

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

RENATA JARDIM ETCHART

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA DE 3-ARIL-1H-INDÓIS:
PROTÓTIPOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS À FÁRMACOS PARA O
TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Porto Alegre
2021

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

RENATA JARDIM ETCHART

**Síntese e Avaliação da Atividade Antimicobacteriana de 3-Aril-1*H*-indóis:
Protótipos para o Desenvolvimento de Candidatos a Fármacos para o
Tratamento da Tuberculose**

Porto Alegre

2021

RENATA JARDIM ETCHART

**Síntese e Avaliação da Atividade Antimicobacteriana de 3-Aril-1*H*-indóis:
Protótipos para o Desenvolvimento de Candidatos a Fármacos para o
Tratamento da Tuberculose**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Machado

Porto Alegre

2021

Ficha Catalográfica

E83s Etchart, Renata Jardim

Síntese e Avaliação da Atividade Antimicobacteriana de 3-Aril-1H-indóis
: Protótipos para o Desenvolvimento de Candidatos a Fármacos para o
Tratamento da Tuberculose / Renata Jardim Etchart. – 2021.

96 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Machado.

1. Tuberculose. 2. Mycobacterium tuberculosis. 3. Desenvolvimento de fármacos.
4. 3-aril-1H-indóis. I. Machado, Pablo. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Pablo Machado, pela orientação e pela possibilidade de realizar projetos diversos, que enriqueceram meu repertório de técnicas e culminaram na realização deste trabalho. Sob sua orientação, tive um crescimento enorme e muito valioso. Muito obrigada!

Ao prof. Dr. Diógenes Santiago Santos (*in memoriam*) por abrir as portas do laboratório e me possibilitar este período de tanto aprendizado.

Aos demais professores do CPBMF, PPGBCM e outros tantos com quem tive o prazer de conviver e aprender lições muito importantes, que contribuíram de diversas formas para minha evolução pessoal e profissional.

À CAPES e ao BNDES pelo apoio financeiro.

Ao PPGBCM e à PUCRS. Tenho muito carinho pela instituição em que fiz toda minha formação.

Durante os 4 anos (e meio) de Doutorado, aprendi muito mais que a teoria envolvendo o desenvolvimento de fármacos, a biologia molecular, ou as técnicas utilizadas nos experimentos. Esse período, as experiências e ensinamentos que vem com ele, são incomparáveis. São intensas demais, loucas demais e, por vezes, solitárias demais. Foi uma jornada longa, cheia de tropeços, frustrações e dúvidas. Mas ao mesmo tempo foi maravilhoso e extremamente enriquecedor. Aprendi que as coisas são muito maiores que nós; que aprendemos muito mais de erros que de acertos; que no fim, da tudo certo e o que fica são as boas lembranças. Aprendi que (quase sempre) um café com bolo, acompanhados de sorrisos e conversas, faz milagres; E que amigos e pessoas que amamos tornam a jornada muito mais leve. Por isso, é fundamental escolher com muito cuidados as pessoas que fazem parte da nossa vida. Pois nesse quesito, eu tive êxito máximo! Então, gostaria de agradecer a cada um que contribuiu para que, mesmo sob tempestade, os dias parecessem ensolarados.

Aos colegas de laboratório que compartilharam tanto! Problemas com experimento, frustrações, e tantos outros dramas da pós, mas também compartilharam tantos cafés na copa, lanches, risadas, passeios pela puc pós

almoço, conversas longas que acalmam e curam, que dão força pra continuar. Muito obrigada a todos vocês! Especialmente Alexia, Talita, Pedro, Natália, Luiza, Márcia, Candida, Alejandro, Laisa, Fernanda, Maiele, Lovaine, Aguida, Kenia, Junior e Bruno (Ah o Bruno, essa pessoa incrível que mesmo sendo tão realista (por vezes, com um toque pessimista) consegue levantar o astral do pessoal, ensinar muito e com muita gentileza, humildade e carinho. Foi uma honra e um prazer enorme ter trabalhado com o Bruno e, sem a ajuda dele, este trabalho não teria acontecido).

Aos demais colegas, ex-colegas, estagiários e ICs.

Aos amigos mais que especiais Simara, Daniel, Marina, Elisa, Gabriella, Thayná, Andréia e Gabriel. Perto ou longe, no mesmo bairro ou em fuso horário diferente, a amizade de vocês é umas das melhores coisas que eu tenho.

À minha família, minha fortaleza: meus irmãos Bernardo e Henrique que são os melhores que eu poderia querer. Vocês me ensinam e me inspiram todos os dias, além de garantir boas risadas. As mulheres que me ensinam tanto sobre a vida, principalmente sobre força, coragem e amor: minha mãe Adriane (te admiro cada dia mais), vó Elaine, tia Mariane, dinda Liane e minhas primas Marcela e Marina. E ao Alexandre, que ilumina o caminho. Dono de um abraço que é lar, que me faz acreditar que tudo vai dar certo. Amo muito vocês!

Obrigada a todos vocês, de coração.

“É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia.”

Clarice Lispector

RESUMO

A tuberculose pulmonar ocorre por meio da transmissão aérea e apresenta diversidade nas manifestações clínicas. A extensão da infecção depende da resposta imune do hospedeiro, resultando na cura, progressão para forma latente ou ativa da doença. Em 2019, foi estimado em 10 milhões o número de novos casos de tuberculose (TB) no mundo. No Brasil, foram notificados 5224 novos casos da doença. Em 1993, a OMS declarou a TB como uma emergência de saúde pública e a estratégia terapêutica do DOTS foi fundamental para o progresso no combate da doença. Apesar do número total de mortes ter diminuído, a TB permanece como uma das dez causas principais de morte no mundo, principalmente agravada pela coinfeção com HIV, crescente número de casos de cepas resistentes e, recentemente, pela pandemia da COVID-19. Farmacoterapia é a forma mais eficaz de tratar a tuberculose e para alcançar o controle desta epidemia, há a necessidade urgente de novos fármacos anti-TB. Diante deste cenário, a química de heterociclos é uma das fontes mais valiosas de compostos novos com atividade farmacológica diversa. Dentre as estruturas, o anel indólico é um dos compostos mais estudado como componente de produtos biologicamente ativos e nos últimos anos, diversas moléculas contendo indol em sua estrutura tiveram o alvo farmacológico específico ou mecanismo de ação elucidado em *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Estes compostos se mostraram ativos contra Mtb, despertando interesse nestes derivados indólicos como uma fonte promissora para identificação de novas moléculas. Neste trabalho foram sintetizados compostos da classe 3-aril-1*H*-indóis que tiveram sua atividade antimicobacteriana avaliada por meio da determinação da concentração inibitória mínima. Os compostos demonstraram atividade contra cepa laboratorial H37Rv e as moléculas mais efetivas contra essa cepa (*hits*) demonstraram também atividade contra isolados clínicos resistentes a fármacos, com valores de MIC inferiores a 20 µM. Um desses *hits*, composto **3r**, não afetou de maneira significativa a viabilidade das linhagens celulares testadas e não produziu danos significativos ao DNA de células HepG2, com CC₅₀ superior a 30 µM. Para avaliar a dinâmica da atividade antimicobacteriana, foi realizada a curva de morte celular do composto **3r**, aliado a uma modelagem matemática para prever suas características farmacodinâmicas. A concentração bactericida mínima obtida foi de 2X MIC e a cinética de morte demonstrada foi dependente do tempo, com características semelhantes à rifampicina. Os valores de MIC teórico e experimental foram semelhantes e a determinação do coeficiente de Hill é compatível a compostos com cinética de morte dependente do tempo. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que esta classe química é promissora e pode originar candidatos a novos fármacos anti-TB.

Palavras-chave: Tuberculose; *Mycobacterium tuberculosis*; desenvolvimento de fármacos; 3-aril-1*H*-indóis.

ABSTRACT

Pulmonary tuberculosis occurs through airborne transmission and shows diversity in clinical manifestations. The extent of the infection depends on the host's immune response, resulting in cure, progression to the latent or active form of the disease. In 2019, the number of new cases of tuberculosis (TB) in the world was estimated at 10 million. In Brazil, 5224 new cases of the disease were reported. In 1993, WHO declared TB as a public health emergency and the DOTS therapeutic strategy was fundamental to progress in combating the disease. Although the total number of deaths has decreased, TB remains one of the ten leading causes of death in the world, mainly aggravated by co-infection with HIV, the growing number of cases of resistant strains and, recently, the COVID-19 pandemic. Pharmacotherapy is the most effective way to treat tuberculosis and to achieve control of this epidemic, there is an urgent need for new anti-TB drugs. Within this scenario, heterocycle chemistry is one of the most valuable sources of new compounds with diverse pharmacological activity. Among the structures, the indole ring is one of the most studied compounds as a component of biologically active products and in recent years, several molecules containing indole in its structure had the specific pharmacological target or mechanism of action elucidated in *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). These compounds were shown to be active against Mtb, arousing interest in these indole derivatives as a promising source for the identification of new molecules. In this work, compounds of the 3-aryl-1*H*-indoles class were synthesized and their antimycobacterial activity was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC). The compounds demonstrated activity against the laboratory strain H37Rv and the most effective molecules against this strain (hits) also demonstrated activity against drug-resistant clinical isolates, with MIC values below 20 μM . One of these hits, compound **3r**, did not significantly affect the viability of the cell lines tested and did not produce significant damage to the DNA of HepG2 cells, with a CC_{50} greater than 30 μM . To assess the dynamics of antimycobacterial activity, the time-kill curve of compound **3r** was performed, combined with mathematical modeling to predict its pharmacodynamic characteristics. The minimum bactericidal concentration obtained was 2X MIC and the demonstrated killing kinetics were time-dependent, with characteristics like rifampicin. Theoretical and experimental MIC values were similar, and the determination of the Hill coefficient is compatible with compounds with time-dependent kill kinetics. The results obtained in this work suggest that this chemical class is promising and may lead to candidates for new anti-TB drugs.

Key-words: Tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; drug development; aryl-indoles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Quadro global da tuberculose: taxas de incidência por país	12
Figura 2: Dados de incidência e morte por tuberculose no mundo de 2000 a 2020.	13
Figura 3: Quadro da Tuberculose no Brasil com coeficiente de incidência por estados.....	14
Figura 4: Quadro da Tuberculose no Brasil com coeficiente de mortalidade por estados.....	15
Figura 5: Gráfico da taxa de incidência de Tuberculose em Porto Alegre de 2014 a 2021.	16
Figura 6: Diferença percentual entre o número de notificações de tuberculose no Brasil e regiões, comparando os anos de 2019 e 2020	18
Figura 7: Esquema de infecção da tuberculose - Do Mtb à tuberculose pulmonar ativa.....	22
Figura 8: Etapas da patogênese da tuberculose	23
Figura 9: Estrutura e constituintes celulares do granuloma da tuberculose	24
Figura 10: Fisiopatologia da infecção por <i>Micobacterium tuberculosis</i>	27
Figura 11: Esquema básico para o tratamento da tuberculose em adultos e adolescentes (≥ 10 anos de idade);	31
Figura 12: Estratégias utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose.....	39
Figura 13: <i>Pipeline</i> global de ensaios clínicos de novos fármacos anti-TB para o tratamento da tuberculose.....	44
Figura 14: Moléculas inibidoras de <i>DprE1</i> em ensaio clínico Fase 1	45
Figura 15: Moléculas em estudo clínico Fase 2	46
Figura 16: Moléculas em estudo clínico Fase 3	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Medicamentos de primeira linha utilizados para tratamento da Tuberculose.....	32
Tabela 2: Medicamentos de segunda linha dos grupos A, B e C utilizados para tratamento da Tuberculose resistente.....	34
Tabela 3: Medicamentos de segunda linha do grupo D para tratamento da Tuberculose resistente.....	35
Tabela 4: Fármacos em estudo clínico Fase 1.....	45
Tabela 5: Fármacos em estudo clínico Fase 2.....	46
Tabela 6: Fármacos em estudo clínico Fase 3.....	47

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

- BAAR** – Bacilo álcool ácido resistente
- BCG** – Vacina contra tuberculose (bacilo de Calmette-Guérin)
- CIM** – Concentração inibitória mínima (do inglês *MIC minimum inhibitory concentration*)
- COVID-19** – Doença causada pelo Sars-CoV-2 (do inglês *Coronavirus disease 2019*)
- CRISPR** – Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas em cluster (do inglês *Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)
- DOTS** – Tratamento Diretamente Supervisionado de Curta Duração (do inglês *Directly Observed Treatment Short-course*)
- GDD** – Grupo de Desenvolvimento de Diretrizes da OMS (do inglês *GDG Guideline Development Group*)
- HTS** – Triagem de alto rendimento (do inglês *Hight-throughput screening*)
- IFN- γ** – Interferon Gama (do inglês *interferon gamma*)
- LTBI** – Tuberculose latente (do inglês *latent TB infection*)
- MDR-TB** – Tuberculose resistente a múltiplos fármacos (do inglês *multidrug-resistant TB*)
- Mtb** – *Mycobacterium tuberculosis*
- OMS** – Organização Mundial da Saúde (do inglês *WHO World Health Organization*)
- REA** – Relação estrutura atividade
- RR-TB** – Tuberculose resistente à rifampicina (do inglês *rifampicin resistant TB*)
- Sars-CoV-2** – Vírus transmissor da COVID-19 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*)
- TB** – Tuberculose
- TB-HIV** – Coinfecção de tuberculose e HIV
- TNF- α** – Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês *tumor necrosis factor alpha*)
- XDR-TB** – Tuberculose extensivamente resistente (do inglês *extensive drug resistance TB*)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1.1. A tuberculose.....	11
1.2. Situação epidemiológica.....	12
1.3. Tuberculose e COVID-19.....	17
1.4. O <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
1.4.1. Características do patógeno.....	21
1.4.2. Infecção, transmissão e fisiopatologia.....	22
1.4.3. Formação do granuloma.....	24
1.4.4. Tuberculose latente.....	26
1.4.5. Tuberculose ativa.....	28
1.5. Tratamento.....	29
1.5.1. Estratégias terapêuticas.....	31
1.5.2. Medicamentos utilizados.....	32
1.5.3. Resistência a múltiplos fármacos.....	35
1.6. Desenvolvimento de novos fármacos.....	38
1.6.1. Estratégias de desenvolvimento.....	38
1.6.2. Panorama geral dos novos fármacos para o tratamento da TB.....	44
1.7. Índois.....	48
2. Objetivos.....	51
2.1. Objetivo Geral.....	51
2.2. Objetivos Específicos.....	51
3. Artigo Científico.....	52
4. Considerações Finais.....	90
REFERÊNCIAS.....	92

1. Introdução

1.1. A tuberculose

A Tuberculose (TB) é uma doença historicamente conhecida como “consumpção”, “praga branca”, entre outros nomes, e afeta a humanidade há séculos. No início do século XIX, pensava-se que a TB era hereditária ou resultado de um estilo de vida pouco saudável. A transmissão era desconhecida e não havia tratamento, fazendo com que a TB fosse, na maioria das vezes, uma sentença de morte (U.S. department of health, 2019).

O termo “tuberculose” foi proposto por Johann Lukas Schönlein em 1834, devido à presença de tubérculos (posteriormente identificados como granulomas) nos órgãos e tecidos dos pacientes identificados com a doença. O médico Jean-Antonie Villemin, foi o primeiro a demonstrar com sucesso a transmissibilidade da doença, em 1865, por meio da utilização de um modelo de infecção em animal (E. Cambau e M. Drancourt, 2014; Thomas M. Daniel, 2006). Robert Koch, em 1882, identificou o agente etiológico, denominado Tuberkelvirus na ocasião da publicação do estudo. Finalmente, o nome *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) foi proposto em 1883 (Cambau e Drancourt, 2014).

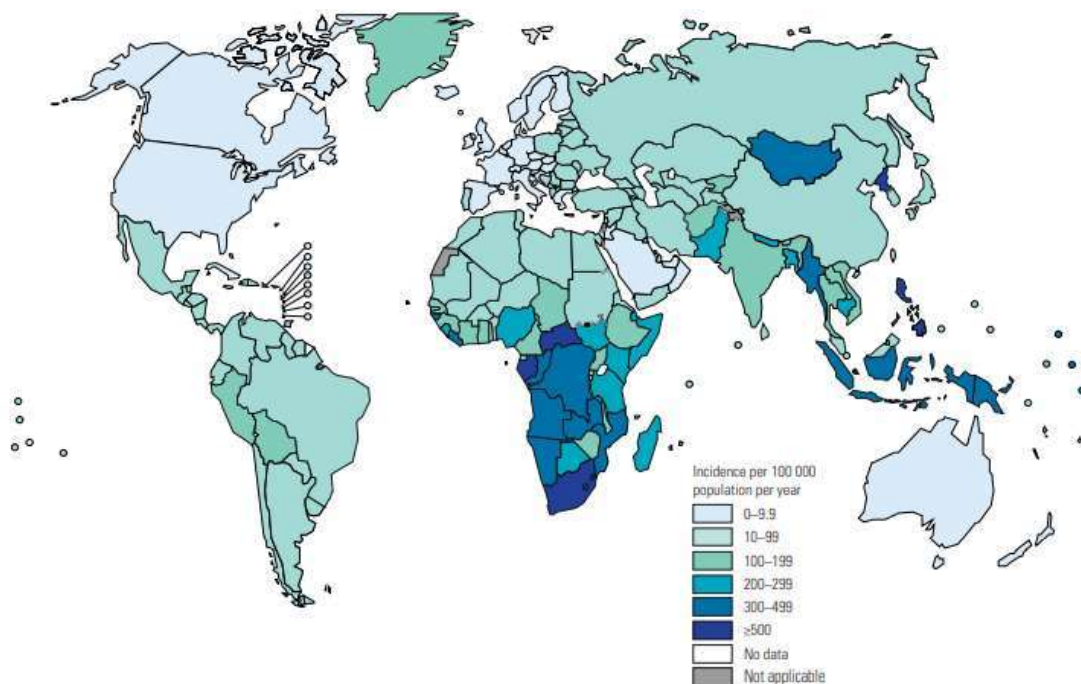
Meio século se passou até que houvesse um tratamento e em 1943 os cientistas Selman Waksman, Elizabeth Bugie e Albert Schatz descobriram a Estreptomina, o primeiro medicamento capaz de tratar a TB. Entre 1943 e 1952 mais dois medicamentos surgiram, diminuindo a taxa de mortalidade da doença. Por alguns anos, acreditou-se que a TB poderia ser eliminada, até que o número de casos voltou a aumentar, dando início a um período de união de esforços, financiamentos, estratégias e pesquisas com o objetivo de prevenir e controlar a doença (U.S. department of health, 2019). Estes esforços são mantidos até hoje, com estratégias firmes e acordos de cooperação de diversos países do mundo e, apesar do número de casos diminuir a cada ano, a tuberculose ainda pode ser fatal quando não tratada e é considerada uma das principais causas de morte por um único agente infeccioso (WHO, 2020).

1.2. Situação Epidemiológica

Em 2019, foi estimado em 10 milhões (8,9 – 11,0 milhões) o número de novos casos de TB no mundo. A maior parte do número de casos ocorreu na Região do Sudeste Asiático (44%), África (25%) e na Região do Pacífico Ocidental (18%). Uma menor proporção dos casos ocorreu na Região do Mediterrâneo Oriental (8,2%), nas Américas (2,9%) e Europa (2,5%) (WHO, 2020).

A taxa de incidência anual (2019) de tuberculose variou amplamente entre países, de menos de 5 a mais de 500 novos casos e casos de recaída por 100 mil habitantes (Figura 1). Destes, 54 países tiveram uma incidência baixa (<10 casos a cada 100 mil habitantes) e estão em um excelente caminho para alcançar a eliminação da TB, de acordo com as metas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A maioria destes países está localizado na região das Américas e na Europa (WHO, 2020).

Figura 1: Quadro global da tuberculose: taxas de incidência por país

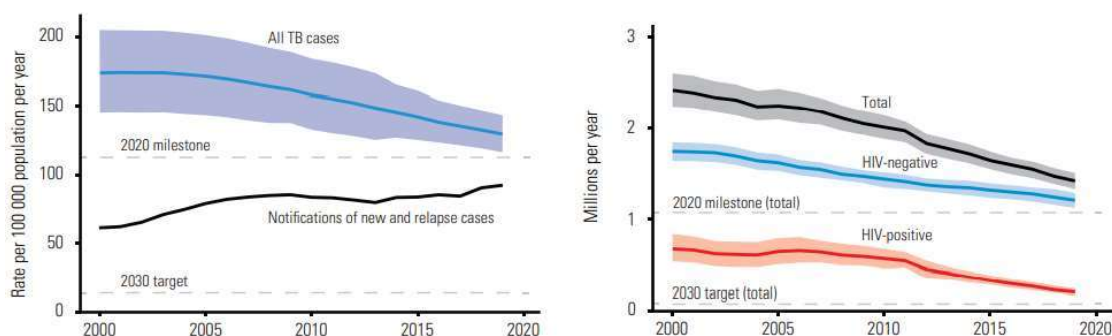


Fonte: WHO, 2020 - Global Tuberculosis Report.

Apesar do aumento no número de notificações, ainda há uma lacuna (2,9 milhões) entre o número de pessoas diagnosticadas/ reportadas e os 10 milhões de casos estimados de pessoas que desenvolveram TB em 2019. Esta lacuna se deve a combinação de subnotificação das pessoas diagnosticadas e falta de diagnóstico assertivo (no caso das pessoas com TB que não tiveram acesso aos cuidados de saúde ou não são diagnosticadas, mesmo tendo acesso) (WHO, 2020).

Mundialmente, a taxa de incidência e o número de óbitos por TB estão diminuindo (Figura 2), mas não rápido o bastante para alcançar a meta de redução de 20% entre os anos de 2015 e 2020. A redução cumulativa de 2015 para 2019 foi de 9% (de 142 para 130 casos a cada 100 mil habitantes). A Europa quase atingiu a meta estipulada para 2020, com a redução de 19% na incidência de TB, entre 2015 e 2019. A África fez um bom progresso com a redução de 16%, no mesmo período. Na Região das Américas, a incidência está aumentando lentamente, devido a uma tendência de aumento no Brasil. Foram estimados no mundo, em 2019, 1,2 milhões (1,1– 1,3 milhões) de mortes por TB em pacientes HIV negativos e um adicional de 208 mil mortes (177 – 242 mil) em pacientes HIV positivos. Aproximadamente 83% das mortes em pacientes HIV negativo ocorreram na África e no Sudeste Asiático (WHO, 2020).

Figura 2: Dados de incidência e morte por Tuberculose no mundo de 2000 a 2020.

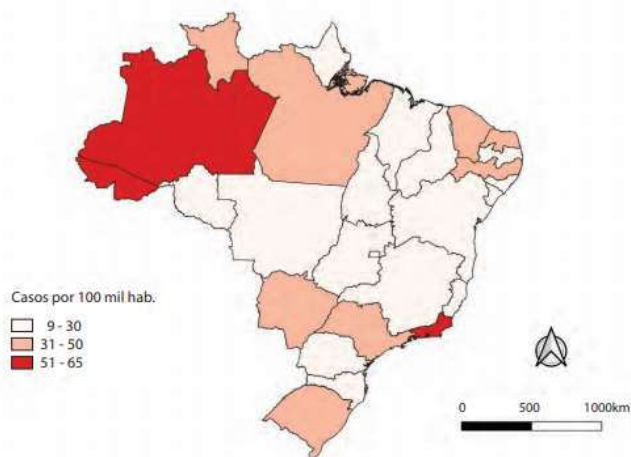


Fonte: WHO, 2020 - Global Tuberculosis Report.

O Brasil continua entre os 30 países com alta carga para TB e para coinfeção TB-HIV, com aumento do coeficiente de incidência de TB entre 2017 e 2019. Por esta razão, a OMS considera o Brasil como um dos países prioritários para o controle da TB no mundo (BRASIL, 2021; WHO, 2020).

Há uma importante heterogeneidade nas taxas de incidência de TB no país, como pode ser visto na Figura 3, com maiores taxas (>51 casos a cada 100 mil habitantes) observados nos estados do Rio de Janeiro, Amazonas e Acre. As maiores proporções de coinfeção TB-HIV no país, em 2020, foram nos estados do Distrito Federal, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, dos quais, apenas 45,1% dos pacientes realizaram terapia antirretroviral durante o tratamento da TB (BRASIL, 2021).

Figura 3: Quadro da Tuberculose no Brasil com coeficiente de incidência por estados.

