelial cells." *Antimicrob Agents Chemother* no. 53 (4):1539-45. doi: 10.1128/AAC.00961-08.
- Yulug, B., L. Hanoglu, E. Kilic, and W. R. Schabitz. 2014. "RIFAMPICIN: an antibiotic with brain protective function." *Brain Res Bull* no. 107:37-42. doi: 10.1016/j.brainresbull.2014.05.007.
- Zack, M. B., K. Stottmeier, G. Berg, and H. Kazemi. 1974. "The effect of radiation on microbiologic characteristics of M tuberculosis." *Chest* no. 66 (3):240-3.
- Zhang, J. H., T. D. Chung, and K. R. Oldenburg. 1999. "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays." *J Biomol Screen* no. 4 (2):67-73.
- Zink, A. R., C. Sola, U. Reischl, W. Grabner, N. Rastogi, H. Wolf, and A. G. Nerlich. 2003. "Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping." *J Clin Microbiol* no. 41 (1):359-67.
- Zumla, A. I., S. H. Gillespie, M. Hoelscher, P. P. Philips, S. T. Cole, I. Abubakar, T. D. McHugh, M. Schito, M. Maeurer, and A. J. Nunn. 2014. "New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects." *Lancet Infect Dis* no. 14 (4):327-340. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70328-1.

Zumla, A., P. Nahid, and S. T. Cole. 2013. "Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens." *Nat Rev Drug Discov* no. 12 (5):388-404. doi: 10.1038/nrd4001.

Zurenko, GE, JK Gibson, DL Shinabarger, PA Aristoff, CW Ford, and WG Tarpley. 2001. "Oxazolidinones: a new class of antibacterials." *Curr Opin Pharmacol* no. 1 (5):470-6. doi: S1471-4892(01)00082-0 [pii].