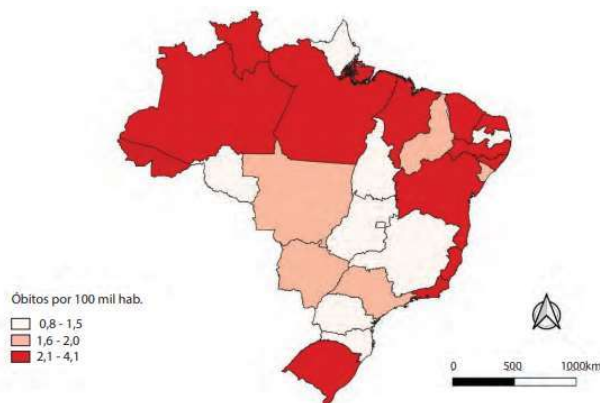


Fonte: BRASIL, 2021 - Boletim Epidemiológico de Tuberculose.

No Brasil, em 2019, foram notificados cerca de 4,5 mil óbitos pela doença, com um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2021 e WHO, 2020). Antes da pandemia de COVID-19 (*Coronavirus Disease*), 13 estados apresentaram coeficiente de mortalidade por TB próximo ou superior ao coeficiente do país, a saber: Amazonas, Rio de Janeiro, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Pará, Maranhão, Rio Grande do Norte, Roraima, Ceará, Acre, Alagoas, Bahia e Espírito Santo (Figura 4). Todavia, em 2020, em momento de

pandemia pela COVID-19, foi observada uma queda acentuada da incidência (10,9%) em comparação com o ano anterior (BRASIL, 2021).

Figura 4: Quadro da Tuberculose no Brasil com coeficiente de mortalidade por estados.



Fonte: BRASIL, 2021 - Boletim Epidemiológico de Tuberculose.

A OMS preconiza que são necessários 85% de cura e até 5% de abandono no tratamento para a redução de incidência em um território. A proporção de cura entre os novos casos diagnosticados, considerando os dados do país em 2019, anteriores à pandemia da COVID-19, foi de 70,1%. O estado do Acre apresentou o maior percentual, com 89,2%. De maneira geral, na maioria dos estados, houve uma tendência de melhora no percentual de cura. Entretanto, o país registrou um alto percentual de abandono do tratamento, mais que duas vezes superior ao recomendado pela OMS. Os dados demonstram que 12% dos novos casos confirmados abandonaram o tratamento em 2019 e os maiores percentuais de abandono foram observados nas capitais Porto Alegre/RS (34,0%), Porto Velho/RO (32,6%), Campo Grande/MS (21,4%) e Aracaju/SE (20,1%) (BRASIL, 2021).

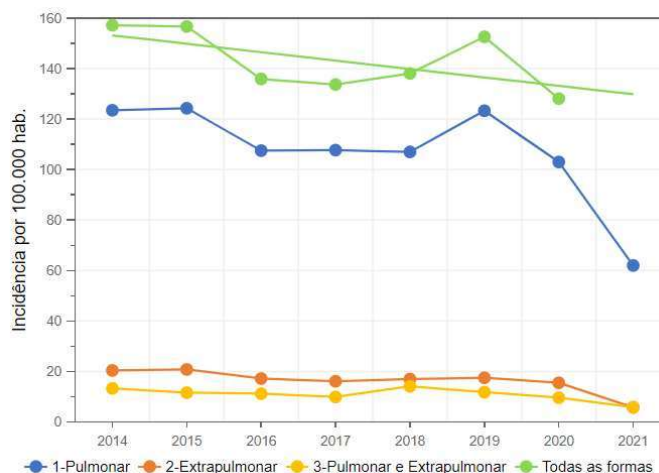
Os dados obtidos durante o ano de 2020, já em situação de pandemia, mostram algumas alterações importantes nos indicadores epidemiológicos e operacionais do país, tais como: redução no total de notificações de TB nos três níveis de atenção, com queda mais pronunciada na atenção terciária, e redução no consumo de cartuchos de teste rápido molecular para diagnóstico, em comparação com o ano de 2019. Além da queda acentuada do número de

notificações e, conseqüentemente, queda nas taxas de incidência, houve um aumento do abandono do tratamento. Ainda não se sabe como a pandemia da COVID-19 pode ter influenciado na gravidade da doença, ou se as alterações nos indicadores são um reflexo de aspectos operacionais, como sobrecarga dos sistemas de saúde (BRASIL, 2021).

No ano de 2019, no Brasil, a taxa média de coinfeção TB/HIV foi de 8,7%. No Rio Grande do Sul (RS), foram notificados 5224 novos casos de TB, com 7529 casos no total (incluindo casos de recidiva, reingresso após abandono, histórico desconhecido, transferência e diagnóstico pós-óbito), no mesmo período e a taxa de mortalidade foi de 2,22 óbitos no ano de 2016 e, 2,38 no ano de 2017 (por 100 mil habitantes). Comparado ao Brasil, o estado possui um coeficiente de mortalidade por TB um pouco acima da média nacional (2,2) (Secretaria de Saúde do RS, 2020).

No município de Porto Alegre, até o momento (Julho de 2021) houve 474 novos casos diagnosticados de TB em Porto Alegre, com 10 casos de abandono de tratamento e 2 casos de pacientes curados. Na Figura 5 é possível ver a evolução da distribuição da taxa de incidência das formas de TB no período entre 2014 e 2021, na cidade de Porto Alegre (Prefeitura Municipal de Porto Alegre, 2021).

Figura 5: Gráfico da taxa de incidência de Tuberculose em Porto Alegre de 2014 a 2021.



Fonte: Prefeitura Municipal de Porto Alegre, 2021.

1.3. Tuberculose e COVID-19

A COVID-19 foi anunciada pela OMS como pandemia em 11 de março de 2020, registrando, à época, 118.319 casos e 4.292 mortes em diferentes continentes. Em menos de um mês, o número de casos de infecção pelo vírus SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), agente causador da COVID-19, atingiu 1.279.722, com 72.614 óbitos diretamente relacionados à infecção em todo o mundo (Santos FLd et al., 2021). Desde então, a pandemia da COVID-19 tem causado enormes impactos social, econômico e na saúde, ao redor do mundo. Estes impactos perduram no ano de 2021 e mesmo que alguns tenham sido contidos, haverá consequências de médio e longo prazo, incluindo a ameaça de reverter o progresso feito em direção às metas globais de TB (WHO, 2020).

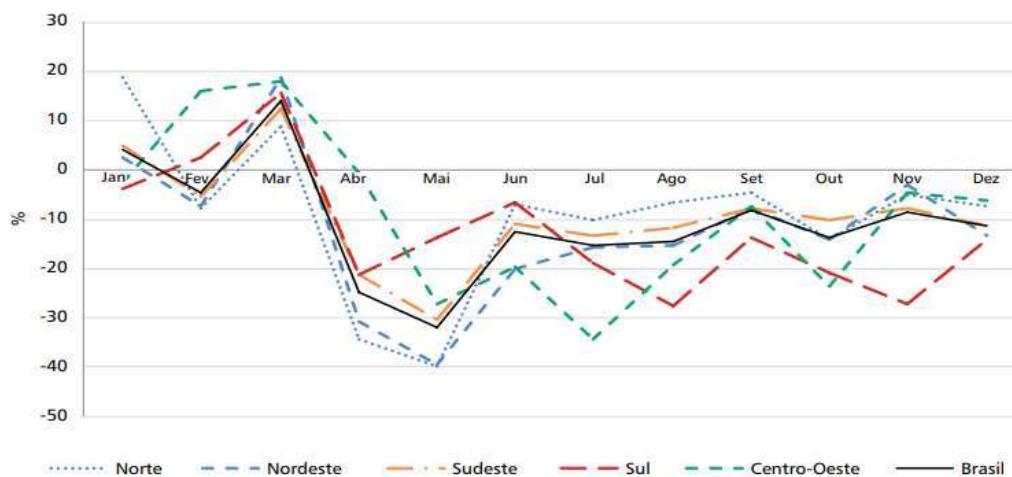
Mundialmente, o número de mortes por TB pode aumentar em torno de 200 a 400 mil no ano de 2020, em decorrência da pandemia. Em países como Índia, Indonésia, Filipinas e África do Sul, quatro países que somam 44% do número total de casos de TB no mundo, houve grande redução no número de diagnósticos de TB entre janeiro e junho de 2020, comparado com o mesmo período em 2019. Uma modelagem, realizada pela OMS, prediz que o número de pessoas que desenvolvem TB pode aumentar em mais de 1 milhão por ano no período de 2020 – 2025, levando aos níveis de mortalidade por TB que tínhamos em 2012 (WHO, 2020). Entre os países que concentram 84% dos casos de TB, foi verificado que cerca de 1,4 milhão de pessoas deixaram de receber o tratamento para TB, por falta de diagnóstico, correspondendo a uma redução de 21% no número de notificações, em relação ao ano de 2019. Na região das Américas, o diagnóstico de novos casos de TB diminuiu entre 15% e 20%, no mesmo período.

Tem sido previsto que o impacto econômico da pandemia terá grande efeito na piora de pelo menos dois dos principais determinantes da incidência de TB: PIB *per capita* e subnutrição. O impacto nos determinantes sociais (como pobreza, desnutrição e más condições de moradia) e sobre os meios de subsistência, resultante da perda de renda ou do desemprego, também pode

aumentar a porcentagem de pessoas com TB e suas famílias, o que pode aumentar os fatores de riscos para o desenvolvimento da doença, tornando ainda mais necessárias o fortalecimento das ações voltadas ao manejo adequado da TB (BRASIL, 2021; WHO, 2020). Quanto aos impactos negativos nos serviços essenciais de combate à TB, há realocação de força de trabalho, equipamentos, financiamento e outros recursos para enfrentamento da COVID-19. Em muitos países, a coleta de dados e reporte, também foi afetado (WHO, 2020). Embora a vigilância seja capaz de notificar a TB e as doenças virais separadamente, na grande maioria dos países as informações sobre a COVID-19 ainda são incompletas e as informações sobre TB não contêm muitos parâmetros clínicos e imunológicos, o que seria útil para melhor compreender a interação entre as duas doenças (Visca et al., 2021).

No Brasil, em 2020, foram notificados 86.166 casos de TB, correspondendo a uma queda de 10,9% quando comparado aos 96.655 casos registrados em 2019. A queda no número de notificações foi observada a partir do mês de abril, com piora no mês de maio (redução de 31,9%), como podemos ver na Figura 6. Entre as regiões, a menor queda no período avaliado foi observada na região Sudeste (-9,4%) e a maior, na região Sul (-13,1%). Espírito Santo (17,3%), Rio Grande do Norte (15,8%), Acre (3,8%) e Roraima (3,7%), foram os únicos estados com aumento das notificações no período avaliado (BRASIL, 2021).

Figura 6: Diferença percentual entre o número de notificações de tuberculose no Brasil e regiões, comparando os anos de 2019 e 2020



Fonte: BRASIL, 2021.

Embora ainda não existam estudos associando os piores desfechos clínicos da COVID-19 à TB, é importante considerar que tanto o *Mycobacterium tuberculosis* quanto o SARS-CoV-2 agem principalmente nos pulmões, afetam o sistema imunológico do hospedeiro e tem maior impacto sobre os mais vulneráveis, tanto biológica quanto socialmente (Santos et al., 2021; Visca et al., 2021).

As infecções por SARS-CoV-2 e Mtb têm alguns paralelos importantes no que diz respeito à entrada na célula, resposta imune e evasão imune. Assim, as regiões endêmicas de TB podem ter patologias exacerbadas no contexto de infecções por SARS-CoV-2. Entretanto, ainda que os dois patógenos compartilhem algumas características, como a tempestade de citocinas, é importante notar que a magnitude da resposta difere, com Mtb tendo uma resposta mais baixa. Além disso, os resultados associados à tempestade de citocinas (incluindo IL-1, IL-18, IFN, IL-6, IL-10) são diferentes para os dois patógenos. Os pacientes com COVID-19 apresentam síndrome do desconforto respiratório agudo, ao passo que na TB há perda crônica e a destruição longa e lenta como resultado da tempestade de citocinas (Tapela et al., 2021).

Como o SARS-CoV-2, o Mtb também infecta os pneumócitos do tipo II nos pulmões por meio de receptores de reconhecimento de padrão das células hospedeiras. Além disso, a bactéria é internalizada por meio de fagocitose pelos macrófagos residentes e posteriormente translocada para os lisossomas para destruição. A coinfeção de SARS-CoV-2 e Mtb pode exacerbar as patologias associadas a cada patógeno. A coinfeção em macrófagos pode aumentar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e, portanto, desempenhar um papel crucial na patogênese. A infecção grave de pneumócitos tipo II com SARS-CoV-2 pode causar falha na regeneração das células e levar a lesões nos pulmões, dano brônquico acelerado e, em última instância, doença pulmonar (Tapela et al., 2021).

Visca e colaboradores (2021) conduziram um estudo de revisão sobre a interação entre TB e COVID-19. Alguns dados são apresentados a seguir:

- Em uma primeira meta-análise de seis estudos conduzidos em alguns pacientes, na China, a prevalência de TB entre os pacientes com COVID-

19 variou entre 0,47 e 4,47%. A prevalência de TB foi maior entre os pacientes com COVID-19 grave do que entre os não graves (1,47%, 10/680 vs 0,59%, 10/1703) e o risco de morte por TB foi 1,4 vezes maior em pacientes com COVID-19.

- Em um estudo de coorte de oito países (Bélgica, Brasil, França, Itália, Rússia, Cingapura, Espanha e Suíça) TB e COVID-19 foram estudadas em 49 pacientes durante a onda inicial da pandemia. A TB foi diagnosticada antes da COVID-19 em 26 pacientes (53,0%), a COVID-19 foi diagnosticado antes da TB em 14 (28,5%), enquanto o diagnóstico foi concomitante em 9 pacientes (18,3%) (na mesma semana). Quarenta e dois pacientes (85,7%) apresentavam TB ativa, enquanto 7 (14,3%) apresentavam sequelas de TB pós-cura. Os autores concluíram que COVID-19 pode ocorrer antes, simultaneamente ou após o diagnóstico de TB; O papel da COVID-19 no estímulo ao desenvolvimento da TB ativa ainda não foi estabelecido; O papel das sequelas de TB na evolução da COVID-19 também não está claro, podendo ser um fator de risco para piora dos desfechos. Mais estudos são necessários para permitir a análise das interações e determinantes dos resultados em pacientes com ambas as doenças.
- Os resultados de um estudo recente em 69 pacientes de 8 países sugerem o seguinte: A mortalidade pode ocorrer em pacientes idosos com comorbidades; TB pode não ser um dos principais determinantes de mortalidade; Entre os pacientes mais jovens a mortalidade foi mais baixa, provavelmente devido à sua idade e menor número de comorbidades. No entanto, os autores comentaram que em pacientes com TB grave e/ ou com doença causada por cepas resistentes de Mtb, pode-se esperar uma taxa de mortalidade maior também em indivíduos mais jovens.

O *status* da TB (latente ou ativa) pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da COVID-19 e na exacerbação do curso da doença para a população coinfetada, considerando os casos estudados na China e na Índia (Visca et al., 2021).

1.4. O *Mycobacterium tuberculosis*

1.4.1. Características do patógeno

As antigas cepas de Mtb foram originadas de micobactérias datadas de 70 mil anos atrás, no continente Africano. A introdução da agricultura, civilização e o aumento da densidade populacional humana levaram à seleção da virulência e transmissibilidade das cepas de Mtb. Tal fato colaborou para espalhar a doença por vários países do mundo, resultando na epidemia atual (Bailo et al., 2015).

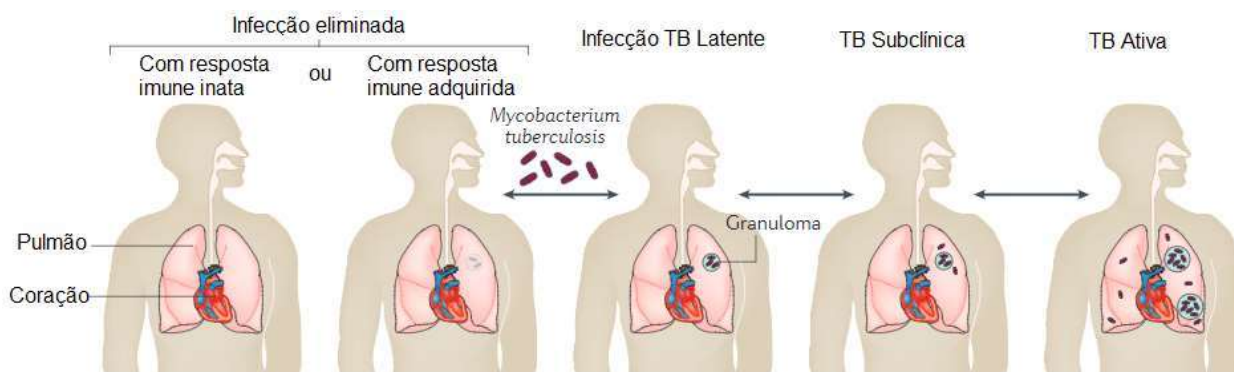
As características deste patógeno, principal agente etiológico da tuberculose, incluem crescimento lento, dormência, parede celular complexa, patogênese intracelular e homogeneidade genética. Mtb dormente parece ser suscetível à inibição de processos da cadeia respiratória, como síntese de ATP, ou interferência no estado oxidativo celular. O gênero é considerado bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) devido à capacidade de reter fucsina básica na parede celular mesmo na presença de álcool e ácido, quando é utilizado o método de Ziehl-Neelsen para sua coloração. O genoma da linhagem melhor caracterizada, *M. tuberculosis* H37Rv, possui 4.411.529 pares de base dispostos em um cromossomo circular, sendo 65,6% composto por bases G+C (Cole et al., 1998).

O bacilo apresenta repertório metabólico rico e flexível, permitindo adaptação a ambientes variáveis, encontrados na infecção do hospedeiro. A característica dominante é o envelope celular que contém lipídios e açúcares complexos. Os lipídios do envelope celular constituem 40% da massa seca da célula. Este patógeno intracelular infecta células fagocíticas, incluindo macrófagos e neutrófilos (Koch e Mizrahi, 2018).

1.4.2. Infecção, transmissão e fisiopatologia

O curso clássico de infecção da tuberculose pulmonar ocorre por meio da transmissão aérea, e apresenta diversidade nas manifestações clínicas. O Mtb inicia sua infecção por meio do trato respiratório, alojando-se no trato respiratório baixo, onde infecta os macrófagos alveolares e ganha acesso ao interstício pulmonar (Pai et al., 2016). A extensão da infecção depende, primariamente, da resposta imune do hospedeiro, podendo resultar na cura, progressão para forma latente ou forma ativa da TB (Figura 7) (Chetty et al., 2017; Luies and du Preez, 2020). Na forma latente, há uma chance de 5-10% de ativação da doença ao longo da vida, com maior risco nos primeiros dois anos após contágio e nos indivíduos com condições clínicas que enfraquecem o sistema imunológico, tais como HIV/ AIDS, diabetes, câncer, transplante de órgãos, doença renal, abuso de álcool, má nutrição, infecções fúngicas severas, terapia com TNF-alfa, tabagismo, poluição do ar, malignidades, idade avançada da população, entre outros (Salgame et al., 2015; Singh et al., 2019).

Figura 7: Esquema de infecção da tuberculose - Do Mtb à tuberculose pulmonar ativa

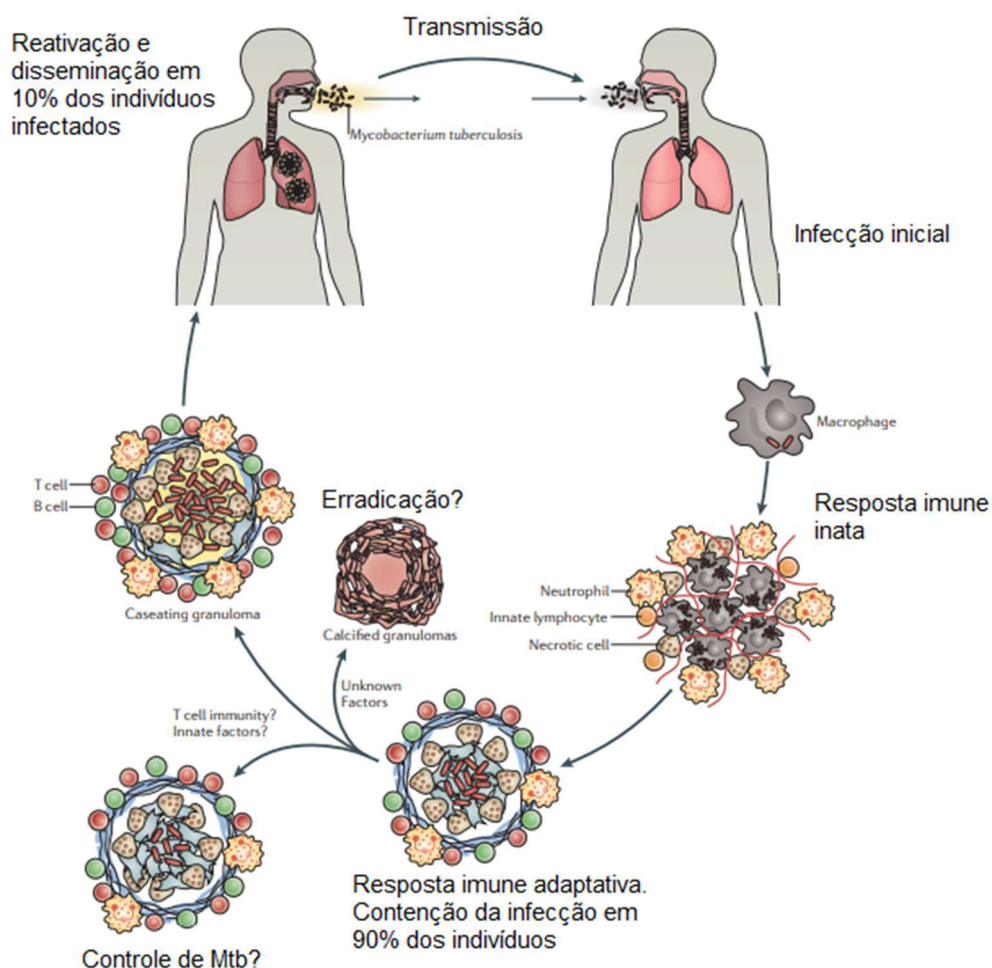


Fonte: Adaptado de Pai et al., 2016

A transmissão da TB pulmonar ocorre a partir de um paciente com a doença ativa para outro indivíduo (Figura 8), por meio de pequenas gotículas de aerossol contendo Mtb, que são expectoradas por tosse, espirro ou fala. Essas gotículas se deslocam pelo trato respiratório, onde a maioria dos bacilos fica presa por células caliciformes secretoras de muco, que têm a tarefa de bloquear a entrada e/ou remover substâncias estranhas. Em alguns casos, no entanto, essas

gotículas podem contornar esse sistema de defesa mucociliar de primeira linha, permitindo que alcancem os alvéolos pulmonares (Cambier et al., 2014; Luies and du Preez, 2020). Neste ponto, durante a infecção, os mecanismos imunes inatos de segunda linha do hospedeiro podem ser recrutados, por meio dos quais os macrófagos alveolares fagocitam os bacilos e tentam destruí-los utilizando enzimas proteolíticas e citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ). Esta reação sinaliza a transferência de linfócitos T para o local da infecção, iniciando uma resposta imune mediada por células, que pode eliminar o organismo infectante ou resultar na formação de granuloma (Luies and du Preez, 2020).

Figura 8: Etapas da patogênese da tuberculose

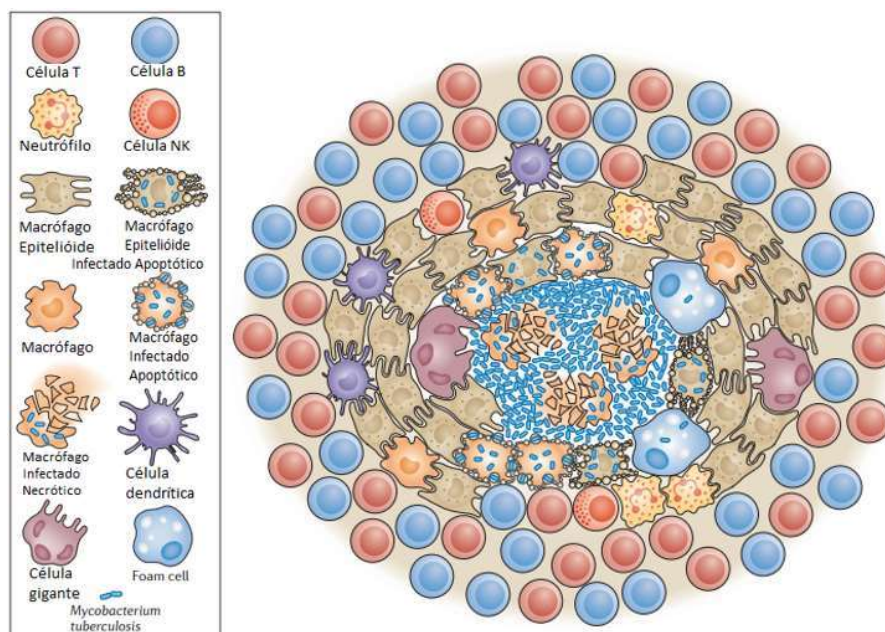


Fonte: Adaptado de Nunes-Alves et al., 2014.

1.4.3. Formação do granuloma

Tuberculose é a causa mais frequente de granuloma (Figura 9), o qual consiste em um agregado organizado de células imunes que é formado em resposta ao estímulo persistente de natureza infecciosa ou não infecciosa (Ramakrishnan, 2012). O granuloma é, basicamente, um agregado organizado de macrófagos maduros, Neutrófilos, células B e T, células NK e células dendríticas, cujas membranas se tornam fortemente interdigitadas como as das células epiteliais, levando-as a serem chamadas de células epitelioides. Macrófagos maduros são caracterizados pelo aumento do citoplasma, maior número de organelas e pelas membranas celulares enrugadas, próprios para torná-los mais fagocíticos (Ramakrishnan, 2012; Cambier et al., 2014).

Figura 9: Estrutura e constituintes celulares do granuloma da tuberculose



Fonte: Adaptado de Ramakrishnan, 2012.

Por muito tempo, o granuloma foi considerado uma estrutura protetora essencial do hospedeiro, um conjunto de diversas células atuando no bloqueio de microrganismos. Entretanto, há uma ligação entre granulomas altamente organizados e altas cargas bacterianas na TB, sugerindo que, em muitos casos,

o granuloma pode ser pelo menos propício a estas altas cargas bacterianas, se não for totalmente favorável a elas (Cambier et al., 2014).

Embora o granuloma em crescimento suporte a expansão do Mtb, os macrófagos dentro desta estrutura geralmente se tornam microbicidas, sugerindo que a bactéria deve ser colocada em uma desvantagem adicional, que pode frequentemente erradicar os bacilos. Por outro lado, parece que o Mtb se adapta rapidamente ao ambiente mais hostil do granuloma, induzindo a transcrição de novos genes ao entrar em um macrófago, o que ajuda na sobrevivência intracelular. Com auxílio da imunidade adaptativa, o granuloma pode esterilizar a infecção na maioria dos casos. Assim, as interações bacterianas com o sistema imune adaptativo do hospedeiro adicionam camadas de complexidade à interface patógeno-hospedeiro (Cambier et al., 2014).

Durante o desenvolvimento inicial, o granuloma é altamente vascularizado (via fator de crescimento endotelial vascular), com os vasos sanguíneos apresentando um extenso manguito linfocítico. À medida que o granuloma se desenvolve, os macrófagos se diferenciam em vários morfotipos (como células epitelioides, células gigantes multinucleadas e macrófagos espumosos), resultando em uma estrutura estratificada com uma camada de linfócitos agregados fora de um manguito fibroso em torno de uma camada rica em macrófagos. Isso significa um granuloma estável que, embora incapaz de eliminar o patógeno, contém os bacilos e suprime a progressão para doença ativa em indivíduos imunocompetentes. No entanto, o Mtb ainda se prolifera nas lesões cicatrizadas, uma vez que os bacilos evitam a morte ao modular o sistema imunológico do hospedeiro e bloquear a fusão fagolisossômica. Na verdade, esse processo cria um nicho dentro desses fagossomas para os bacilos persistirem em um estado de não replicação (dormência) ou replicação lenta, onde podem sobreviver por décadas. Nesse caso, o hospedeiro é assintomático, não transmite a doença e é referido como portador de tuberculose latente (Luies e du Preez, 2020).

1.4.4. Tuberculose latente

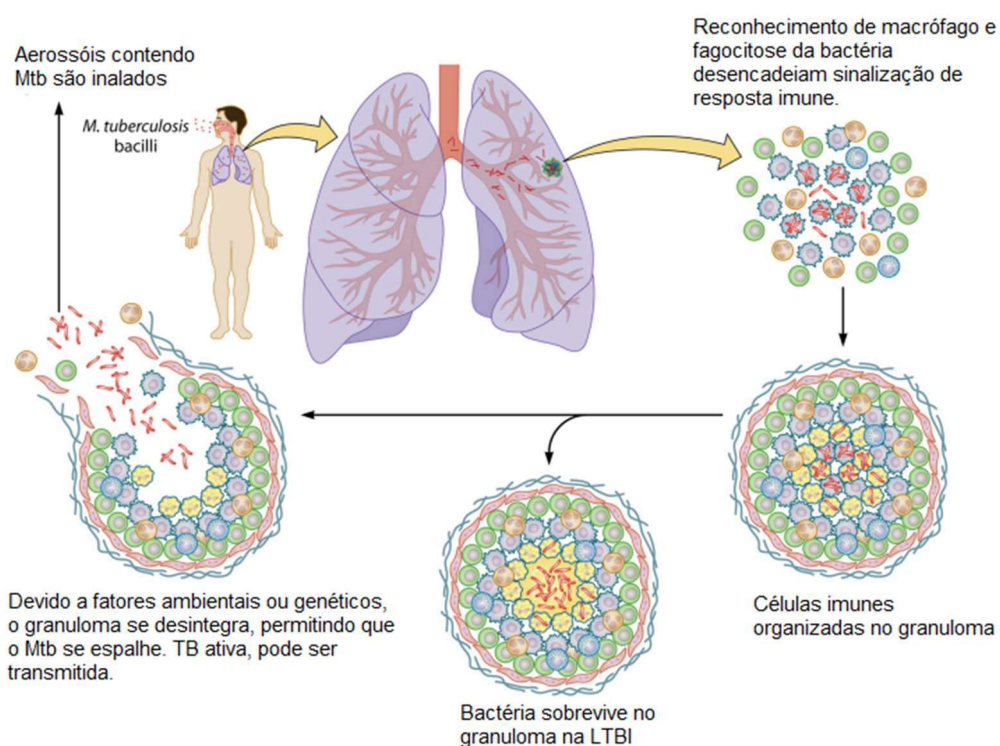
A infecção por Mtb, quando progride para forma latente da tuberculose (LTBI) é definida como a presença de resposta imune aos antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, sem evidência clínica de TB ativa. O termo dormência é utilizado para descrever a doença da tuberculose latente bem como um estado metabólico da bactéria não replicativa. Dentre os diversos tipos de estresses ambientais enfrentados pela bactéria nas células hospedeiras, a hipoxia demonstrou induzir nas bactérias um fenótipo não replicativo, levando à tolerância em relação a certos fármacos, como inibidores da parede celular, como a isoniazida (Koul et al., 2011).

A maior parte dos pacientes infectados com LTBI não possui sinais ou sintomas da doença e não são capazes de infectar outras pessoas. No entanto, estes pacientes correm o risco de desenvolver tuberculose ativa, tornando-se contagiosa. O risco de ativação da TB para um paciente com LTBI documentado é estimada em 5-15%, com a maioria dos casos ocorrendo dentro dos primeiros cinco anos após a primeira infecção (WHO, 2015; Koul et al., 2011; Chetty et al., 2016). O risco de ativação da doença é particularmente preocupante para indivíduos imunocomprometidos, como aqueles coinfectados com vírus HIV, pacientes em terapia com inibidores do fator de necrose tumoral ou pacientes diabéticos (Koul et al., 2011). Tem sido estimado que aproximadamente 1,7 bilhões de pessoas, o que representa 23% da população mundial, tem LTBI e está em risco de desenvolver a forma ativa da doença ao longo da vida. (Houben e Dodd, 2016; Singh et al., 2019).

Além da coinfeção com HIV, diversas causas estão relacionadas com a ativação da TB, como desnutrição, insuficiência renal crônica, diabetes melito não controlada, sepse, malignidade, quimioterapia, abuso de álcool, tabagismo, dependência de drogas e uso de medicamentos imunossupressores, também pode desencadear a conversão da doença de LTBI em TB ativa. Infelizmente, os fatores exatos (sejam ambientais ou não) e os mecanismos que contribuem para a transição da doença permanecem desconhecidos (Luies and du Preez, 2020).

Para estabelecer a infecção em um novo hospedeiro, o Mtb deve sair do granuloma de seu hospedeiro infectado (Figura 10). Há indícios de que a transmissão ocorre de forma mais eficiente em indivíduos com granulomas organizados que sofreram necrose central. Excesso de TNF do hospedeiro é um dos fatores que facilita o processo de necrose, não só liberando os bacilos, mas também formando uma cavidade nas paredes das vias aéreas, contribuindo para o dano pulmonar observado em pacientes com TB. O Mtb é então liberado para se espalhar pelos pulmões e a tuberculose pode passar a ser ativa, desenvolvendo o estado sintomático e altamente infeccioso da doença (Cambier et al., 2014; Luies and du Preez, 2020).

Figura 10: Fisiopatologia da infecção por *Micobacterium tuberculosis*



Fonte: Adaptado de Luies and du Preez, 2020.

1.4.5. Tuberculose ativa

A tuberculose pulmonar ativa apresenta sintomas clínicos de desenvolvimento lento e inespecíficos (Luies and du Preez, 2020). De forma geral, ou em estágio um pouco mais avançado, é caracterizada por tosse crônica com muco, dor no peito, dispneia, respiração ofegante, fraqueza ou fadiga progressiva, perda de peso, perda de apetite, calafrios/ febre, suor noturno, mal-estar e hemoptise (Chetty et al., 2017; Luies and du Preez, 2020). Além desses sintomas clínicos bem conhecidos, várias outras complicações sistêmicas secundárias também foram associadas à TB, incluindo aumento do estresse oxidativo, hiponatremia, hipocolesterolemia, intolerância à glicose, manifestações hematológicas, deficiência de vitamina D, e uma microbiota hospedeira alterada (Luies e du Preez, 2020).

Durante a TB ativa, a resposta imune inflamatória excessiva parece promover dano/ necrose pulmonar por meio da liberação elevada de mediadores imunes, como fatores de transcrição, citocinas e quimiocinas. Estes podem conduzir a expressão de enzimas degradadoras de tecido (proteases, tais como metaloproteinases de matriz) ou podem mediar diretamente a formação de granuloma, tipicamente formado de 6 a 12 semanas após a infecção inicial (Luies and du Preez, 2020). Quando a contenção do granuloma falha, prevalecem diferentes lesões pulmonares, incluindo pneumonia, bronquite, necrose caseosa e eventualmente fibrose. O processo fibrótico em pulmões humanos tem sido associado à presença de TGF- β e das proteases, triptase e quimase. A fase final da patologia da TB culmina em dano irreversível ao tecido pulmonar manifestado por necrose e fibrose (Rodriguez et al., 2021).

1.5. Tratamento

Em 2019, diversos países reportaram a cobertura de vacinação à OMS, dos quais 147 forneceram dados para a cobertura da vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin). Entre os países que recomendam a vacinação universal com BCG, 115 relataram cobertura de BCG superior a 80% e 87 relataram cobertura superior a 90%. Entre os 30 países com alta carga de TB, a cobertura variou de 45% em Papua Nova Guiné a 99% em Bangladesh, China, Tailândia e República Unida da Tanzânia (WHO, 2020).

Apesar da existência de vacina, como a BCG em neonatos e bebês, que reduz o risco de tuberculose em mais de 50% (Inoue e Kashima, 2021), farmacoterapia ainda é a forma mais efetiva de tratar a doença. Os medicamentos utilizados são classificados em grupos (primeira e segunda linha) de acordo com sua eficácia, potência e experiência de uso. Os medicamentos de primeira linha são os mais efetivos e amplamente utilizados para o tratamento da TB ocasionada por cepas sensíveis. Já os de segunda linha são reservados para o tratamento dos bacilos resistentes aos medicamentos de primeira linha. Um fármaco pode ser classificado como de segunda linha por ser menos efetivo, apresentar efeitos adversos tóxicos ou estar indisponível em apenas alguns países (Bailo et al., 2015).

O primeiro objetivo no tratamento da TB é eliminar bactérias extracelulares, principalmente aquelas presentes na cavidade pulmonar, que são as principais responsáveis pela transmissão. Durante os dois primeiros meses de terapia adequada, a grande maioria das bactérias é eliminada, praticamente anulando o risco de transmissão e seleção de mutantes resistentes. O segundo objetivo consiste na eliminação do pequeno número de bactérias viáveis, suscetíveis aos medicamentos e bactérias persistentes (Sgaragli et al., 2016).

O tratamento de TB sensível é feito por meio da administração dos medicamentos de primeira linha que envolve uma fase inicial de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol para os primeiros 2 meses, seguidos da administração de isoniazida e rifampicina pelo período de 4 meses adicionais (WHO, 2017). Esse regime terapêutico tem uma taxa de sucesso de 85%,

promovendo a cura dos pacientes infectados com cepas sensíveis aos fármacos (Singh et al., 2019; WHO, 2020).

O tratamento de pacientes coinfectados com HIV é complexo e dificulta a seleção de um regime terapêutico adequado, principalmente pela interação entre os fármacos, levando a concentrações subterapêuticas dos antirretrovirais, aumento do número de medicamentos administrados diariamente, além da sobreposição da toxicidade e efeitos adversos, o que acarreta comprometimento da segurança dos pacientes e dificuldade na adesão ao tratamento (Koul et al., 2011). No ano de 2019, a taxa de sucesso no tratamento destes pacientes chegou a 76% (WHO, 2020).

O tratamento para cepas resistentes é normalmente mais longo. Por exemplo, o tratamento para RR-TB e MDR-TB pode durar 18 meses ou mais e consiste em fármacos de primeira linha selecionados combinados com diferentes fármacos de segunda linha (por exemplo fluorquinolonas e outros medicamentos injetáveis), que são mais tóxicos e mais caros. De acordo com a OMS, a taxa de sucesso para MDR/ RR-TB chegou a 57% em 2019 (Singh et al., 2019; WHO, 2020) Já para XDR-TB, o tratamento é mais complicado, uma vez que apresenta resistência a isoniazida, rifampicina, além de resistência à fluorquilonas (como levofloxacino e moxifloxacino) e a pelo menos um dos três fármacos injetáveis de segunda linha (amicacina, capreomicina ou canamicina) (Singh et al., 2019).

No Brasil, tem sido seguido o esquema terapêutico conforme recomendações da OMS. O esquema básico de tratamento, para cepas sensíveis, pode ser visto na Figura 11. O esquema básico é utilizado no tratamento de casos novos de tuberculose ou retratamento (recidiva e reingresso após abandono que apresentem doença ativa) em adultos e adolescentes (≥ 10 anos de idade) para todas as apresentações clínicas (pulmonares e extrapulmonares), exceto para a forma meningoencefálica e osteoarticular (BRASIL, 2019).

Figura 11: Esquema básico para o tratamento da tuberculose em adultos e adolescentes (≥ 10 anos de idade).

ESQUEMA	FAIXAS DE PESO	UNIDADE/DOSE	DURAÇÃO
RHZE 150/75/400/275 mg (comprimidos em doses fixas combinadas)	20 a 35 Kg	2 comprimidos	2 meses (fase intensiva)
	36 a 50 Kg	3 comprimidos	
	51 a 70 Kg	4 comprimidos	
	Acima de 70 Kg	5 comprimidos	
RH 300/150 mg [†] ou 150/75 mg (comprimidos em doses fixas combinadas)	20 a 35 Kg	1 comp 300/150 mg ou 2 comp 150/75 mg	4 meses (fase de manutenção)
	36 a 50 Kg	1 comp 300/150 mg + 1 comp de 150/75 mg ou 3 comp 150/75 mg	
	51 a 70 Kg	2 comp 300/150 mg ou 4 comp 150/75 mg	
	Acima de 70 Kg	2 comp 300/150 mg + 1 comp de 150/75 mg ou 5 comp 150/75 mg	

R - Rifampicina; H - isoniazida; Z - Pirazinamina; E - Etambutol.

Fonte: BRASIL, 2019.

1.5.1. Estratégias terapêuticas

Em 1993, a OMS declarou a tuberculose como uma emergência de saúde pública, encerrando um período de negligência global (WHO, 2014). A estratégia terapêutica do Tratamento Diretamente Supervisionado de Curta Duração (DOTS) foi fundamental para o progresso no controle mundial da TB na década de 1995 a 2005, com cerca de 20 milhões de pacientes curados e, no período entre 2000 e 2015, cerca de 49 milhões de pessoas curadas ao redor do mundo (WHO, 2016). Apesar do número total de mortes ter diminuído, TB permanece como uma das dez causas de morte no mundo (WHO, 2020).

A estatística global demonstrou que o DOTS isoladamente não seria suficiente para alcançar o objetivo proposto até 2015, conforme estratégia Stop TB (Raviglione and Uplekar, 2006). Desta forma, o ano de 2015 foi o ano de revisão das estratégias globais, que culminou na transição para a estratégia End TB (WHO, 2015). Esta estratégia cobre o período de 2016 a 2035, com a definição de metas para os anos de 2020, 2025 e 2030 e o objetivo é o controle da epidemia global de TB, com uma expressiva redução percentual no número absoluto de mortes por TB até 2035 (redução de 95% no número de mortes e redução de 90% na incidência de TB), cujos pilares são: integração paciente-

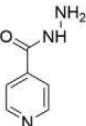
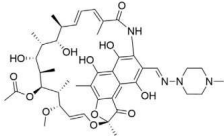
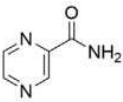
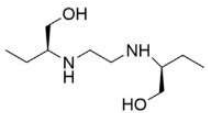
centro de saúde e prevenção, políticas arrojadas e sistemas de apoio, além de intensificar pesquisa e inovação (WHO, 2016; Singh et al., 2019).

1.5.2. Medicamentos utilizados

Como foi descrito anteriormente, os medicamentos para o tratamento de TB são divididos entre primeira e segunda linha e a escolha do regime terapêutico depende das características particulares de cada caso, variando para TB sensível e as diferentes resistências aos medicamentos disponíveis.

Os medicamentos de primeira linha, que são os medicamentos mais utilizados, são Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida e Etambutol. A Tabela 1 traz a estrutura química destes fármacos, bem como um resumo do alvo e mecanismo de ação.

Tabela 1: Medicamentos de primeira linha utilizados para tratamento da Tuberculose

Fármaco	Estrutura Química	Alvo	Mecanismo de Ação
Isoniazida		Múltiplos Alvos. O principal é a proteína InhA (2-trans-enoil-ACP(COA) redutase)	Inibição da biossíntese de ácidos micólicos da parede celular. (Tem efeito no DNA, lipídeos, carboidratos e metabolismo de NAD).
Rifampicina		Subunidade β da RNA polimerase	Inibe a síntese de RNA
Pirazinamida		Múltiplos, como componente S1 da subunidade 30S ribossomal	Múltiplos, incluindo inibição da tradução de proteínas
Etambutol		Arabinoil transferase	Inibe a síntese de parede celular

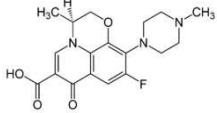
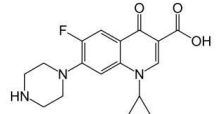
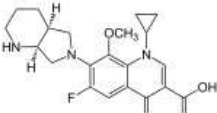
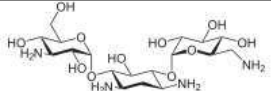
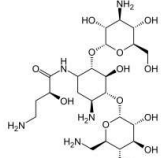
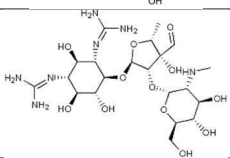
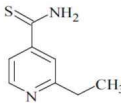
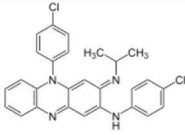
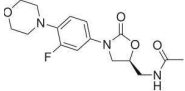
Fonte: Adaptado de Chetty et al., 2017.

As diretrizes terapêuticas para o tratamento de TB resistente são atualizadas pelo Grupo de Desenvolvimento de Diretrizes (GDD) da OMS. O

material mais recente recomenda um regime de 9 a 12 meses de tratamento de pacientes com RR/MDR-TB. Os medicamentos utilizados são separados em grupos e o grupo de medicamentos utilizados para o tratamento de MDR/RR-TB, bem como para XDR-TB, é recomendado pelo GDD baseado na revisão de atualizações das evidências quanto a sua efetividade e segurança. Os medicamentos do chamado “grupo 2” formam os componentes principais de medicamentos de segunda linha e são classificados em quatro subgrupos (A, B, C e D). De acordo com a OMS, somente os medicamentos destes quatro subgrupos são relevantes para o tratamento de MDR-TB, embora sejam mais caros e apresentem efeitos adversos mais tóxicos (Singh et al., 2019).


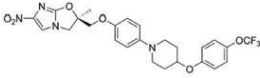
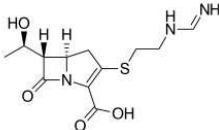
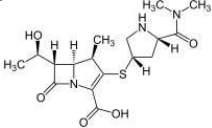
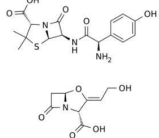
O grupo A inclui fluorquinolonas de administração por via oral, como levofloxacino, ciprofloxacino e moxifloxacino. O grupo B inclui medicamentos injetáveis de segunda linha, como os aminoglicosídeos canamicina, amicacina e estreptomicina. O grupo C consiste em etionamida, clofazimina e linezolida (Tabela 2). Já o grupo D (Tabela 3) é subdividido em D1 (medicamentos anti-TB de primeira linha como pirazinamida, etambutol e isoniazida em altas doses), D2 (bedaquilina e delamanida) e D3 (outros agentes com papel incerto no tratamento de MDR-TB, como imipenem, meropenem e amoxicilina com clavulanato) (Singh et al., 2019).

Tabela 2: Medicamentos de segunda linha dos grupos A, B e C utilizados para tratamento da Tuberculose resistente

Grupo	Fármaco	Estrutura Química	Alvo	Mecanismo de Ação
A	Levofloxacinó		Topoisomerase II (DNA girase - <i>gyrA</i>)	Inibição replicação do DNA
A	Ciprofloxacino		Topoisomerase II (DNA girase)	Inibição replicação do DNA
A	Moxifloxacino		Topoisomerase II (DNA girase)	Inibição replicação do DNA
B	Canamicina		<i>rrs; whiB7</i>	Inibe síntese proteica
B	amicacina		<i>rrs; whiB7</i>	Inibe síntese proteica
B	estreptomicina		<i>rpsL; rrs e gidB</i>	Inibe síntese proteica
C	etionamida		Múltiplos alvos	Inibe síntese de ácidos micólicos
C	clofazimina		<i>Rv0678; Rv2535c e Rv1979c</i>	Interfere no balanço redox
C	linezolidá		<i>rrl e rplC</i>	Inibe síntese proteica

Fonte: Adaptado de Singh et al., 2019

Tabela 3: Medicamentos de segunda linha do grupo D para tratamento da Tuberculose resistente

Grupo	Fármaco	Estrutura Química	Alvo	Mecanismo de Ação
D2	Bedaquilina		<i>atpE</i> ; <i>Rv0678</i> (<i>mmpR</i>)	Inibe homeostase de ATP
D2	Delamanida		Coenzimas de <i>F420</i>	Inibe síntese de ácidos micólicos e proteínas
D3	Imipenem		<i>Rv2163c</i> (<i>ftsI</i>)	Inibe síntese de parede celular
D3	meropenem		<i>Rv2163c</i> (<i>ftsI</i>)	Inibe síntese de parede celular
D3	Amoxicilina com clavulanato		<i>blaC</i> ; <i>ponA</i> e <i>Pbp</i>	Inibe síntese de parede celular

Fonte: Adaptado de Singh et al., 2019.

1.5.3. Resistência a múltiplos fármacos

Pouco tempo após a introdução do primeiro antibiótico, em 1944, a resistência foi relatada, possivelmente associada à utilização da estreptomicina como monoterapia. Com a descoberta de diversos fármacos com atividade anti-TB, a terapia utilizando mais de um fármaco tornou-se fundamental para o controle da doença. Entretanto, novas formas de resistência tornam-se corriqueiras, como TB resistente a múltiplos fármacos (MDR-TB) e TB extensivamente resistente (XDR-TB), causada por cepas MDR que também são resistentes a todas as fluorquinolonas e alguns fármacos injetáveis (Silva e Palomino, 2011).

No *Mtb*, o desenvolvimento de resistência aos fármacos é ocasionado, muitas vezes, por mutações espontâneas em genes, desencadeada por seleção de cepas resistentes em terapias inadequadas (monoterapias ou terapias

incompletas, concentrações subterapêuticas, fornecimento irregular de medicamentos, baixa adesão ao tratamento, etc.) (Bailo et al., 2015). Os mecanismos através dos quais as bactérias adquirem resistência envolvem os mecanismos de barreira (com redução da permeabilidade ou aumento do efluxo), degradação ou inativação de enzimas, modificação das rotas envolvidas na ativação e no metabolismo dos fármacos, além de mutações pontuais ou não que alteram os alvos moleculares dos fármacos utilizados (Bailo et al., 2015).

Conforme mencionado, MDR-TB são denominadas as cepas resistentes a pelo menos isoniazida e rifampicina, os dois principais medicamentos de primeira linha utilizados. Esta resistência pode resultar de infecção primária com bactérias resistentes a medicamentos ou pode desenvolver-se no curso do tratamento de um paciente quando o tratamento não acontece nas condições ideais, como por exemplo, quando o tratamento é interrompido. As XDR-TB são as cepas resistentes à isoniazida e à rifampicina, bem como a qualquer fluoroquinolona e qualquer um dos medicamentos injetáveis de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina). XDR-TB tem altas taxas de mortalidade (WHO, 2017).

De acordo com as diretrizes da OMS, a detecção de MDR/ RR-TB requer a confirmação bacteriológica da TB e o teste de resistência aos medicamentos (utilizando testes moleculares rápidos, métodos de cultura ou tecnologias de sequenciamento). O tratamento requer um curso de medicamentos de segunda linha por pelo menos 9 meses (e até 20 meses), apoiado por aconselhamento e monitoramento de eventos adversos. A OMS recomenda acesso expandido a regimes totalmente orais. Houve algum progresso nos testes, detecção e tratamento de MDR/ RR-TB entre 2018 e 2019. Globalmente em 2019, 61% das pessoas com TB bacteriologicamente confirmada foram testadas para resistência à rifampicina, contra 51% em 2017 e 7% em 2012. A cobertura do teste foi de 59% para novos pacientes e 81% para pacientes com TB previamente tratados. Um total global de 206 030 pessoas com MDR/ RR-TB foi detectado e notificado em 2019, o que representa um aumento de 10% (WHO, 2020).

Em 2019, surgiram cerca de 500 mil novos casos de resistência à Rifampicina (RR-TB) no mundo, dos quais 78% foi TB resistente a múltiplos

fármacos (MDR-TB). Os três países que somaram a maior carga global foram Índia (27%), China (14%) e Rússia (8%). Mundialmente, 3,3% dos novos casos de TB e 17,7% de casos previamente tratados foram de MDR/RR-TB. A taxa global de sucesso do tratamento, para estes casos, foi de 57%. Países com alta carga de MDR-TB, mas com cobertura de tratamento relativamente alta, têm maiores taxas de sucesso para MDR/RR-TB ($\geq 75\%$) e três países exemplo de sucesso são: Etiópia, Cazaquistão e Mianmar (WHO, 2020). De acordo com os dados mais recentes relatados em estudos de coorte anuais de MDR-TB, daqueles afetados pela doença que iniciaram o tratamento para MDR-TB, apenas 57% completaram o tratamento com sucesso, 16% perderam o acompanhamento, 7% tiveram tratamento que falhou e 15% morreram, enquanto para 5% não havia informações sobre o desfecho. Quando esses achados são comparados com os resultados em casos novos ou recorrentes de TB sensível (que tem cerca de 85% de cura), eles são muito baixos para aqueles com MDR-TB, destacando um dos principais desafios globais da doença (Santos et al., 2021).

Resistência a muitos antibióticos utilizados na prática clínica é hoje um dos principais problemas de saúde pública, uma vez que o crescente número de bactérias patogênicas não responde aos medicamentos disponíveis. Por esta razão, é imprescindível a identificação de novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas classes de antibióticos (Monti et al., 2016).

1.6. Desenvolvimento de novos fármacos

Atualmente, o controle global da tuberculose em nível mundial vem enfrentando grandes desafios. Em primeiro lugar, ainda é necessário muito esforço para tornar acessível o atendimento de qualidade sem barreiras de gênero, idade, estrato social e socioeconômico. A coinfeção com HIV (TB/HIV), especialmente na África, além do crescente número de casos de cepas resistentes em todas as regiões, mas principalmente no leste da Europa, tornam o controle da doença difícil e complexo. Compromisso e apoio amplo ao desenvolvimento e implantação de novos sistemas de diagnósticos, fármacos e vacinas representam grandes desafios à sua implementação (Raviglione e Uplekar, 2006; Sgaragli et al., 2016; Jacobs et al., 2016).

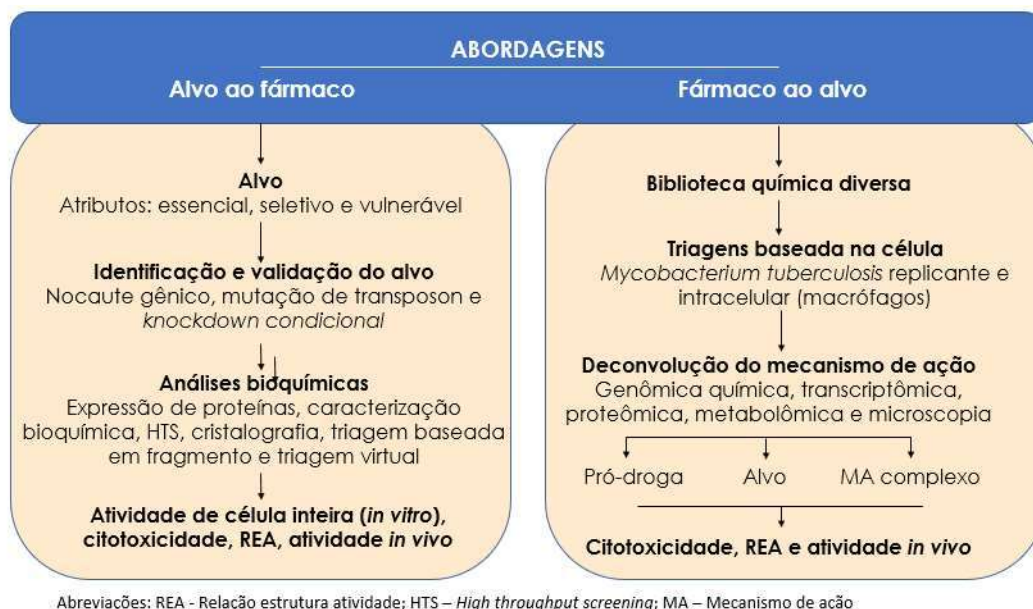
Para alcançar o controle mundial desta epidemia, há a urgente necessidade de novos fármacos anti-TB, cujas características desejadas são: tratamentos de curta duração; eficácia contra cepas MDR e XDR; simplificação do tratamento por meio da redução diária da administração de medicamentos; redução na frequência de doses (por exemplo, regime de administração semanal) e coadministração com medicamentos anti-HIV.

1.6.1. Estratégias de desenvolvimento

No caso da TB, há algumas considerações especiais no desenvolvimento de candidatos a fármacos, que incluem a capacidade de penetração dos compostos em células eucarióticas, como macrófagos, células dendríticas e dentro de fagolisossomos presos. Os fármacos precisam entrar também nas lesões cavitárias, que concentram muitos organismos que se multiplicam ativamente durante a TB ativa e nos núcleos necróticos e pouco vascularizados dos granulomas, onde podem residir os bacilos persistentes responsáveis pela recidiva clínica. Além disso, dada a dramática convergência das pandemias de TB e HIV, os medicamentos para TB sem interações medicamentosas com agentes antirretrovirais, são urgentemente necessários (Kana et al., 2014).

Mais de uma década se passou desde a primeira publicação que descreve a identificação da bedaquilina. Desde então, os esforços no desenvolvimento de novos fármacos anti-TB foram gradualmente aumentados, principalmente com a utilização de estratégias como abordagens baseadas em alvos (*target based*) e/ou triagem fenotípica (*phenotypic screening*) (Figura 12). As abordagens baseadas em alvo produziram candidatos a fármacos que não tinham drogabilidade ou demonstraram altas concentrações inibitórias mínimas (CIM). Triagem fenotípica, como aquelas que resultaram na identificação de bedaquilina ou delamanida, foram estratégias mais bem sucedidas ao promover rastreios adicionais de alto rendimento (Dal Molin et al., 2019).

Figura 12: Estratégias utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose



Fonte: Singh and Mizrahi, 2017

A estratégia baseada no alvo vem sendo sustentada pelo desenvolvimento de recursos pós-genômicos, incluindo dados de essencialidade do gene inferidos a partir de *genome-wide mutagenesis screens*. No entanto, as abordagens baseadas em alvos para o desenvolvimento de fármacos para TB tiveram sucesso limitado, com uma falta de conhecimento sobre a vulnerabilidade do alvo e questões relacionadas à penetração, metabolismo e efluxo de fármacos. Em contraste, as abordagens de triagem fenotípicas para identificar moléculas *hit* com atividade contra Mtb, têm sido mais bem-sucedidas, conforme evidenciado pelo desenvolvimento de novos candidatos a fármacos

(Kana et al., 2014; Singh and Mizrahi, 2017). Avanços significativos em genética micobacteriana, biologia, química e tecnologias forneceram um conjunto de ferramentas cada vez mais poderoso que permitiu que os pontos fortes de ambas as abordagens fossem mais efetivamente aproveitadas tanto sozinhas, quanto em combinação, para preencher o painel de medicamentos para TB com ligações de alta qualidade que atuam em alvos farmacologicamente validados (Singh and Mizrahi, 2017). A seguir, são destacadas algumas características das duas estratégias utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos anti-TB.

- Estratégia baseada no alvo (*target-to-drug* ou *target based*):

Os principais critérios utilizados para a seleção de alvos, ao empregar a estratégia baseada no alvo são: essencialidade para o crescimento e/ ou sobrevivência de Mtb, de preferência sob condições que mimetizam aquelas encontradas durante a infecção do hospedeiro; e seletividade do alvo, isto é, a falta de uma contraparte humana ou distinção estrutural suficiente do homólogo humano para reduzir o risco de toxicidade do medicamento (Singh and Mizrahi, 2017).

A essencialidade do gene foi investigada extensivamente em Mtb por meio de genética reversa e direta para construir nocautes de genes direcionados por recombinação homóloga e bibliotecas de mutantes de transposon de alta densidade. A aplicação dessas ferramentas permitiu que os genes necessários para o crescimento de Mtb em várias condições de crescimento *in vitro*, durante a infecção de macrófagos ou em modelos animais de infecção fossem inferidos e, em alguns casos, confirmado. No entanto, um terceiro critério para a seleção do alvo é o da vulnerabilidade, que é uma consideração essencial para o resultado bem-sucedido de uma abordagem baseada em alvos para a descoberta de fármacos. Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos para criar mutantes de *knockdown* condicional de Mtb, inicialmente por meio de silenciamento transcricional, seguido de degradação de proteína regulada e, mais recentemente, por interferência de repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas em cluster (CRISPRi), forneceu uma adição criticamente importante ao arsenal de ferramentas genéticas para validação de alvos (Singh and Mizrahi, 2017).

- Estratégia baseada na triagem fenotípica (*drug-to-target* ou *phenotypic screening*):

Os componentes principais utilizados nesta estratégia, para o desenvolvimento de novos fármacos, são: bibliotecas de compostos quimicamente diversos; ensaios de triagem baseados em células (de preferência em condições similares das encontradas durante a infecção do hospedeiro); e métodos para identificar o mecanismo de ação de compostos. Um componente central do conjunto de ferramentas para a identificação do mecanismo de ação de *hits* de triagem fenotípica contra Mtb é a elucidação de seus mecanismos de resistência por sequenciamento completo do genoma de mutantes resistentes ao composto, seguido por confirmação genotípica por *recombineering* e/ou complementação. No entanto, mesmo com o advento de novas tecnologias, a identificação de alvos permanece um desafio. Nesta abordagem, coleções de compostos específicos são tipicamente rastreadas quanto à atividade contra Mtb replicante, não replicante e/ou intracelular. As abordagens fenotípicas têm suas próprias limitações e complexidades, que incluem a necessidade de elucidação do mecanismo de ação para identificar o alvo molecular do composto. No entanto, este processo pode ser complicado e demorado devido à desconexão frequente entre o mecanismo de resistência de uma molécula *hit* identificada em uma triagem fenotípica e seu mecanismo de ação, e a taxa comparativamente alta de descoberta de pró-fármacos, bem como de compostos que exibem polifarmacologia (Singh and Mizrahi, 2017).

Independente da estratégia escolhida, o processo de desenvolvimento de fármacos é longo e apresenta diversos desafios. Um destes desafios consiste na escolha de alvos. Alvos que visam a inibição de enzimas necessárias para processos múltiplos e independentes no metabolismo celular, oferece a vantagem de inibir várias vias metabólicas de uma só vez. A inibição desses alvos levaria à rápida morte celular, devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos. Além disso, esta estratégia tem como vantagens não só uma melhor eficácia e efeitos adversos mínimos, mas também há uma redução dos custos e do tempo de desenvolvimento antes de chegar ao mercado. Estes alvos incluem enzimas das vias de aminoácidos, biossíntese de cofator, biossíntese de purina/

pirimidina e biossíntese de parede celular, o que faz com que as enzimas destas vias sejam alvos interessantes e amplamente estudados (Kana et al., 2014; Demurtas et al., 2019).

Outra característica necessária para a escolha de um alvo molecular, é a capacidade de modular o alvo por meio de moléculas ligantes, ou seja, a drogabilidade do alvo. Existem vários algoritmos para prever a drogabilidade do alvo, sendo o mais simples uma avaliação se o suposto alvo faz parte de uma família maior de proteínas que têm um histórico comprovado de alvos clinicamente validados. Também é muito utilizada a avaliação da estrutura tridimensional de proteína, para determinar a diversidade no espaço estrutural para ligação de pequenas moléculas. Isso permite a elucidação de fatores importantes, como a profundidade relativa dos bolsos de ligação para inserção de pequenas moléculas, efeitos de impedimento estérico e rearranjo estrutural localizado. No entanto, no caso de Mtb, tais abordagens são limitadas durante a triagem devido à má difusão de moléculas através da parede celular. Outra característica dos alvos drogáveis é a capacidade de desenvolver um ensaio bioquímico ou baseado em células inteiras, para avaliar a atividade catalítica e a inibição durante a triagem de alto rendimento (*high-throughput screening*). Mecanismos enzimáticos de várias etapas com substratos/ produtos instáveis contribuem para o desenvolvimento deficiente do ensaio e limitam a capacidade de avaliar completamente a inibição de um alvo (Kana et al., 2014).

A consideração das propriedades físico-químicas dos compostos, durante a descoberta de um composto líder, também é uma etapa crítica. Frequentemente, compostos com alta lipofilicidade são gerados para melhorar a potência *in vitro*, resultando em propriedades farmacocinéticas pobres *in vivo* e perda de seletividade. Após a validação química de um alvo e a identificação de um composto líder, a fase de otimização visa identificar novos análogos com potência aprimorada, boa tolerabilidade, propriedades físico-químicas semelhantes a medicamentos e perfil farmacocinético favorável. Este processo é realizado por modificações na estrutura de interesse com base no conhecimento da relação estrutura-atividade (REA) (Kana et al., 2014).

Numerosas razões contribuem para intercorrências na descoberta de novos agentes antimicrobianos, incluindo toxicidade, baixa entrada do fármaco na célula, processo de síntese complexo e propriedades farmacocinéticas/dinâmicas fracas. Os primeiros ensaios de toxicidade *in vitro* incluem determinações de citotoxicidade, cardio-, geno- e fototoxicidade, além da determinação da ligação a receptores humanos. Considerando que o tratamento atual da TB envolve a administração prolongada de medicamentos, as análises toxicológicas acima mencionadas podem fornecer informações limitadas. Portanto, a detecção de toxicidade continua sendo uma etapa crítica na identificação de novos fármacos e, em alguns casos, as propriedades tóxicas são caracterizadas ou descobertas apenas para compostos em etapas mais avançadas de estudo, por exemplo, nos ensaios de toxicidade aguda em camundongos (Kana et al., 2014).

Em virtude do ainda limitado conhecimento dos microambientes encontrados por bacilos persistentes, que são responsáveis pela duração prolongada do tratamento, é muito difícil mimetizar as condições ideais nos testes de identificação de novas moléculas. É geralmente aceito que os atuais modelos *in vitro* e animais são inadequados em sua capacidade de replicar o complexo espectro da TB humana. Por esta razão, modelos pré-clínicos preditivos mais precisos são urgentemente necessários. Além da fundamental identificação de novos fármacos com atividade contra LTBI para auxiliar nos esforços globais de erradicação da TB, uma vez que 1,7 bilhões de pessoas com esta forma de TB representam um vasto reservatório para reativação e transmissão contínuas, especialmente no cenário da coinfeção com HIV. O conhecimento da LTBI é dificultado pela falta de modelos de pesquisa adequados e ferramentas moleculares para estudar a condição (Kana et al., 2014).

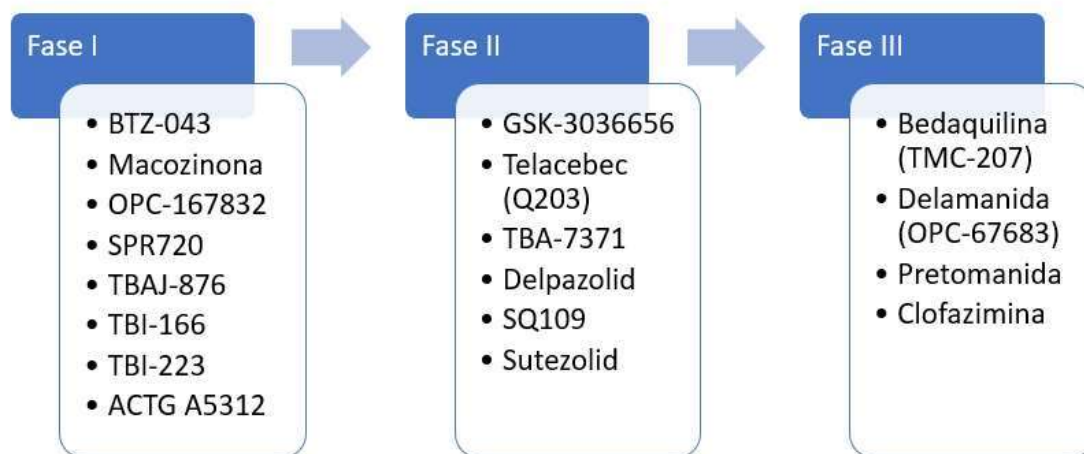
Desta forma, a identificação de novas moléculas, com as características citadas é um desafio enorme no enfrentamento à epidemia de TB. É necessária a união de esforços e alto investimento em tecnologia e mão-de-obra qualificada para o estudo e identificação de novas moléculas e novos alvos.

1.6.2. Panorama geral dos novos fármacos para o tratamento da tuberculose

Uma Estratégia Global para Pesquisa e Inovação em TB foi adotada por todos os Estados Membros da OMS por meio de uma resolução da Assembleia Mundial da Saúde em agosto de 2020. A estratégia visa apoiar os países e as partes relevantes interessadas, para traduzir os compromissos firmados na Declaração de Moscou e na declaração política da reunião sobre TB da ONU, em ações concretas (WHO, 2020).

Segundo a OMS, em agosto de 2020, havia 22 medicamentos, vários regimes de combinação e 14 vacinas candidatas em ensaios clínicos no mundo (WHO, 2020). Na Figura 13, estão descritos os fármacos nas suas correspondentes fases de estudo clínico.

Figura 13: Pipeline global de ensaios clínicos de novos fármacos anti-TB para o tratamento da tuberculose



Fonte: Adaptado de WHO, 2020.

Dos fármacos listados em Fase I (Tabela 4), BTZ-043, OPC-167832 e Macozinone (Figura 14) são moléculas pertencentes a nova classe química e são inibidoras de DprE1 (decaprenylphosphoryl- β -D-ribose 2'-oxidase), uma enzima essencial para a biossíntese de parede celular. BTZ-043 demonstrou valor de MIC de 2,3 nM para *M. tuberculosis* H37Rv e macozinone demonstrou

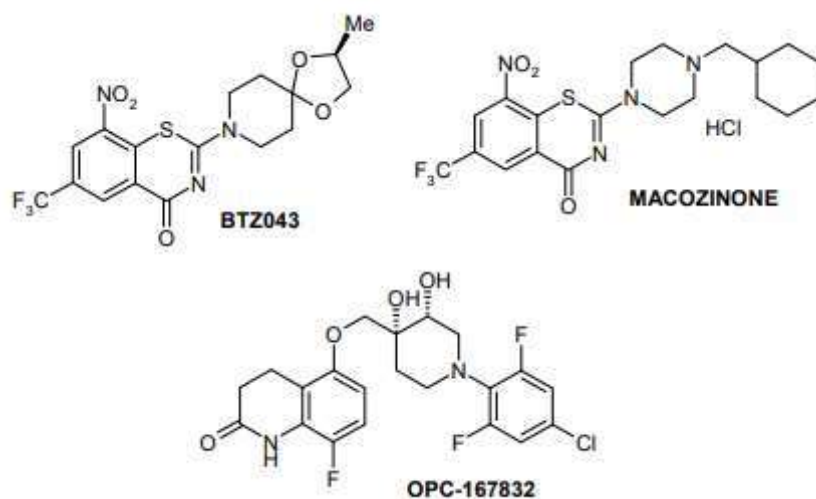
MIC na faixa de 0.19–0.75 ng/mL. Enquanto a molécula OPC-167832 demonstrou MIC na faixa de 0,24 a 2 ng/mL (Makarov e Mikušová, 2020).

Tabela 4: Fármacos em estudo clínico Fase 1

Nome	Classe	Mecanismo de ação	Alvo
BTZ-043	Benzothiazinona	Inibição da síntese de parede celular (D-arabinofuranose)	DprE1 e DprE 2
OPC-167832	3,4-Diidrocarboestiril	Inibição da síntese de parede celular	DprE1
Macozinone	Benzothiazinona	Inibição da síntese de parede celular	DprE1
TBI-166	iminoferazina	Pode ser similar a clofazimine (Fase 3)	Mecanismo exato desconhecido. Pode ser similar a clofazimine

Fonte: WHO, 2020; Singh et al., 2019 e Hariguchi et al., 2020.

Figura 14: Moléculas inibidoras de *DprE1* em ensaio clínico Fase 1



Fonte: Adaptado de Makarov e Mikušová, 2020

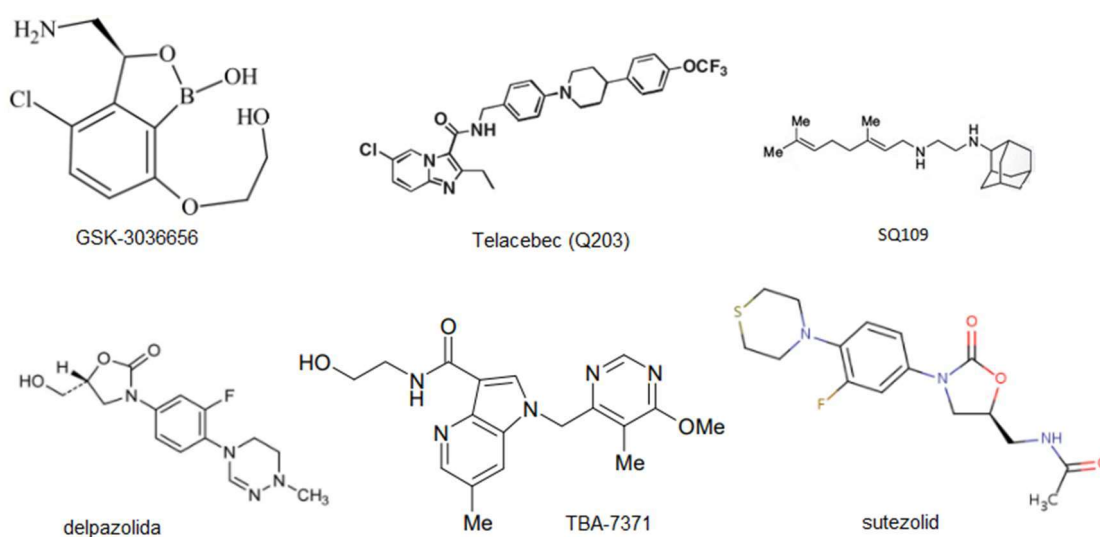
Dos fármacos listados em Fase II de estudo (Tabela 5), GSK-3036656, Telacebec (Q203) e TBA-7371 são moléculas pertencentes a nova classe química. A molécula GSK-3036656 demonstrou MIC inferior a 0,1 μ M frente à cepa laboratorial H37Rv; Q203 demonstrou MIC₅₀ de 2,7 nM (Petthe et al., 2013).

Tabela 5: Fármacos em estudo clínico Fase 2

Nome	Classe	Mecanismo de ação	Alvo
GSK-3036656	Oxaborole	Inibição da síntese proteica	LeuRs (Leucyl-tRNA synthetase)
Telacebec (Q203)	Imidazopiridina	Inibe síntese de ATP	<i>QcrB</i>
TBA-7371	Azaindol	Inibe síntese de parede celular	DprE1
Delpazolid	Oxazolidiona	Bloqueia síntese de proteínas	Síntese proteica (23S rRNA)
SQ109	Ethylenediamine	Inibe síntese de parede celular	MmPL3
Sutezolid	Oxazolidiona	Bloqueia síntese de proteínas	<i>rplC</i>

Fonte: WHO, 2020; Singh et al., 2019 e Gawad e Bonde, 2018.

Figura 15: Moléculas em estudo clínico Fase 2



Fonte: Próprio autor

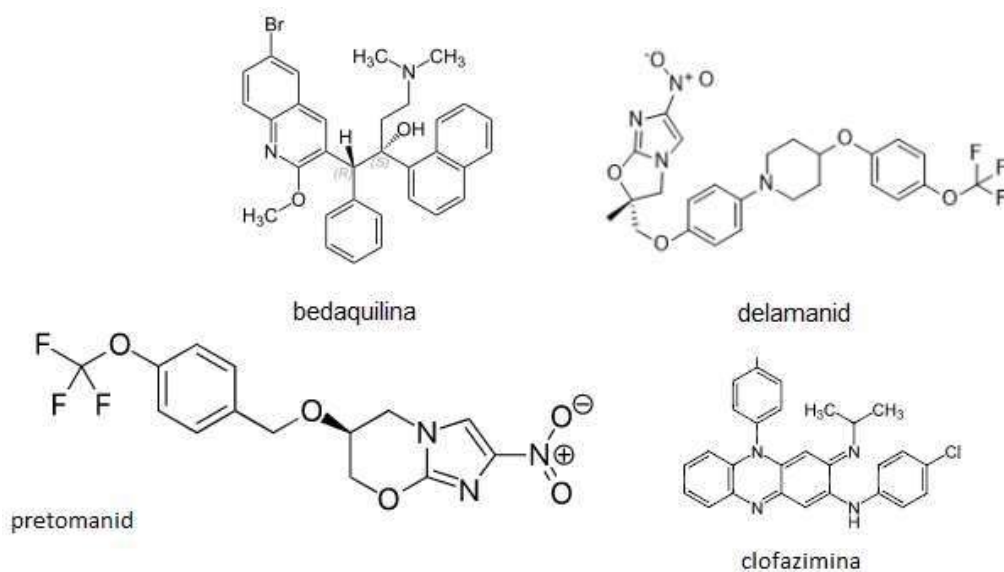
Dos fármacos listados em Fase III de estudo (Tabela 6) (Figura 16), Bedaquilina e Delamanida são moléculas pertencentes a nova classe química, já estão disponíveis no mercado e listadas no grupo D de medicamentos utilizados para tratamento de cepas resistentes. Nesta tabela, aparecem como em Fase 3 em virtude do estudo de diversas combinações em diferentes esquemas terapêuticos utilizando estes fármacos.

Tabela 6: Fármacos em estudo clínico Fase 3

Nome	Classe	Mecanismo de ação	Alvo
Bedaquilina (TMC-207)	Diarilquinolina	Inibe homeostase de ATP	<i>atpE</i> e <i>mmpR</i>
Delamanida (OPC-67683)	Nitroimidazol	Inibe ácidos micólicos e síntese de proteínas	Genes da Coenzima F420
Pretomanid	Nitroimidazol	Inibe síntese de proteínas e lipídeos	Rv3547
Clofazimina	iminoferazina	Interfere no balanço redox	Rv0678, Rv2535c e Rv1979c

Fonte: WHO, 2020 e Singh et al., 2019

Figura 16: Moléculas em estudo clínico Fase 3



Fonte: Próprio autor

Além das moléculas em estudos clínicos, há algumas moléculas em fase de estudos pré-clínicos ou em estudos *in vitro*, como por exemplo moléculas da classe Oxadiazol-2-one (GL5 e HT1171) inibidores do proteassoma e análogos de capuramicina (SQ641) que inibe a síntese de peptídeoglicano, atuando no receptor TL-1 (Singh et al., 2019). Há também estudos de reposicionamento de fármacos e diversos estudos com diferentes combinações de medicamentos, com objetivo de avaliar o efeito dos diferentes esquemas terapêuticos.

1.7. Indóis

A química de heterociclos é uma das fontes mais valiosas de novos compostos com atividade farmacológica diversa, principalmente por causa da capacidade única dos compostos resultantes de mimetizar a estrutura dos peptídeos e se ligar reversivelmente às proteínas. Combinações quase ilimitadas de estruturas heterocíclicas podem ser projetadas, resultando em novas estruturas policíclicas com as mais diversas propriedades físicas, químicas e biológicas. A fusão de vários anéis leva a estruturas policíclicas rígidas geometricamente bem definidas e, portanto, traz a promessa de uma alta especialização funcional resultante da capacidade de orientar substituintes no espaço tridimensional. Portanto, metodologias eficientes que resultam em estruturas policíclicas de modelos heterocíclicos farmacologicamente ativos são sempre de interesse para química orgânica e medicinal (Kaushik et al., 2013).

O anel indólico é um dos compostos naturais mais difundidos como componente de produtos biologicamente ativos. Por sua ampla gama de atividades biológicas e sua habilidade de se ligar a muitos receptores com alta afinidade (Reddy e Pal, 2020), é considerado uma estrutura privilegiada em química medicinal. Nos últimos anos, o indol surgiu como um esqueleto molecular versátil para o desenvolvimento de novos agentes com diversas atividades farmacológicas, como: anticâncer, em particular inibidores da tubulina; antimicrobiano, antiviral, anti-TB, antiinflamatório, modulador do receptor 5-HT_{2C}, antioxidante, analgésico, anticonvulsivante, antimalárico, anti-hipertensivo, atividades anti-hiperglicêmicas, antifertilidade, anti-Parkinson e gastroprotetora (Demurtas et al., 2019; Shareef et al., 2019; Tariq et al., 2020; Reddy e Pal, 2020).

Nos últimos anos, diversas moléculas derivadas de indol, tais como alcalóides à base de indol, indóis simples, fundidos e idolamidas, por exemplo, demonstraram atividade anti-TB. Algumas destas moléculas tiveram o alvo farmacológico específico ou o mecanismo de ação identificados. Entre os alvos moleculares descritos em *Mycobacterium tuberculosis* podem ser destacados:

- Corismato mutase: converte corismato, produto da via do chiquimato, em pefenato que serve de substrato para síntese de tirosina e fenilalanina. Por ser ausente em humanos, este alvo é considerado promissor para descoberta e desenvolvimento de novos potenciais fármacos com atividade anti-TB. O composto *N*-[4-fluoro-2-{5-fluoro-1-(methylsulfonyl)-1*H*-indol-2-yl}phenyl]methanesulfonamide, por exemplo, demonstrou atividade anti-TB com MIC no valor de 17,02 μM (Reddy e Pal, 2020);
- Proteína tirosina fosfatase B (MptpB): Esta enzima é um alvo interessante em razão da sua localização externa à parede celular e está associada à modulação da interação patógeno-hospedeiro. Dos derivados indólicos que se mostraram ativos contra Mtb, um composto contendo grupo carbonila na posição C-3 do anel indólico demonstrou 81% de inibição (com 1 μM) da enzima MptpB, com $\text{IC}_{50} = 0,079 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Outros derivados funcionalizados contendo anel piperidina fusionado, também demonstraram atividade neste alvo, com $\text{IC}_{50} = 1,13 \pm 0,63 \mu\text{M}$ e $\text{IC}_{50} = 4,71 \pm 1,14 \mu\text{M}$, por exemplo (Reddy e Pal, 2020);
- Diidrofolato redutase (DHFR) pertence à via de biossíntese de folato, catalisa a conversão de diidrofolato em tetraidrofolato, um co-fator na produção de timidilato, essencial para síntese de DNA, RNA e proteínas. Assim como foi descrito para inibidores de MptpB, derivados indólicos contendo grupo carbonila na posição 3 do anel indólico, têm sido explorados como inibidores de DHFR. Um composto avaliado demonstrou atividade com $\text{IC}_{50} = 25 \mu\text{M}$ quando testado contra Mtb H37Rv (Reddy e Pal, 2020).
- Enoil ACP redutase (InhA) pertence à via de biossíntese de ácidos graxos FASII (alvo da Isoniazida). Uma molécula derivada de indol contendo 9H-fluorenyliperazine demonstrou inibição da InhA com $\text{IC}_{50} = 0,16 \mu\text{M}$, competindo com o substrato da enzima (Reddy e Pal, 2020).
- Decaprenilfosforilbeta-D-ribose oxidase (DprE1) é um alvo essencial e vulnerável, envolvido na síntese de parede celular bacteriana. Foi demonstrado que um conjugado triazole–diindolylmethane foi ativo contra esta enzima, com $\text{IC}_{50} = 1,52 \mu\text{g/mL}$ contra Mtb cepa H37Ra (Reddy e Pal, 2020).

- Transportador de ácido micólico (MmpL3) é fundamental para síntese de parede celular. Uma molécula derivada de indole-2-carboxamide foi identificada como inibidor de MmpL3 com MIC no valor de 0,012 μM . Outro derivado demonstrou atividade com MIC = 0,05 $\mu\text{g/mL}$ (Reddy e Pal, 2020).

Foi demonstrado que derivados indólicos podem ser uma fonte promissora para a identificação de novas moléculas, como etapa inicial e fundamental para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que se mostraram ativos contra grande parte dos alvos farmacológicos conhecidos para Mtb. A maioria dessas descobertas são baseadas em estudos *in vitro*, etapa inicial do desenvolvimento de fármacos. (Reddy e Pal, 2020).

Neste trabalho, moléculas contendo anel indol em sua estrutura foram sintetizadas utilizando a metodologia descrita por Joucla e colaboradores (2010). Esta metodologia consiste em uma reação de “Arilação direta” de NH-indóis catalisada por paládio (Pd), em água. A base utilizada (Hidróxido de Lítio) garante a regioseletividade da técnica, fazendo com que a arilação ocorra na posição 3 do anel indólico. A reação de arilação entre indóis e haletos de arila substituídos resultaram nos compostos 3-Aril-1-*H*-indóis substituídos, com rendimento variando entre 10 e 77%, após purificação.

As moléculas obtidas tiveram sua atividade anti-TB avaliada, bem como suas características de toxicidade determinadas, como etapa inicial do desenvolvimento de novos fármacos, conforme veremos no ítem 3.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Sintetizar e avaliar a capacidade inibitória de compostos contendo o núcleo 3-aril-1*H*-indólico contra ao *Mycobacterium tuberculosis*, como uma etapa inicial e preponderante para o desenvolvimento de protótipos candidatos a fármacos para o tratamento da tuberculose.






2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar compostos da classe 3-Aril-1*H*-indol utilizando técnicas sintéticas de elevada regioseletividade;
- Avaliar atividade *in vitro* por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos, em culturas de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa laboratorial H37Rv) e isolados clínicos resistentes e com genoma sequenciado;
- Avaliar o efeito da exposição das moléculas sobre a viabilidade de células Vero e HepG2 (seletividade) dos compostos mais efetivos;
- Avaliar o efeito genotóxico do(s) composto(s) mais efetivo(s);
- Determinar a curva de morte e a concentração bactericida mínima do(s) composto(s) mais efetivo(s);
- Aplicar modelagem matemática para predizer dados de farmacodinâmica.

3. Artigo Científico

Article

Synthesis and Antimycobacterial Activity of 3-Phenyl-1*H*-indoles

Renata Jardim Etchart^{1,2}, Raoní S. Rambo¹ , Bruno Lopes Abadi¹ , Nathalia Sperotto¹, Christiano Ev Neves^{1,2}, Fernanda Fries Silva^{1,2}, Maiele Dornelles¹, Lovaine Duarte¹, Fernanda Souza Macchi^{1,2}, Marcia Alberton Perelló¹, Rogério Vescia Lourega³ , Cristiano Valim Bizarro^{1,2} , Luiz Augusto Basso^{1,2,4} and Pablo Machado^{1,2,4,*} 

- ¹ Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681-Prédio 92A, Porto Alegre 90616-900, RS, Brazil; renata.etchart@gmail.com (R.J.E.); raoni.rambo@gmail.com (R.S.R.); br.abadi@gmail.com (B.L.A.); nathalia.sperotto@gmail.com (N.S.); christiano_neves@hotmail.com (C.E.N.); fernanda.fries@acad.pucrs.br (F.F.S.); maieledornelles@gmail.com (M.D.); lovaduarte@gmail.com (L.D.); fernanda.macchi@outlook.com (F.S.M.); marcia.perello@pucrs.br (M.A.P.); cristiano.bizarro@pucrs.br (C.V.B.); luiz.basso@pucrs.br (L.A.B.)
 - ² Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90616-900, RS, Brazil
 - ³ Instituto de Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil; louregarv@gmail.com
 - ⁴ Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90616-900, RS, Brazil
- * Correspondence: pablo.machado@pucrs.br; Tel./Fax: +55-51-3320-3629



Citation: Jardim Etchart, R.; Rambo, R.S.; Lopes Abadi, B.; Sperotto, N.; Ev Neves, C.; Fries Silva, F.; Dornelles, M.; Duarte, L.; Souza Macchi, F.; Alberton Perelló, M.; et al. Synthesis and Antimycobacterial Activity of 3-Phenyl-1*H*-indoles. *Molecules* **2021**, *26*, 5148. <https://doi.org/10.3390/molecules26175148>

Academic Editor: Fawaz Aldabbagh

Received: 27 July 2021

Accepted: 23 August 2021

Published: 25 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Tuberculosis has been described as a global health crisis since the 1990s, with an estimated 1.4 million deaths in the last year. Herein, a series of 20 1*H*-indoles were synthesized and evaluated as in vitro inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) growth. Furthermore, the top hit compounds were active against multidrug-resistant strains, without cross-resistance with first-line drugs. Exposing HepG2 and Vero cells to the molecules for 72 h showed that one of the evaluated structures was devoid of apparent toxicity. In addition, this 3-phenyl-1*H*-indole showed no genotoxicity signals. Finally, time-kill and pharmacodynamic model analyses demonstrated that this compound has bactericidal activity at concentrations close to the Minimum Inhibitory Concentration, coupled with a strong time-dependent behavior. To the best of our knowledge, this study describes the activity of 3-phenyl-1*H*-indole against Mtb for the first time.

Keywords: 1*H*-indoles; *Mycobacterium tuberculosis*; mammalian cellular viability; genotoxicity; time-kill; pharmacodynamic model

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an ancient disease, dating back to 70,000 years ago, and remains a global public health emergency causing more than 1 million deaths each year. According to the WHO Global Tuberculosis Report (2020), an estimated 10.0 million people fell ill with TB in 2019, with 1.2 million deaths among HIV-negative people and an additional 208,000 deaths among HIV-positive people [1].

After initial exposure, the intracellular pathogen *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the causative agent of human TB, is absorbed by the alveolar macrophages of the lung. At this point, most infections are eliminated by a functioning immune system. If there is uncontrolled bacterial replication, a primary infection is established. This can develop into an active infection, which can lead to the development of symptoms of the disease (cough, night sweats, weight loss, and so forth) [2].

The first-line treatment of TB consists of a regimen of four drugs (isoniazid, rifampicin, ethambutol, and pyrazinamide), lasting 6 months. TB is a particularly challenging disease, with rapid development of resistant strains, mainly attributed to the low adherence to treatment protocols. Multidrug-resistant TB (MDR-TB) is caused by bacilli that are resistant

to at least isoniazid and rifampin, whereas extensively drug-resistant TB (XDR-TB) is occasioned by resistant strains to isoniazid and rifampin, plus any fluoroquinolone and at least one of three injectable second-line drugs [3,4].

The discovery of drugs such as isoniazid and pyrazinamide (discovered in the early 1950s), ethambutol and rifampicin (discovered in the 1960s) remains the basis of anti-TB therapy. After 1960, there was no completely new drug to treat TB until bedaquiline was approved in 2012 [5,6]. A few years later, the drugs delamanid (2014) and pretomanid (2019) were also approved. These three approved drugs received indications for the treatment of MDR-TB [2,4].

Despite the capacity of these new pharmacological alternatives to treat TB, the high capability for adaptation and the development of mutations associated with resistance [7] have highlighted the importance of continuous efforts to discover and develop new anti-TB drugs. Our research group has synthesized and evaluated different heterocyclic compounds against drug-susceptible and drug-resistant Mtb strains, with some encouraging results [8–10]. Importantly, the indole scaffold has been described in compounds endowed with antitubercular activity [11]. Additionally, this heterocycle has been obtained in molecules with antiviral, anti-inflammatory, antinociceptive, anticancer, anti-HIV, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, antimalarial, and anticholinesterase activities [12]. However, to the best of our knowledge, 3-phenyl-1*H*-indoles have not yet been evaluated as possible inhibitors of Mtb growth.

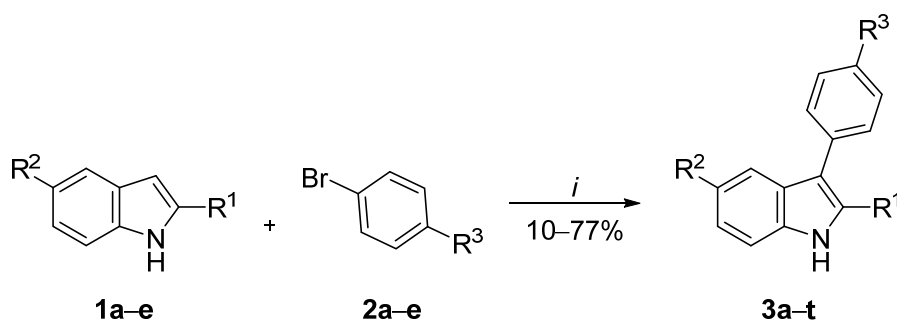
Within this context, the present study describes the synthesis of 3-phenyl-1*H*-indoles and their *in vitro* activity against drug-susceptible and drug-resistant Mtb strains. Additionally, apparent cytotoxicity and genotoxicity were studied using mammalian cells. Finally, antimycobacterial kinetic behavior was also shown, with concomitant exploration of a pharmacodynamic model.

2. Results

Compounds were synthesized by a well-established protocol for direct arylation of *NH*-indoles [13]. The method was highly regioselective, allowing 3-phenyl-1*H*-indoles to be obtained in a catalytic system based on palladium(II) acetate/bis(diphenylphosphino)methane [Pd(OAc)₂/dppm] using water as solvent. The palladium-catalyzed procedure led to C-H functionalization of indoles **1**, with aryl halides **2** leading to the desired compounds **3a–t** with 10–77% yields after purification (Scheme 1). The spectroscopic and spectrometric data obtained were in full agreement with the proposed structures (Section 3.2 and Supplementary Materials Figures S1–S40).

The synthesized 3-phenyl-1*H*-indoles **3a–t** were evaluated in a whole-cell assay against the Mtb H37Rv strain using isoniazid as positive control [9] (Scheme 1). Under our experimental conditions, this first-line drug presented a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 2.3 μM. In general, the MIC values exhibited by the compounds seemed to have a low correlation with the electronic and physicochemical characteristics of the substituents. The results indicated that steric components seem to be more important in explaining, even partially, the bacterial growth inhibition potencies.

The unsubstituted molecule **3a** was inactive at the highest concentration evaluated (129.4 μM). The presence of a methyl group at the 4-position of the benzene ring also provided an inactive structure, as the 1*H*-indole **3b** presented a MIC > 120.6 μM. The increase in molecular volume with the concomitant insertion of an atom that can act as a hydrogen bond acceptor increased antimycobacterial activity since the 4-methoxy-containing compound **3c** exhibited a MIC value of 28.0 μM. By contrast, the presence of a substituent with a reduced molecular volume and electron withdrawing character attached at the 4-position of the benzene ring reduced the molecular ability to inhibit Mtb growth. The fluorinated structure **3d** showed a MIC value of 94.7 μM. Interestingly, when the fluorine atom was replaced with a trifluoromethyl group in the 1*H*-indole **3e**, the antimycobacterial activity was almost doubled, reducing the MIC value to 47.8 μM.



Compound	R ¹	R ²	R ³	Yield (%) ^a	MIC (μM) ^b
3a	H	H	H	77	129.4
3b	H	H	CH ₃	30	>120.6
3c	H	H	OCH ₃	68	28.0
3d	H	H	F	35	94.7
3e	H	H	CF ₃	69	47.8
3f	CH ₃	H	OCH ₃	10	84.3
3g	CH ₃	H	F	10	>88.8
3h	CH ₃	H	CF ₃	16	18.2
3i	H	CH ₃	F	20	44.4
3j	H	CH ₃	CF ₃	16	36.3
3k	H	OCH ₃	CH ₃	58	>105.3
3l	H	OCH ₃	OCH ₃	26	24.7
3m	H	OCH ₃	F	53	82.9
3n	H	OCH ₃	CF ₃	43	17.2
3o	H	F	F	10	43.6
3p	H	F	CF ₃	35	35.8
3q	H	Cl	H	67	>109.8
3r	H	Cl	OCH ₃	10	19.4
3s	H	Cl	F	21	20.3
3t	H	Cl	CF ₃	30	8.4

Scheme 1. Reagents and conditions: *i* = Pd(OAc)₂, dppm, LiOH·H₂O, H₂O, 110 °C, 24 h. ^a Purified products. ^b *M. tuberculosis* H37Rv strain. MIC = Minimum Inhibitory Concentration. Data were obtained from three independent experiments and the most frequent MIC value was showed.

In the second round of structural modifications, the presence of a methyl group at the 2-position of the heterocyclic ring was studied. Furthermore, the substituents that produced compounds with higher activity (4-OCH₃, 4-F, and 4-CF₃) were kept on the benzene ring. The methoxy-substituted molecule **3f** was able to inhibit the growth of the bacillus with a MIC of 84.3 μM. Once again, the presence of the fluorine atom on the benzene ring in the **3g** structure reduced the activity. By contrast, the trifluoromethyl group attached at the 4-position of the benzene ring of the 1*H*-indole **3h** produced a compound with a MIC of 18.2 μM. Comparing the inhibitory capacity of the molecules in the presence (**3h**) and absence (**3e**) of the methyl group attached at the 2-position of the indole ring, one can conclude that **3h** was approximately 2.6-fold more effective than **3e**.

Finally, attention was turned to the 5-position of the indole ring. The first substituent evaluated was a methyl group at that position. Compounds **3i** and **3j**, containing fluorine and trifluoromethyl group attached at the benzene ring, presented MIC values of 44.4 μM and 36.3 μM, respectively. The methoxy group was also evaluated at the 5-position of the heterocyclic ring in molecules **3k–n**. The presence of the methyl group on the benzene ring of the **3k** structure led to an inactive compound, considering the highest evaluated concentration. This was the same pattern observed for the methylated 1*H*-indole **3b**.

Furthermore, the dimethoxy-substituted compound **3l** exhibited a MIC value of 24.7 μM . This activity was similar to that of the monosubstituted molecule **3c** (28.0 μM). When the fluorine atom replaced the methoxy group on the benzene ring, the antimycobacterial activity was reduced more than three-fold, as the MIC value of the 1*H*-indole **3m** was 82.9 μM . By contrast, the trifluoromethyl group produced an increased inhibitory activity on *Mtb*. Compound **3n** showed a MIC of 17.2 μM , which was slightly lower than that shown by the **3l** structure. When the fluorine atom was used as a substitute attached to the 5-position of the indole ring, the resulting molecules did not show significant variations in their activity against the bacillus. The 1*H*-indoles **3o** and **3p** presented MIC values of 43.6 μM and 35.8 μM , respectively. Finally, the chlorine atom was studied attached at the 5-position of the indole ring in compounds **3q–t**. As demonstrated above for molecule **3a**, the absence of substituents on the benzene ring significantly reduced antimycobacterial activity. Thus, the 1*H*-indole **3q** was inactive at the highest concentration tested (>109.8 μM). Once again, the presence of the methoxy group produced an effective molecule, which was able to inhibit *Mtb* growth. The **3r** structure exhibited an MIC of 19.4 μM , a value that ranks it among the most effective in the series examined. The fluorine-containing molecule **3s** showed a similar ability to inhibit the bacillus, with an MIC of 20.3 μM . Last but not least, the presence of the trifluoromethyl group on the benzene ring and the chlorine atom attached at the 5-position of the heterocycle led to the structure with the highest activity in the synthesized series. Compound **3t** was able to inhibit *Mtb* growth with an MIC value of 8.4 μM . It is important to mention that trifluoromethyl group has unique physicochemical properties, increasing lipophilicity while reducing the reactivity of the compounds in metabolizing reactions. Particularly, greater lipophilicity may be related to the greater antimycobacterial activity of trifluoromethylated-1*H*-indoles (Scheme 1).

The most effective compounds against the H37Rv strain (**3h**, **3n**, **3r**, and **3t**) were evaluated against a well-characterized panel of clinical isolates described as multidrug-resistant *Mtb* strains (Table 1). The PT2, PT12, and PT20 strains have been described as resistant to drugs such as isoniazid, rifampin, streptomycin, ethionamide, and rifabutin. In addition, PT12 and PT20 are also resistant to drugs such as pyrazinamide and ethambutol, and PT12 exhibits additional resistance to amikacin and capreomycin. Importantly, the genomes of these mycobacterial strains have been fully sequenced; therefore, genetic modifications related to resistance phenotypes are known [14]. Interestingly, the 1*H*-indoles **3h**, **3n**, **3r** and **3t** maintained the MIC value against the drug-resistant *Mtb* strains or were even more effective, with MIC values lower than those exhibited against the H37Rv strain. These findings demonstrate that this class of molecules does not share cross-resistance with some of the main drugs used for the clinical management of TB. Moreover, the results suggest that this chemical class may provide active compounds against drug-susceptible and drug-resistant *Mtb* strains, acting by distinct mechanisms of action when compared to first-line drugs.

Table 1. In vitro activity of the selected 1*H*-indoles against *M. tuberculosis* H37Rv and MDR strains and an evaluation of the viability of HepG2 and Vero cells.

Compound	H37Rv (μM)	PT2 (μM)	PT12 (μM)	PT20 (μM)	CC ₅₀ ^a HepG2 (μM)	CC ₅₀ ^a Vero (μM)
3h	18.2	4.5	9.1	9.1	<30	<30
3n	17.2	17.2	17.2	17.2	<30	<30
3r	19.4	9.7	19.4	19.4	>30	>30
3t	8.4	8.4	8.4	8.4	<30	<30
INH	2.3	291.7	36.4	145.8	-	-

^a Concentration that inhibits 50% of cellular viability determined by MTT and Neutral Red assays. INH, Isoniazid.

The viability of the HepG2 and Vero cells in the presence of the compounds was determined in order to evaluate the selectivity and provide preliminary evidence of the toxicity of the molecules. Cell viability was assessed at a mitochondrial (MTT) [15] and lysosomal (Neutral Red) [16] level after exposure to the 1*H*-indoles **3h**, **3n**, **3r** and **3t** for

72 h (Table 1). The results were expressed as the concentration capable of reducing cell viability by 50% (CC_{50}). 1*H*-Indoles **3h**, **3n**, and **3t** inhibited the viability of both cell lines at concentrations less than 30 μ M. This finding denotes that these molecules have a possible propensity for toxicity and a low selectivity, considering the relationship between mammalian cells (HepG2 and Vero) and mycobacterial (Mtb) cells. By contrast, compound **3r** at 30 μ M concentration did not significantly affect the viability of either cell lineage. Based on these results, the 1*H*-indole **3r** was chosen for subsequent trials.

Additionally, the genotoxicity of compound **3r** was studied, as cell viability results could indicate a certain degree of toxicity in the series of molecules evaluated. Therefore, the induction of DNA single and double-strand breaks and alkali-labile sites in HepG2 cells were evaluated using the alkaline comet assay [17]. The results demonstrated that compound **3r** did not produce DNA damage at the evaluated concentrations (Figure 1). These results indicate a reasonable safety profile for 1*H*-indole **3r** based on cytotoxic and genotoxic assessments.

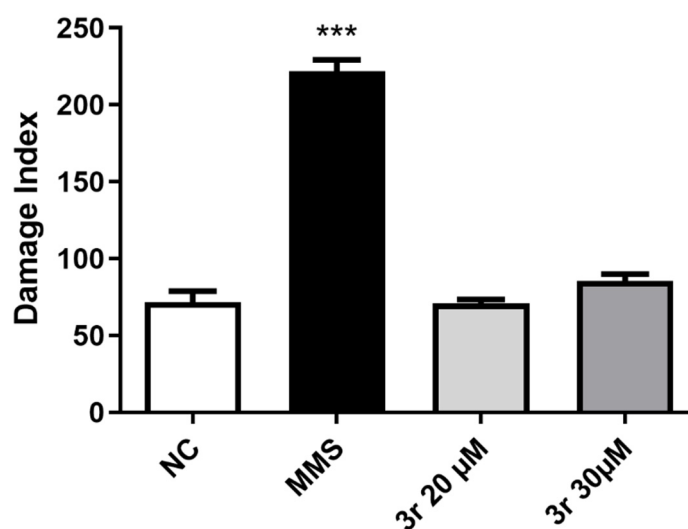


Figure 1. DNA damage index measured by alkaline comet assay in HepG2 cells incubated for 24 h with **3r**. NC = control vehicle group (0.5% DMSO), MMS = methyl methanesulfonate, positive control group. Data are expressed as the mean \pm standard error from two independent experiments. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's post-test. *** $p < 0.001$.

The determination of the MIC of an antimicrobial drug is widely used as a marker of its effect. However, since the MIC value is obtained at a single time point, there is some information about other aspects of the antibiotic's effect that may be relevant, such as combinations of growth and kill rates, the persistent activity of the compound, and its effect over time. Thus, time-kill analysis of 1*H*-indole **3r** was performed to assess the dynamics of the antimycobacterial activity [18–20] (Figure 2). Compound **3r** showed time-dependent kill kinetics at the highest evaluated concentrations. On day zero, the average CFU/mL value was around 5 logs. The vehicle (DMSO) showed growth, with values around 8.8 logs on day 21. Using a concentration of $0.5 \times$ MIC of compound **3r**, a regrowth of the culture was observed on day 21 (around 6.3 logs). However, this value was lower than that presented by the DMSO. 1*H*-Indole **3r** at a concentration of $1.0 \times$ MIC value was able to maintain the culture in the range of 4.6 to 4.2 logs over the 21 days. Taken together, these results denote that concentrations of $0.5 \times$ MIC (10 μ M) and $1.0 \times$ MIC (20 μ M) of **3r** exhibited bacteriostatic effects over 21 days. In addition, the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was $2 \times$ MIC (40 μ M), which reduced the culture count to around 2.3 logs on day 14 and below the detection limit on day 21. It is noteworthy that there was no antimycobacterial time-dependent difference between **3r** concentrations of $2 \times$ and

$4 \times \text{MIC}$ ($80 \mu\text{M}$). These concentrations showed a slow reduction in viable cell count over time and a reduction of 3 logs on day 21. Finally, time-kill analysis showed that 1*H*-indole **3r** presented a comparable dynamic behavior to the first-line drug rifampicin [20–22].

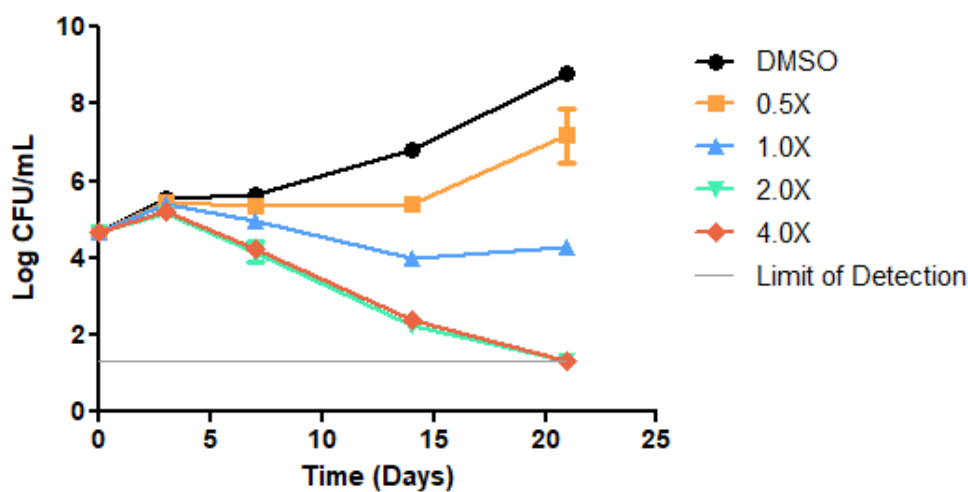


Figure 2. Time-kill curves of compound **3r** against replicating *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Kill kinetics were determined under standard aerobic conditions. Viability was monitored by determining CFU/mL. The lower limit of detection was 200 CFU/mL for undiluted samples on plates. Data represent the mean \pm standard deviation of biological triplicate measurements.

We used the pharmacodynamic model to explore the time-kill curve data from compound **3r**. This model is characterized by four criteria: the maximum rate of bacterial growth in the absence of antimicrobial (ψ_{max}), the minimum rate of bacterial growth in high concentrations of antimicrobial (ψ_{min}), the Hill coefficient (κ), and the pharmacodynamic MIC ($z\text{MIC}$) [23,24]. The time-kill curve data provides the bacterial growth rates by fitting a linear regression to the mean colony counts per day for every concentration of 1*H*-indole **3r** (Figure 3). The maximum growth rate in the absence of antimicrobial was $\psi_{\text{max}} = 0.42 \text{ days}^{-1}$. The minimum growth rate was $\psi_{\text{min}} = -0.94 \text{ days}^{-1}$. The Hill coefficient κ was 4.93, whereas the estimated $z\text{MIC}$ was $18.73 \mu\text{M}$. It is noteworthy that the $z\text{MIC}$ value agreed with the experimental MIC ($19.40 \mu\text{M}$). The Hill coefficient (κ) describes how the kill rate changes with the change in concentration of the molecule tested around the MIC value. One can observe these changes on the graph as the steepness of the curve [23,24]. Some studies have suggested that a high or low Hill coefficient may be related to the concentration or time-dependent kill kinetics of antibiotics, with a tendency towards higher values for time dependent ones [24]. In addition, it was reported that a median Hill coefficient (κ) value of three has been obtained for those drugs endowed with time-dependent kill kinetics [18]. Therefore, the pharmacodynamic model for 1*H*-indole **3r** indicated a strong time-dependent characteristic and a weak concentration-dependent antimycobacterial activity.

In summary, the synthesis and in vitro antimycobacterial activity of a new series of 3-phenyl-1*H*-indoles is shown herein. The highly regioselective synthetic procedure was performed using readily accessible reagents and reactants. In addition, most synthesized compounds showed activity against a drug-susceptible Mtb strain, and the top hit compounds were active against MDR strains without cross-resistance with first-line drugs. Interestingly, one of the compounds was also devoid of apparent toxicity and genotoxicity to mammalian cells. Time-kill and pharmacodynamic model analyses demonstrated that this molecule has bactericidal activity at concentrations close to the MIC ($2 \times \text{MIC}$), with a strongly time-dependent behavior. The data presented suggest that this class of molecules may provide candidates for the development of new anti-TB drugs. Hit to lead optimization is underway, and these data will be presented in due course.

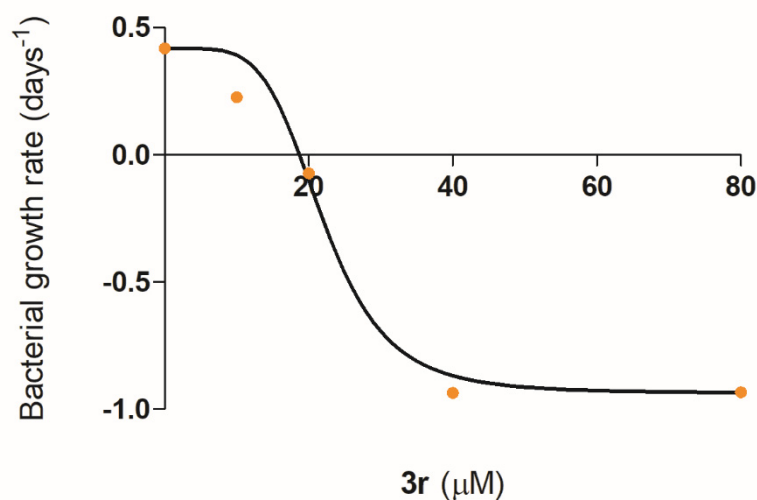


Figure 3. Pharmacodynamic model fitted to estimated growth rates. The points indicate the estimated bacterial growth rates at different concentrations of compound **3r**. The solid line shows the model with the calculated growth rates.

3. Experimental

3.1. Chemistry

Commercially available reactants and solvents were obtained from commercial suppliers and were used without additional purification. The progress of the reaction was monitored using thin-layer chromatography (TLC, Kenilworth, NJ, USA) with Merck TLC Silica gel 60 F254. The melting points were measured using a Microquímica MQAPF-302 apparatus. ¹H and ¹³C NMR spectra were acquired on an Avance III HD Bruker spectrometer (Bruker Corporation, Fällanden, Switzerland). Chemical shifts (δ) were expressed in parts per million (ppm) relative to CDCl₃, which was used as the solvent, and to TMS, which was used as an internal standard. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained for all compounds on an LTQ Orbitrap Discovery mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The analyses were performed through the direct infusion of the sample in MeCN/H₂O (1:1) with 0.1% formic acid, or in MeOH/MeCN (1:1) with 0.025% ammonium hydroxide in a positive-ion or negative-ion mode, respectively, using electrospray ionization (ESI). For elemental composition, calculations were performed using the specific tool included in the Qual Browser module of the Xcalibur software. Compound purity was determined using an Äkta HPLC system (GE Healthcare® Life Sciences, Chicago, IL, USA) equipped with a binary pump, manual injector, and UV detector. Unicorn 5.31 software (Build 743) was used for data acquisition and processing. The HPLC conditions were as follows: RP column, 5 μ m Nucleodur C-18 (250 \times 4.6 mm); flow rate, 1.5 mL/min; UV detection, 254 nm; 100% water (0.1% acetic acid) was maintained from 0 to 7 min, followed by a linear gradient from 100% water (0.1% acetic acid) to 90% acetonitrile/methanol (1:1, *v/v*) from 7 to 15 min (15–30 min) and subsequently returned to 100% water (0.1% acetic acid) in 5 min (30–35 min) and maintained for an additional 10 min (35–45 min). All the evaluated compounds were \geq 92% pure.

3.2. General Procedure for the Synthesis of 3-Phenyl-1H-indoles (**3a–t**)

In a screw-cap vial under air, a mixture of Pd(OAc)₂ (11.3 mg, 0.05 mmol, 5 mol%), dppm (19.2 mg, 0.05 mmol, 5 mol%), LiOH·H₂O (126 mg, 3.00 mmol), proper aryl-halide (1.20 mmol), and proper indole (1.0 mmol) in degassed H₂O (2 mL) was vigorously stirred at 110 °C. After 18 h, the reaction mixture was cooled to room temperature and partitioned between 1M HCl (20 mL) and ethyl acetate (20 mL). The layers were separated, and the aqueous layer was further extracted with 4 \times 20 mL EtOAc. Combined organic layers were

dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. Purification of the residue by column chromatography using a mixture of hexanes/EtOAc as eluent afforded the desired product.

3-Phenyl-1H-indole (3a) [13]: Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 0 \rightarrow 90/10) yielded the product as a white solid: 77% yield; mp 82–85 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.20 (1H, bs), 7.95 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.67 (2H, dt, $J = 8.0, 1.5$ Hz), 7.48–7.39 (3H, m), 7.36 (1H, d, $J = 2.5$ Hz), 7.32–7.16 (3H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 136.7, 135.6, 128.7 (2C), 127.5 (2C), 125.9, 125.8, 122.4, 121.7, 120.3, 119.8, 118.4, 111.4. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$: 192.0819; obt.: 192.0834.

3-(*p*-Tolyl)-1H-indole (3b) [25,26]: Flash column chromatography on a silica gel (petroleum ether/ethyl acetate, 0 \rightarrow 95/5) yielded the product as a pale yellow solid: 30% yield; mp 73–75 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.91 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.78 (1H, bs), 7.52 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.18–7.13 (5H, m), 7.09 (1H, d, $J = 2.5$ Hz), 2.36 (3H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 136.8, 135.7, 132.8, 129.7 (2C), 127.5 (2C), 125.9, 122.4, 121.8, 120.4, 119.9, 118.2, 111.6, 21.3. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$: 206.0975; obt.: 206.0989.

3-(4-Methoxyphenyl)-1H-indole (3c) [13]: Flash column chromatography on a silica gel (petroleum ether/ethyl acetate, 0 \rightarrow 95/5) yielded the product as a pale-yellow solid: 68% yield; mp 126–129 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.18 (1H, bs), 7.95 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.65–7.62 (2H, m), 7.44 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.31–7.21 (3H, m), 7.07–7.04 (2H, m), 3.91 (3H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 158.2, 136.6, 128.7 (2C), 128.6, 128.2, 125.9, 122.3, 121.2, 120.2, 119.8, 118.1, 114.3, 111.4, 55.4. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{NO}$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$: 222.0924; obt.: 222.0945.

3-(4-Fluorophenyl)-1H-indole (3d) [27]: Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 0 \rightarrow 90/10) yielded the product as a light yellow solid: 35% yield; mp 96–99 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.08 (1H, bs), 7.89–7.83 (1H, m), 7.60–7.56 (2H, m), 7.39–7.35 (1H, m), 7.27–7.17 (3H, m), 7.15–7.09 (2H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 161.5 (d, $J = 244.5$ Hz), 136.5, 131.5 (d, $J = 3.2$ Hz), 128.9, 128.8, 125.7, 122.5, 121.6, 120.4, 119.5, 117.4, 115.6 (d, 2C, $J = 21.3$ Hz), 111.4. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{FN}$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$: 210.0725; obt.: 210.0758.

3-(4-(Trifluoromethyl)phenyl)-1H-indole (3e) [28]: Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 95/5 \rightarrow 80/10) yielded the product as a light yellow solid: 69% yield; mp 129–132 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.32 (1H, bs), 7.98 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.82 (2H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.73 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.48 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.44 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 7.35–7.26 (2H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 139.4, 136.8, 127.8 (2C), 127.6 (q, $J = 33.6$ Hz), 127.3, 125.7 (q, $J = 3.8$ Hz), 125.5, 124.5 (q, $J = 271.6$ Hz), 122.8, 122.6, 120.9, 119.6, 117.1, 111.6. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$: 260.0693; obt.: 260.0725.

3-(4-Methoxyphenyl)-2-methyl-1H-indole (3f): Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 \rightarrow 80/20) yielded the product as a brown oil: 10% yield. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.80 (1H, s), 7.54 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.38–7.31 (2H, m), 7.22 (1H, dd, $J = 8.0, 1.1$ Hz), 7.11–6.99 (2H, m), 6.96–6.91 (2H, m), 3.79 (3H, d, $J = 0.7$ Hz), 2.38 (3H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 157.9, 135.2, 131.0, 130.5, 130.4, 128.0, 127.8, 121.4, 119.8, 118.8, 118.7, 114.0, 113.9, 110.2, 55.4, 12.4. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{NO}$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$: 236.1087; obt.: 236.1070.

3-(4-Fluorophenyl)-2-methyl-1H-indole (3g): Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 \rightarrow 80/20) yielded the product as a brown solid: 10% yield; mp 95–98 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.87 (1H, s), 7.54–7.49 (1H, m), 7.40–7.34 (2H, m), 7.28–7.21 (1H, m), 7.13–7.01 (4H, m), 2.39 (3H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ : 161.3 (d, $J = 244.6$ Hz), 135.1, 131.3 (2C), 130.8 (2C), 127.8, 121.6, 120.0, 118.5 (d, $J = 9.0$ Hz), 115.4 (d, $J = 7.5$ Hz), 115.2 (d, $J = 7.4$ Hz), 113.6, 110.3, 12.4. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NF}$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$: 224.0887; obt.: 224.0870.

3-(4-(Trifluoromethyl)phenyl)-2-methyl-1H-indole (3h): Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 \rightarrow 80/20) yielded the product as a pale yellow solid: 16% yield; mp 128–131 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.90 (1H, s), 7.65–7.60

(2H, m), 7.58–7.50 (3H, m), 7.27–7.22 (1H, m), 7.14–7.03 (2H, m), 2.41 (3H, s). ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 139.4, 135.2, 132.2, 129.4, 127.7 (q, 2C, $J = 32.2$ Hz), 127.4, 125.4 (2C), 124.5 (q, $J = 271.8$ Hz), 121.9, 120.6, 118.5 (q, $J = 8.5$ Hz), 113.4, 110.5, 12.5. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{NF}_3$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 274.0858; obt.: 274.0838.

5-Methyl-3-(4-fluorophenyl)-1H-indole (3i) [29]: Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 0 \rightarrow 90/10) yielded the product as a light yellow solid: 20% yield; mp 121–123 $^\circ\text{C}$. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.12 (1H, s), 7.64 (1H, s), 7.61–7.54 (2H, m), 7.29 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.23 (1H, d, $J = 2.5$ Hz), 7.15–7.05 (3H, m), 2.47 (3H, s). ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 161.4 (d, $J = 244.3$ Hz), 134.9, 131.7 (d, $J = 3.3$ Hz), 129.7, 128.9, 128.8, 125.9, 124.1, 121.7 (2C), 119.1, 116.9, 115.5 (d, $J = 21.3$ Hz), 111.1, 21.6. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NF}$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 224.0884; obt.: 224.0870.

5-Methyl-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-indole (3j) [30]: Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 0 \rightarrow 90/10) yielded the product as a light yellow oil: 16% yield. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.32 (1H, s), 7.75 (2H, dt, $J = 7.9, 0.8$ Hz), 7.69 (3H, ddt, $J = 8.8, 7.3, 0.8$ Hz), 7.37 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 7.33 (1H, dd, $J = 8.3, 0.7$ Hz), 7.10 (1H, dd, $J = 8.3, 1.6$ Hz), 2.49 (3H, s). ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 139.5 (d, $J = 1.4$ Hz), 135.1, 130.1, 127.6 (q, 2C, $J = 32.2$ Hz), 127.3 (2C), 125.6 (q, 2C, $J = 3.9$ Hz), 124.5 (q, $J = 271.7$ Hz), 124.4, 122.7, 119.1, 116.6, 111.3, 21.6. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{NF}_3$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 274.0854; obt.: 274.0838.

5-Methoxy-3-(p-tolyl)-1H-indole (3k) [26]: Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 0 \rightarrow 90/10) yielded the product as a pale yellow solid: 58% yield; mp 141–144 $^\circ\text{C}$. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.05 (1H, bs), 7.53 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.36 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 7.30–7.23 (4H, m), 6.90 (1H, dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz), 3.85 (3H, s), 2.40 (3H, s). ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 154.7, 135.5, 132.7, 131.8, 129.4 (2C), 127.3 (2C), 126.3, 122.3, 118.1, 112.6, 112.0, 101.8, 56.0, 21.1. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{NO}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 238.1226; obt.: 238.1251.

5-Methoxy-3-(4-methoxyphenyl)-1H-indole (3l) [27]: Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 0 \rightarrow 90/10) yielded the product as a pale yellow solid: 26% yield, mp 72–75 $^\circ\text{C}$. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.13 (1H, s), 7.60–7.52 (2H, m), 7.35–7.28 (3H, m), 7.03–6.98 (2H, m), 6.91 (1H, dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz), 3.86 (6H, s). ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 154.7 (2C), 131.8, 128.6 (3C), 122.0 (3C), 114.3 (2C), 112.6, 112.0, 101.6, 56.0, 55.4. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 254.1176; obt.: 254.1177.

5-Methoxy-3-(4-fluorophenyl)-1H-indole (3m): Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 95/5 \rightarrow 90/10) yielded the product as a yellow oil that solidified upon cooling: 53% yield. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.01 (1H, s), 7.49–7.42 (2H, m), 7.21 (1H, dd, $J = 2.4, 0.7$ Hz), 7.15 (1H, dd, $J = 8.8, 0.6$ Hz), 7.12–7.09 (1H, m), 7.07–6.99 (2H, m), 6.82 (1H, ddd, $J = 8.8, 2.4, 0.5$ Hz), 3.75 (3H, s). ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 161.3 (d, $J = 244.4$ Hz), 154.7, 131.7, 128.8, 128.6, 126.0, 122.5, 122.4, 117.0, 115.6 (d, 2C, $J = 21.2$ Hz), 112.6, 112.2, 101.3, 56.0. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NOF}$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 240.0832; obt.: 240.0819.

5-Methoxy-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-indole (3n): Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 0 \rightarrow 90/10) yielded the product as a dark yellow solid: 43% yield; mp 90–93 $^\circ\text{C}$. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.23 (1H, bs), 7.74 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.68 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.37 (2H, q, $J = 4.3$ Hz), 7.33 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.94 (1H, q, $J = 3.7$ Hz), 3.87 (1H, s). ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 155.1, 139.5 (d, $J = 1.2$ Hz), 131.9, 127.8 (q, 2C, $J = 33.0$ Hz), 127.2, 125.9, 125.7 (q, 2C, $J = 3.8$ Hz), 124.5 (q, $J = 270.7$ Hz), 123.3, 116.9, 113.0, 112.3, 101.6, 56.0. HRMS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{NOF}_3$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 290.0798; obt.: 290.0787.

5-Fluoro-3-(4-fluorophenyl)-1H-indole (3o) [29]: The general procedure was followed although the temperature was 90 $^\circ\text{C}$. Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 \rightarrow 70/30) yielded the product as a brown oil: 10% yield. ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.28 (1H, s), 7.60–7.50 (2H, m), 7.50 (1H, dd, $J = 9.9, 2.5$ Hz), 7.33 (2H, dd, $J = 8.6, 3.7$ Hz), 7.19–7.08 (2H, m), 7.00 (1H, td, $J = 9.0, 2.5$ Hz). ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ :

161.6 (d, $J = 245.0$ Hz), 158.5 (d, $J = 235.1$ Hz), 133.1, 131.1 (d, $J = 3.3$ Hz), 128.8 (d, 2C, $J = 7.8$ Hz), 126.1 (d, $J = 9.9$ Hz), 123.3, 117.7 (d, $J = 4.6$ Hz), 115.7 (d, 2C, $J = 21.5$ Hz), 112.1 (d, $J = 9.7$ Hz), 110.9 (d, $J = 26.4$ Hz), 104.5 (d, $J = 24.2$ Hz). HRMS (ESI): m/z calc. for $C_{14}H_8F_2N$ $[M - H]^-$: 228.0630; obt.: 228.0652.

5-Fluoro-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-indole (3p): The general procedure was followed although the reaction temperature was 90 °C. Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 95/5 → 90/10) yielded the product as a brown oil: 35% yield. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.47 (1H, s), 7.73–7.63 (4H, m), 7.55 (1H, dd, $J = 9.9, 2.5$ Hz), 7.44 (1H, d, $J = 2.7$ Hz), 7.34 (1H, dd, $J = 8.9, 4.4$ Hz), 7.01 (1H, td, $J = 9.0, 2.5$ Hz). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 158.6 (d, $J = 235.6$ Hz), 138.9 (d, $J = 1.5$ Hz), 133.3, 127.9 (q, $J = 32.4$ Hz), 127.1 (2C), 125.8 (q, $J = 3.8$ Hz), 124.2, 123.1, 121.2 (q, $J = 170.9$ Hz), 117.2 (d, $J = 4.7$ Hz), 112.3 (d, $J = 9.7$ Hz), 111.2 (d, $J = 26.4$ Hz), 104.6 (d, $J = 24.3$ Hz). HRMS (ESI): m/z calc. for $C_{15}H_8NF_4$ $[M - H]^-$: 278.0611; obt.: 278.0587.

5-Chloro-3-phenyl-1H-indole (3q) [31]: Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 0 → 93/7) yielded the product as a light yellow solid: 67% yield; mp 87–90 °C. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.24 (1H, bs), 7.94 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 7.67–7.65 (2H, m), 7.50 (2H, t, $J = 7.7$ Hz), 7.40–7.31 (3H, m), 7.24 (1H, dd, $J = 1.9, 8.6$ Hz). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 135.0, 134.8, 128.9 (2C), 127.5 (2C), 126.9, 126.4, 126.2, 123.0, 122.8, 119.4, 118.3, 112.4. HRMS (ESI): m/z calc. for $C_{15}H_9ClN$ $[M - H]^-$: 226.0429; obt.: 226.0454.

5-Chloro-3-(4-methoxyphenyl)-1H-indole (3r) [31]: Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 0 → 93/7) yielded the product as brown oil: 10% yield. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.27 (1H, bs), 7.87–7.81 (1H, m), 7.57–7.48 (2H, m), 7.35–7.27 (2H, m), 7.18 (1H dd, $J = 8.6, 2.0$ Hz), 7.03–6.97 (2H, m), 3.86 (3H, s). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 158.3, 134.9, 132.7, 128.6, 127.4, 127.0, 125.9, 122.6, 122.4, 119.2, 117.9, 114.4 (2C), 112.3, 55.4. HRMS (ESI): m/z calc. for $C_{15}H_{11}NOCl$ $[M - H]^-$: 256.0524; obt.: 256.0561.

5-Chloro-3-(4-fluorophenyl)-1H-indole (3s): Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 95/5 → 90/10) yielded the product as yellow oil: 21% yield. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.26 (1H, bs), 7.81 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 7.58–7.50 (2H, m), 7.35–7.29 (2H, m), 7.19 (1H, dt, $J = 8.7, 1.6$ Hz), 7.17–7.10 (2H, m). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 161.6 (d, $J = 245.2$ Hz), 134.9, 130.8 (d, $J = 3.3$ Hz), 128.9 (d, $J = 7.8$ Hz), 126.8, 126.2, 122.8 (2C), 119.0 (2C), 117.3, 115.7 (d, $J = 21.5$ Hz, 2C), 112.4. HRMS (ESI): m/z calc. for $C_{14}H_8NClF$ $[M - H]^-$: 244.0345; obt.: 244.0324.

5-Chloro-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-indole (3t) [29]: Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 0 → 93/7) gives the product as a light yellow solid: 30% yield; mp 125–128 °C. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.33 (1H, bs), 7.85 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 7.67 (4H, s), 7.39 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 7.32 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.21 (1H, q, $J = 3.6$ Hz). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 138.5 (1C, d, $J = 1.1$ Hz), 135.0, 128.1 (1C, q, $J = 32.4$ Hz), 127.3 (3C), 126.6, 126.5, 125.8 (2C, q, $J = 3.8$ Hz), 123.8, 123.1, 119.0, 116.8, 112.6. HRMS (ESI): m/z calc. for $C_{15}H_8ClF_3N$ $[M - H]^-$: 294.0303; obt.: 294.0326.

3.3. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The determination of the MIC was performed in sterile 96-well, clear round-bottom plates using the resazurin reduction microplate assay (REMA), as previously described [9]. Briefly, test compounds **3a–t** were solubilized in 100% DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to a concentration of 2 mg/mL, and aliquots were kept at –20 °C. On the day of the assay, compound aliquots were thawed at room temperature and diluted in Middlebrook 7H9 liquid medium (Becton Dickinson, BD), containing 10% (v/v) BBLTM Middlebrook ADC enrichment (albumin, dextrose, and catalase, BD) and 5% (v/v) DMSO, to concentrations limited by the solubility of each compound. Test compounds were two-fold serially diluted, resulting in a 10-point concentration range. Isoniazid (INH, ACROS) was used as the anti-TB drug control. Compounds had their activity evaluated against the Mtb H37Rv laboratory reference strain (ATCC 27294) and three multidrug resistant clinical isolates of Mtb (PT2, PT12, and PT20), which were isolated from patients

in the Lisbon Health Region, Lisbon, Portugal [14]. The MIC was considered as the lowest compound concentration capable of preventing resazurin (Sigma-Aldrich) reduction, which is otherwise marked by a color switch from blue to bright pink. Assays were performed three times for each compound on different dates, and only the most frequent MIC value among the assays was reported in molar concentration (μM).

3.4. Cellular Evaluation

Cellular viability determination was conducted after incubation of cells with the **3h**, **3n**, **3r** and **3t** compounds using both the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) [15] and neutral red uptake (NRU) [16] methods. HepG2 and Vero cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM—Invitrogen, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (Invitrogen), 1% penicillin—streptomycin (Invitrogen), and 0.1% fungizone (Invitrogen). For the MTT and NRU assay, HepG2 (4×10^3 cells/well) and Vero (2×10^3 cells/well) cells were seeded in 96-well culture plates and incubated for 24 h. 1H-Indoles were diluted at concentrations of 30 μM using DMSO 0.5% and were incubated with the cell lines for 72 h at 37 °C. Importantly, 30 μM was the maximum concentration allowed by the solubility of the molecules. For the MTT assay, after incubation for 72 h at 37 °C under 5% CO₂, the cultures were incubated with MTT solution (5 mg/mL) for 4 h. The formazan crystals were dissolved with 100 μL of DMSO. The absorbance was measured at 595 nm using an EZ Read 400 microplate reader (Biochrom, Holliston, MA, USA). The mean absorbance of negative control wells was set as 100% viability, and the values of treated cells were calculated as the percentage of vehicle control (0.5% DMSO). The precipitated purple formazan crystals were directly proportional to the number of live cells with active mitochondria. For the NRU assay, after 72 h of cell incubation PBS was used to wash the cells and 200 μL of neutral red dye solution (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma) prepared in serum-free medium was added to the plate and incubated for 3 h at 37 °C under 5% CO₂. Cells were washed with PBS followed by the addition of 100 μL of a desorb solution (ethanol/acetic acid/water, 50:1:49) for 30 min with gently shaking to extract neutral red dye from the viable cells. Absorbance was measured at 562 nm (EZ Read 400 microplate reader (Biochrom, Holliston, MA, USA)), and the cell viability was expressed as a percentage, considering the vehicle control cell (0.5% DMSO) as 100% cell viability.

3.5. Genotoxicity

The alkaline comet assay [17] was performed using HepG2 cells. The cells were seeded at 8×10^4 cells/well in a 24-well culture plate for 24 h before treatment. After this time, compound **3r** was added at concentrations of 20 μM and 30 μM , and the plate was incubated for an additional 24 h. Cells were mixed with low-melting point agarose and placed on a microscope slide precovered with normal agarose, and placed at 4 °C for 10 min for total agarose solidification. The microscope slides were then exposed to a lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris with 1% Triton X-100, and 10% DMSO) for 48 h. The slides were washed with PBS and then exposed to alkali conditions (300 mM NaOH, 1 mM ethylenedinitrilotetraacetic acid, pH > 13) at 4 °C for 20 min in order to allow the DNA to unfold and the expression of alkali-labile sites to occur. Electrophoresis was then performed for 20 min at 25 V and 300 mA. Subsequently, the slides were neutralized, fixed, and stained using silver nitrate staining. After they were completely dry, the cells were observed on a microscope. Incubation with methyl methanesulfonate (MMS) at 100 μM was used as a positive control group. Overall, 100 cells from each slide, and two slides per treatment, were selected randomly for the analysis and for quantifying DNA damage. Slides were visually scored according to the size and amount of DNA present in the tail. Separately, each cell was given an arbitrary value of 0 (undamaged) to 4 (maximum damage). The damage score was thus attributed to each slide and ranged from 0 (undamaged: 100 cells \times 0) to 400 (maximum damage: 100 cells \times 4). Finally, damage score was expressed as the mean with standard error from two independent experiments.

3.6. Time-Kill Curves

To observe the kill kinetics and the MBC of compound **3r** against the Mtb H37Rv, time-killing curves were performed as previously described [22]. First, an actively growing Mtb culture ($OD_{600} \approx 0.6$ – 0.8) was diluted to a theoretical OD of 0.1 in 7H9 broth supplemented with 10% ADC, 0.05% Tween-80, and 0.2% glycerol. Next, the former mycobacterial suspension was further diluted (1:500) in 7H9 broth to reach a cell density of approximately 10^5 CFU/mL. This second mycobacterial suspension was equally divided (5 mL) in 50 mL conical tubes (Corning®, New York, NY, USA), each containing different concentrations of compound **3r** (0.5, 1.0, 2.0, or $4.0 \times$ the MIC value in liquid medium) in triplicate. Aliquots (0.1 mL) were taken from this second mycobacterial suspension on day zero, in triplicate, serially diluted in sterile 0.9% saline solution (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}), and plated onto nonselective 7H10 agar plates, supplemented with 10% OADC and 0.5% glycerol, to determine the initial inoculum. The final concentration of DMSO was adjusted to 2.5% in all tubes. A tube containing DMSO only (no compound) was included as a growth control. The cultures were incubated under shaking (37 °C, 100 rpm) for 21 days. Aliquots (0.1 mL) were taken from each tube on days 3, 7, 14 and 21 after inoculation, serially diluted in sterile 0.9% saline solution, and three dilutions were chosen to be spread (0.1 mL) onto 7H10 agar plates. The plates were incubated at 37 °C for 2–3 weeks until colonies were visible for CFU counting. The CFU/mL values were converted to the logarithmic scale (\log_{10}) and plotted as a function of the exposure time in days. A lower limit of detection of 200 CFU/mL for undiluted samples was fixed for this experiment. The MBC value was considered as the lowest compound concentration that resulted in 3 logs kill of Mtb over 21 days [22].

3.7. Pharmacodynamic Model

The maximum and minimum bacterial growth rates (ψ) were obtained from the coefficient of a linear regression from the colony count of viable bacteria (CFU/mL) over 21 days of the time-kill curve of compound **3r**. The Hill coefficient and zMIC results were obtained using the least squares method, using an algorithm to minimize the differences between the experimental values and the estimated values [23,24].

3.8. Statistical Analysis

Data were expressed as the mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's post-test, using GraphPadPrism 5.0 software.

Supplementary Materials: The following are available online. Figures S1–S40: ^1H and ^{13}C spectra for compounds **3a–3t**.

Author Contributions: Funding acquisition: C.V.B., L.A.B. and P.M.; supervision: P.M.; writing—original draft preparation: R.J.E., R.S.R., B.L.A., N.S., C.E.N., F.F.S., M.D., L.D., F.S.M., M.A.P., R.V.L., C.V.B., L.A.B. and P.M.; writing—review & editing: R.J.E., R.S.R., B.L.A., N.S. and P.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CNPq/FAPERGS/CAPES/BNDES, Brazil (grant numbers: 421703-2017-2/17-1265-8/14.2.0914.1) to C.V.B., L.A.B. and P.M. In addition, this study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES), Finance Code 001. C.V.B., L.A.B. and P.M. are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). Fellowships from CNPq (R.S.R., B.L.A., N.S. and L.D.) and CAPES (C.E.N., F.F.S., M.D. and F.S.M.) are also acknowledged.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in Supplementary Materials.

Acknowledgments: We are grateful to Miguel Viveiros from the Universidade Nova de Lisboa (Lisbon, Portugal) for providing the *M. tuberculosis* clinical isolates used in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the synthesized compounds are available from the authors.

References

1. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report, 2020. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131> (accessed on 18 August 2021).
2. Parish, T. In vitro drug discovery models for *Mycobacterium tuberculosis* relevant for host infection. *Expert Opin. Drug Discov.* **2020**, *15*, 349–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ferraris, D.M.; Miggianno, R.; Rossi, F.; Rizzi, M. *Mycobacterium tuberculosis* Molecular Determinants of Infection, Survival Strategies, and Vulnerable Targets. *Pathogens* **2018**, *7*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rode, H.B.; Lade, D.M.; Grée, R.; Mainkar, P.S.; Chandrasekhar, S. Strategies towards the synthesis of anti-tuberculosis drugs. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 5428–5459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mikušová, K.; Ekins, S. Learning from the past for TB drug discovery in the future. *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 534–545. [[CrossRef](#)]
6. Williams, K.J.; Duncan, K. Current Strategies for Identifying and Validating Targets for New Treatment-Shortening Drugs for TB. *Curr. Mol. Med.* **2007**, *7*, 297–307. [[CrossRef](#)]
7. Bloemberg, G.V.; Keller, P.M.; Stucki, D.; Trauner, A.; Borrell, S.; Latshang, T.; Coscolla, M.; Rothe, T.; Hömke, R.C.; Feldmann, J.; et al. Acquired resistance to bedaquiline and delamanid in therapy for tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1986–1988. [[CrossRef](#)]
8. Pissinate, K.; Villela, A.D.; Rodrigues-Junior, V.; Giacobbo, B.C.; Grams, E.S.; Abbadi, B.L.; Trindade, R.V.; Nery, L.R.; Bonan, C.D.; Back, D.F.; et al. 2-(Quinolin-4-yloxy)acetamides are active against drug-susceptible and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 235–239. [[CrossRef](#)]
9. Giacobbo, B.C.; Pissinate, K.; Rodrigues-Junior, V.; Villela, A.D.; Grams, E.S.; Abbadi, B.L.; Subtil, F.T.; Sperotto, N.; Trindade, R.V.; Back, D.F.; et al. New insights into the SAR and drug combination synergy of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *126*, 491–501. [[CrossRef](#)]
10. Macchi, F.S.; Pissinate, K.; Villela, A.D.; Abbadi, B.L.; Rodrigues-Junior, V.; Nabinger, D.D.; Altenhofen, S.; Sperotto, N.; Dadda, A.; Subtil, F.T.; et al. 1*H*-Benzo[*d*]imidazoles and 3,4-dihydroquinazolin-4-ones: Design, synthesis and antitubercular activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 153–164. [[CrossRef](#)]
11. Reddy, G.S.; Pal, M. Indole Derivatives as Anti-Tubercular Agents: An Overview on their Synthesis and Biological Activities. *Curr. Med. Chem.* **2020**, *28*, 4531–4568. [[CrossRef](#)]
12. Kumar, S.; Ritika. A brief review of the biological potential of indole derivatives. *Future J. Pharm. Sci.* **2020**, *6*, 121. [[CrossRef](#)]
13. Joucla, L.; Batail, N.; Djakovitcha, L. “On Water” Direct and Site-Selective Pd-Catalysed CH Arylation of (NH)-Indoles. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 2929–2936. [[CrossRef](#)]
14. Perdigão, J.; Silva, H.; Machado, D.; Macedo, R.; Maltez, F.; Silva, C.; Jordao, L.; Couto, I.; Mallard, K.; Coll, F.; et al. Unraveling *Mycobacterium tuberculosis* genomic diversity and evolution in Lisbon, Portugal, a highly drug resistant setting. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 991. [[CrossRef](#)]
15. van Meerloo, J.; Kaspers, G.J.; Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *731*, 237–245. [[PubMed](#)]
16. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125–1131. [[CrossRef](#)]
17. Kumaravel, T.S.; Vilhar, B.; Faux, S.P.; Jha, A.N. Comet Assay measurements: A perspective. *Cell Biol. Toxicol.* **2009**, *25*, 53–64. [[CrossRef](#)]
18. Czock, D.; Keller, F. Mechanism-based pharmacokinetic–pharmacodynamic modeling of antimicrobial drug effects. *J. Pharmacokin. Pharmacodyn.* **2007**, *34*, 727–751. [[CrossRef](#)]
19. Mueller, M.; de la Peña, A.; Derendorf, H. Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill Curves versus MIC. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 369–377. [[CrossRef](#)]
20. Sim, J.H.; Jamaludin, N.S.; Khoo, C.-H.; Cheah, Y.-K.; Binti, S.N.; Halim, A.; Seng, H.-L.; Tiekink, E.R.T. In vitro antibacterial and time-kill evaluation of phosphane-gold(I) dithiocarbamates, R₃PAu[S₂CN(iPr)CH₂CH₂OH] for R = Ph, Cy and Et, against a broad range of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Gold Bull.* **2014**, *47*, 225–236. [[CrossRef](#)]
21. de Steenwinkel, J.E.M.; de Knegt, G.J.; ten Kate, M.T.; van Belkum, A.; Verbrugh, H.A.; Kremer, K.; van Soolingen, D.; Bakker-Woudenberg, I.A.J.M. Time–kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 2582–2589. [[CrossRef](#)]
22. Parish, T.; Roberts, D.M. Determination of Compound Kill Kinetics against *Mycobacterium tuberculosis*. In *Mycobacteria Protocols, Methods in Molecular Biology*, 3rd ed.; Springer Protocols: New York, NY, USA, 2015; Volume 1285, pp. 269–279.
23. Foerster, S.; Unemo, M.; Hathaway, L.J.; Low, N.; Althaus, C.L. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, 216. [[CrossRef](#)]

24. Regoes, R.R.; Wiuff, C.; Zappala, R.M.; Garner, K.N.; Baquero, F.; Levin, B.R. Pharmacodynamic Functions: A Multiparameter Approach to the Design of Antibiotic Treatment Regimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3670–3676. [[CrossRef](#)]
25. Chen, S.; Liao, Y.; Zhao, F.; Qi, H.; Liu, S.; Deng, G.-J. Palladium-Catalyzed Direct Arylation of Indoles with Cyclohexanones. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1618–1621. [[CrossRef](#)]
26. Zhang, Y.-P.; Feng, X.-L.; Yang, Y.-S.; Cao, B.-X. Metal-free, C–H arylation of indole and its derivatives with aryl diazonium salts by visible-light photoredox catalysis. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 2298–2302. [[CrossRef](#)]
27. Bellina, F.; Benelli, F.; Rossi, R. Direct Palladium-Catalyzed C-3 Arylation of Free (NH)-Indoles with Aryl Bromides under Ligandless Conditions. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5529–5535. [[CrossRef](#)]
28. Chen, Y.; Guo, S.; Li, K.; Qu, J.; Yuan, H.; Hua, Q.; Chen, B. Palladium-Catalyzed Direct Denitrogenative C-3-Arylation of 1H-Indoles with Arylhydrazines using Air as the Oxidant. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 711–715. [[CrossRef](#)]
29. Andersen, K.; Perregaard, J.; Arnt, J.; Nielsen, J.B.; Bergtrup, M. Selective, Centrally Acting Serotonin 5-HT₂ Antagonists. 2. Substituted 3-(4-Fluorophenyl)-1H-indoles. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4823–4831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Ragaini, F.; Rapetti, A.; Visentin, E.; Monzani, M.; Caselli, A.; Cenini, S. Synthesis of Indoles by Intermolecular Cyclization of Unfunctionalized Nitroarenes and Alkynes, Catalyzed by Palladium–Phenanthroline Complexes. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3748–3753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Yang, R.; Yu, J.-T.; Sun, S.; Zheng, Q.; Cheng, J. Copper-mediated intramolecular aza-Wacker-type cyclization of 2-alkenylanilines toward 3-aryl indoles. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 445–448. [[CrossRef](#)]

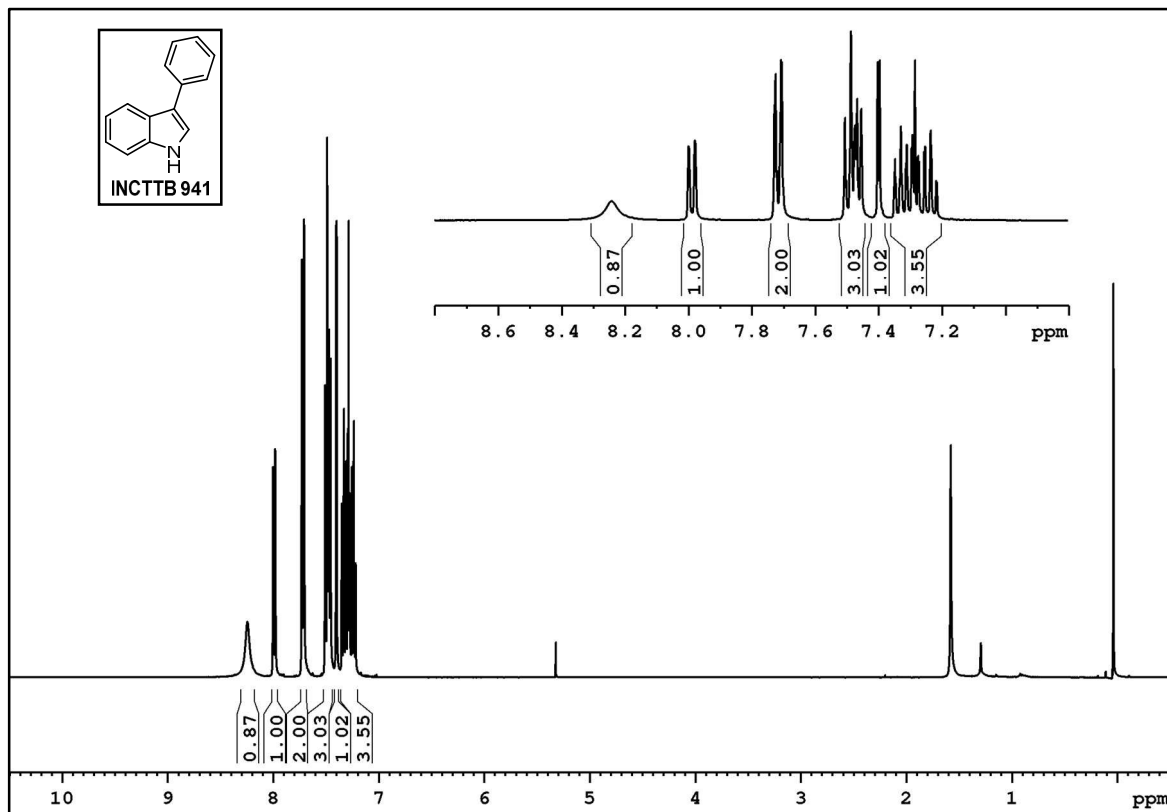
Synthesis and antimycobacterial activity of 3-phenyl-1*H*-indoles

Renata Jardim Etchart, Raoní S. Rambo, Bruno Lopes Abbadi, Nathalia Sperotto, Christiano Ev Neves, Fernanda Fries Silva, Maiele Dornelles, Lovaine Duarte, Fernanda Souza Macchi, Marcia Alberton Perelló, Rogério Vescia Lourega, Cristiano Valim Bizarro, Luiz Augusto Basso, Pablo Machado,*

Table of contents:

NMR Spectra for compounds 3a-	
3t	2-21

NMR Spectra for compounds 3a-3t:

Figure S1 – ¹H NMR spectrum of compound 3a.

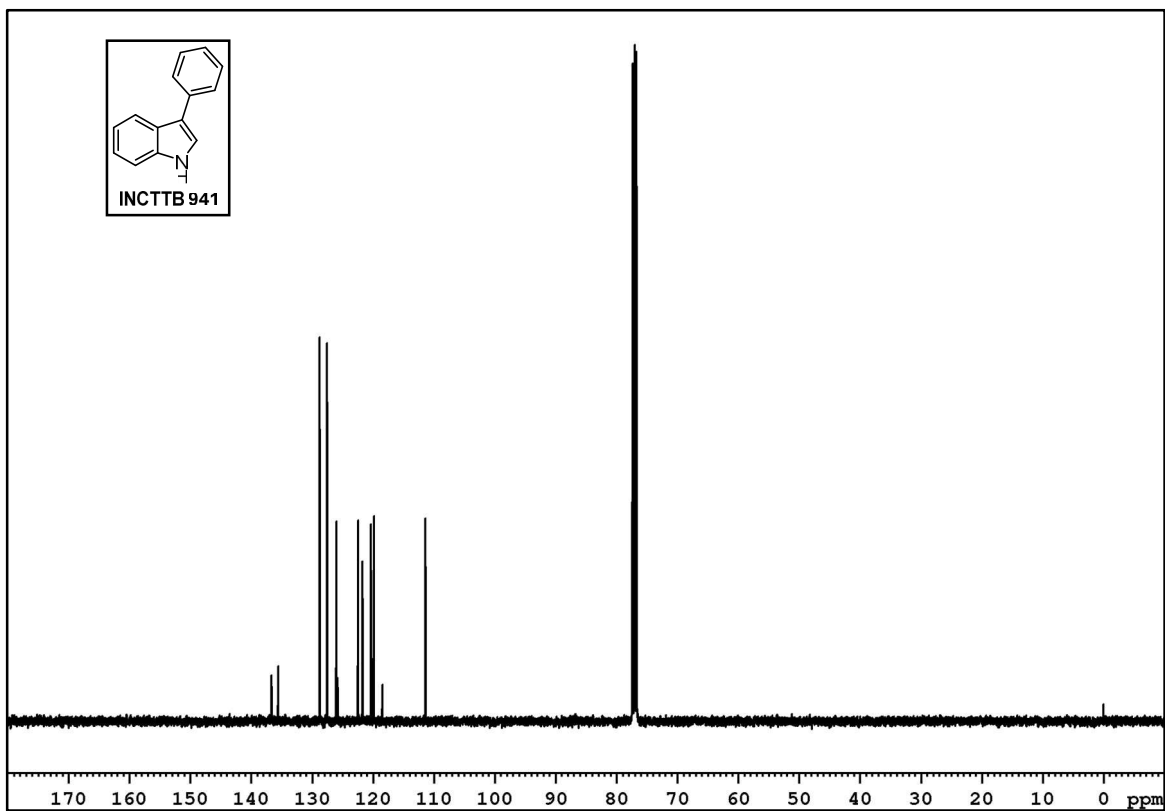


Figure S2 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3a.

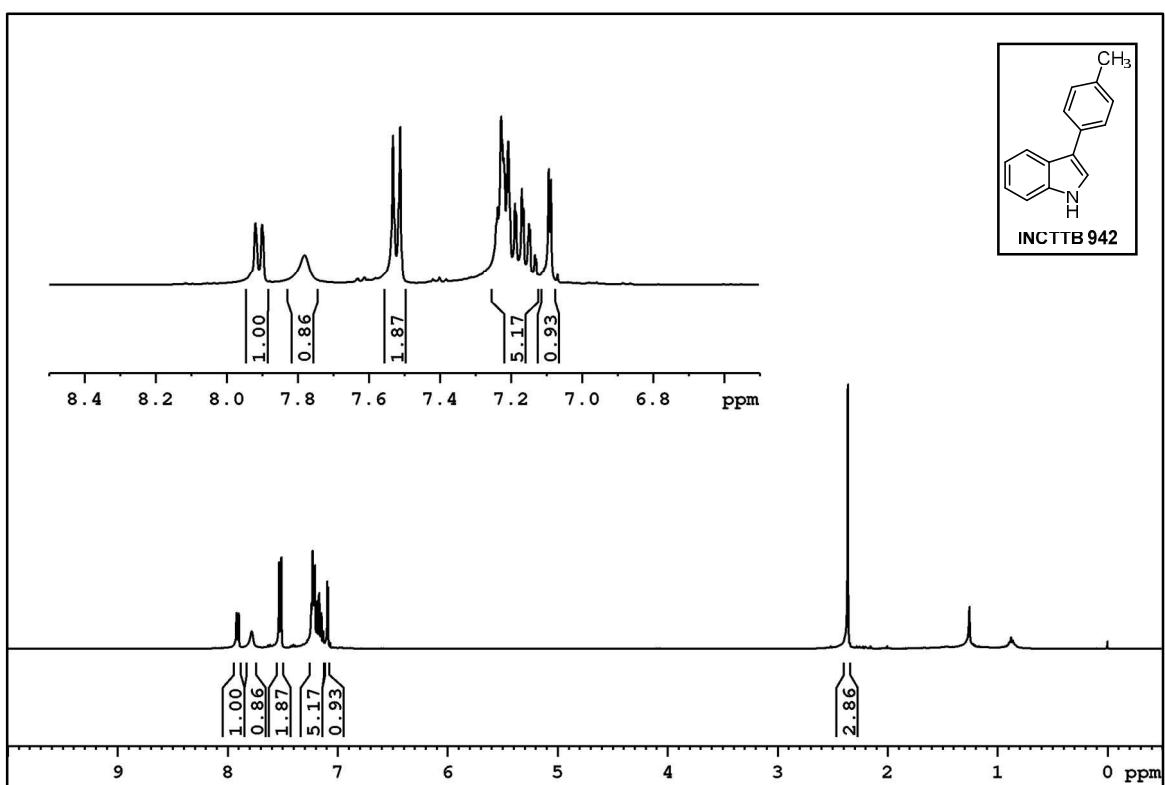


Figure S3 – ^1H NMR spectrum of compound 3b.

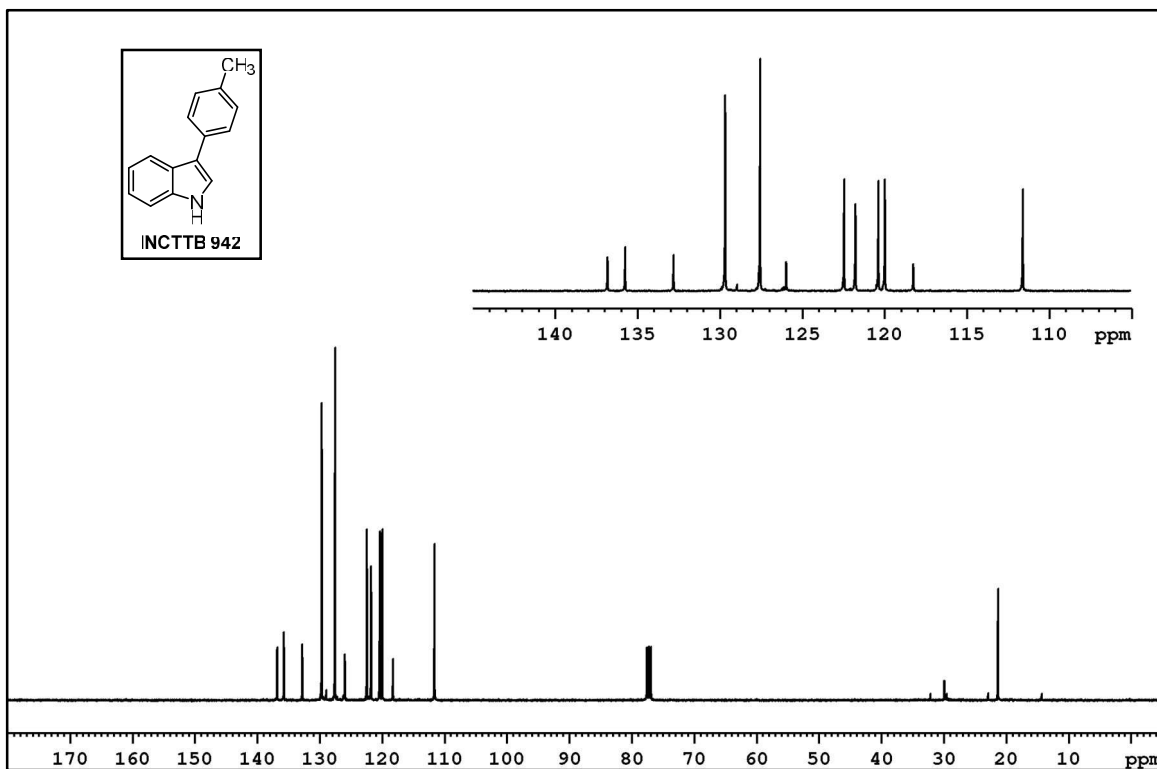


Figure S4 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3b.

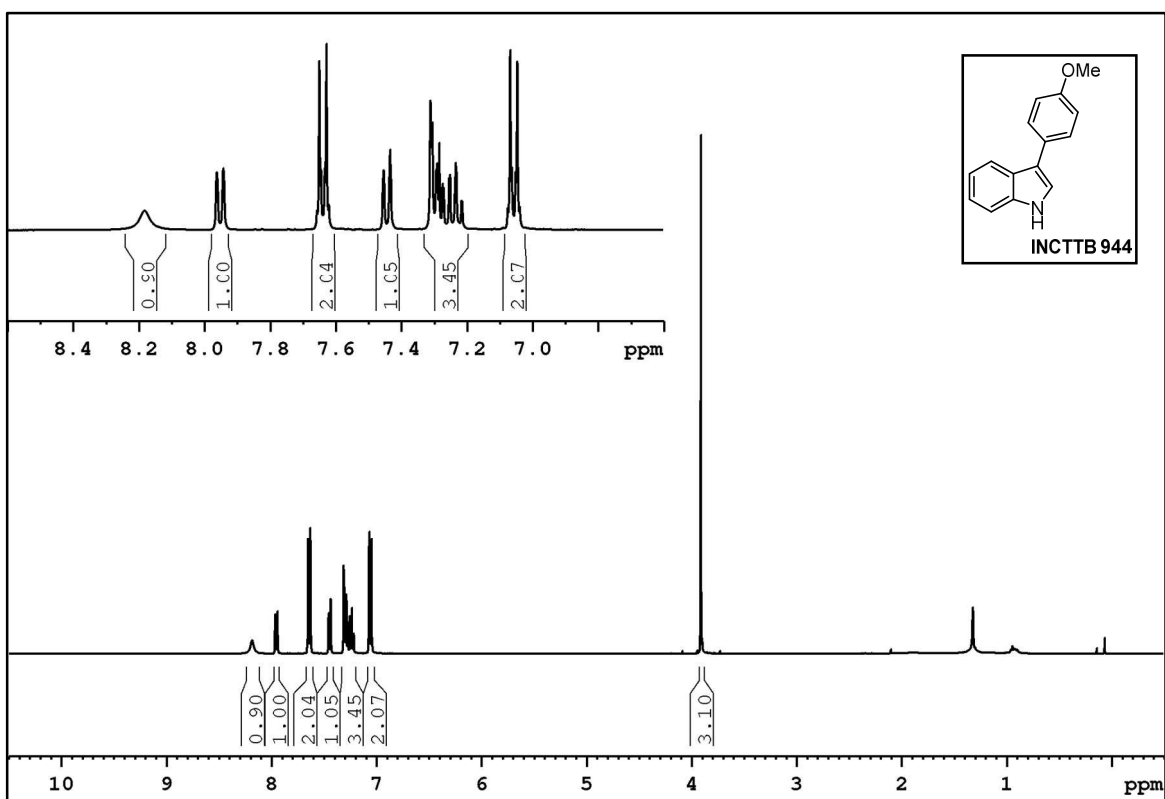


Figure S5 – ^1H NMR spectrum of compound 3c.

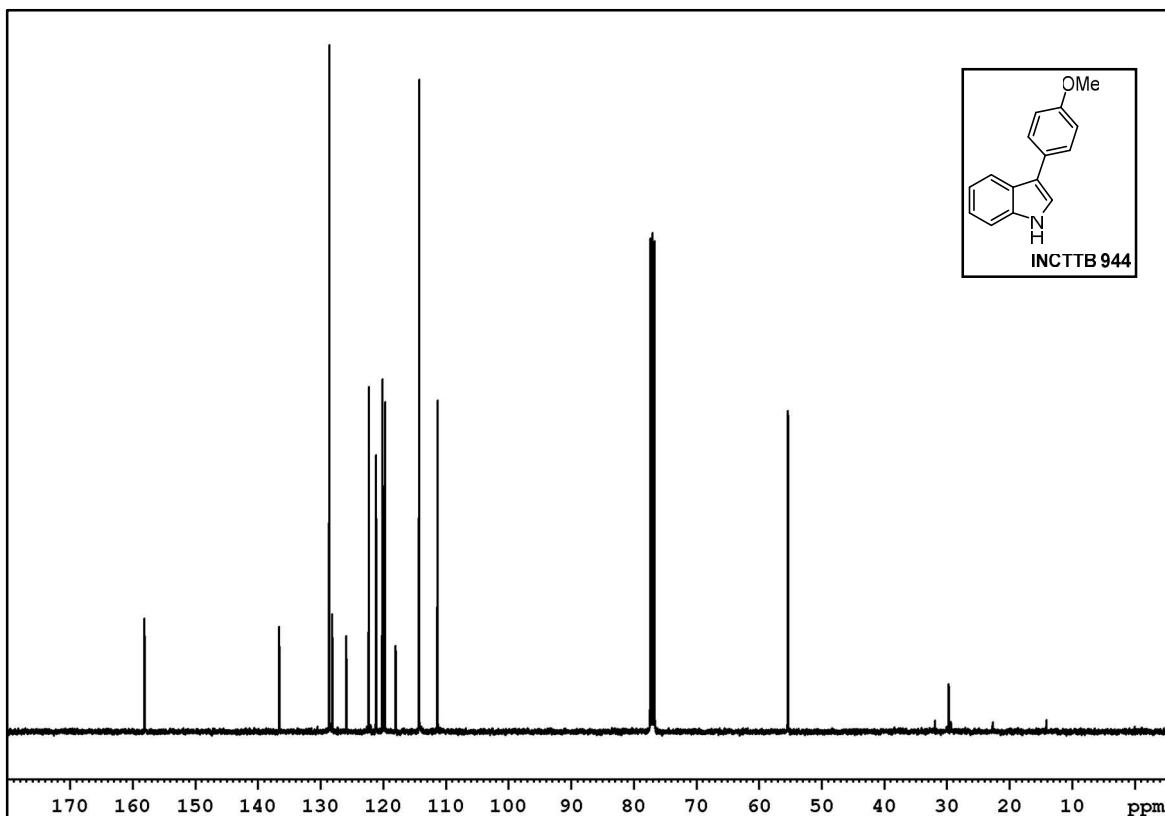


Figure S6 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3c.

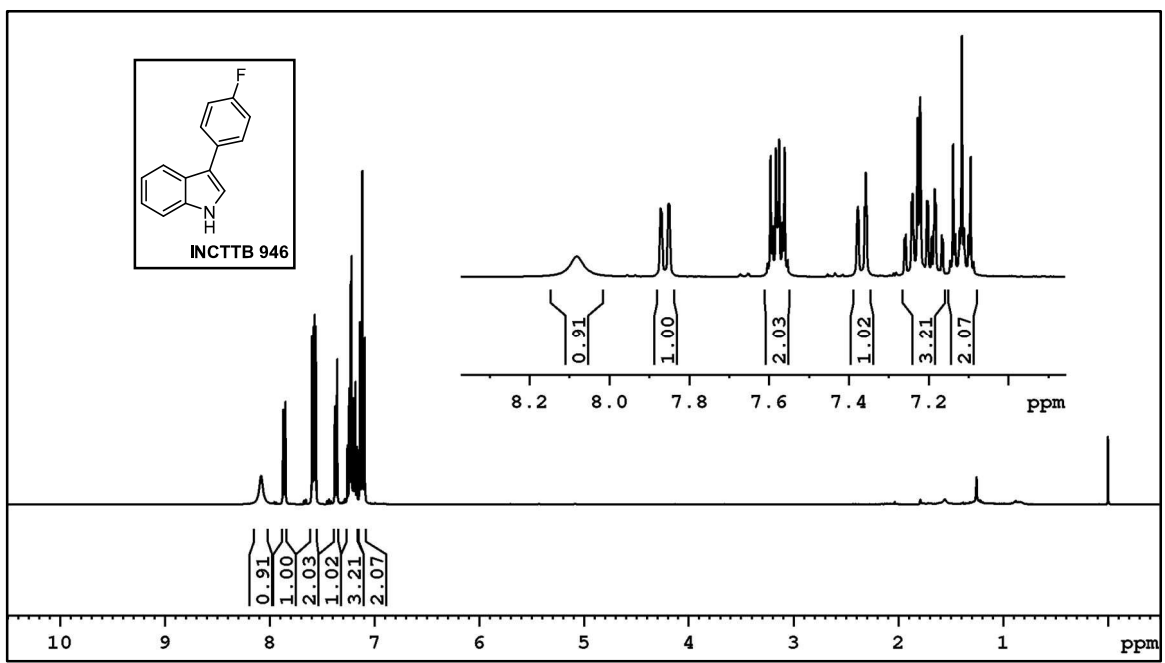


Figure S7 – ^1H NMR spectrum of compound 3d.

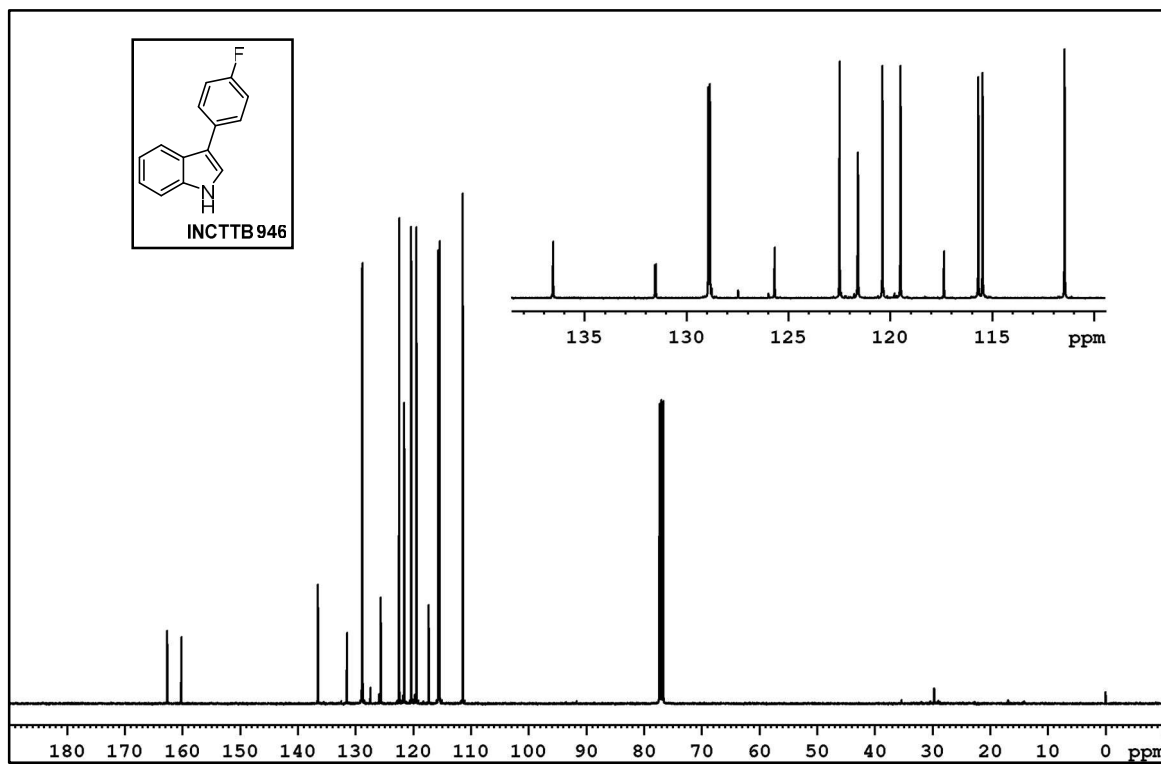


Figure S7 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3d.

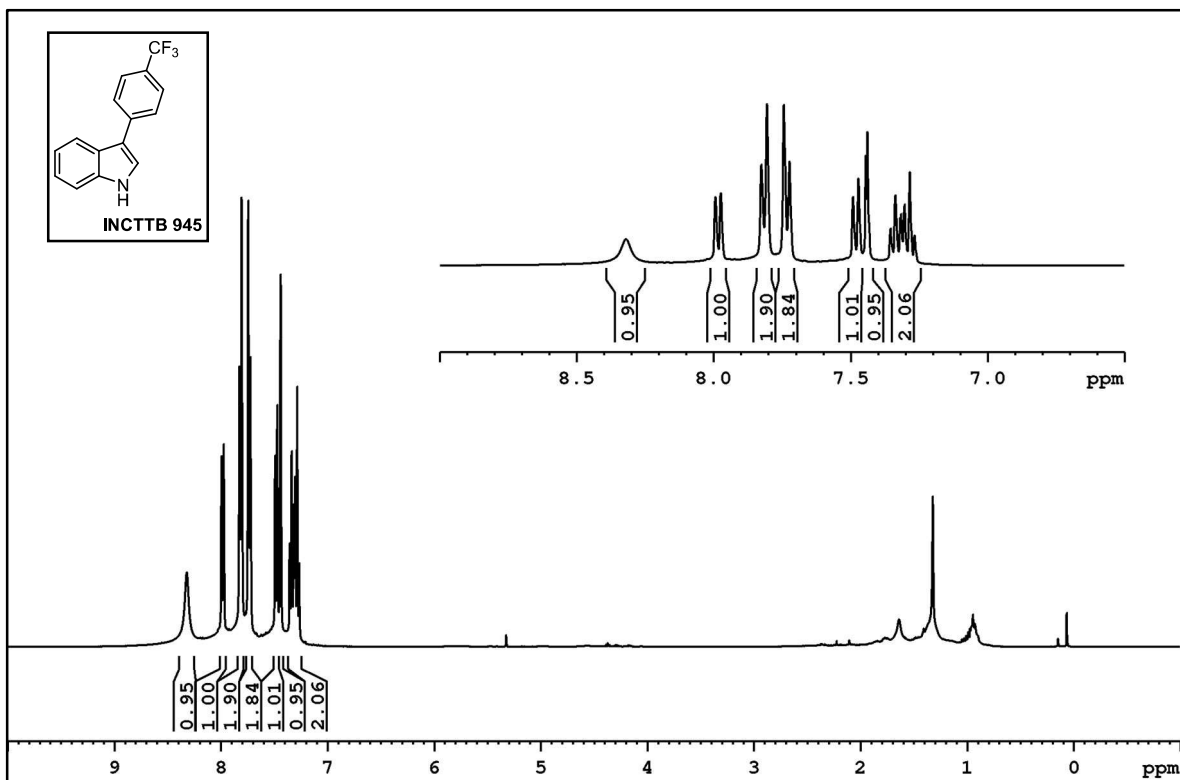


Figure S9 – ^1H NMR spectrum of compound 3e.

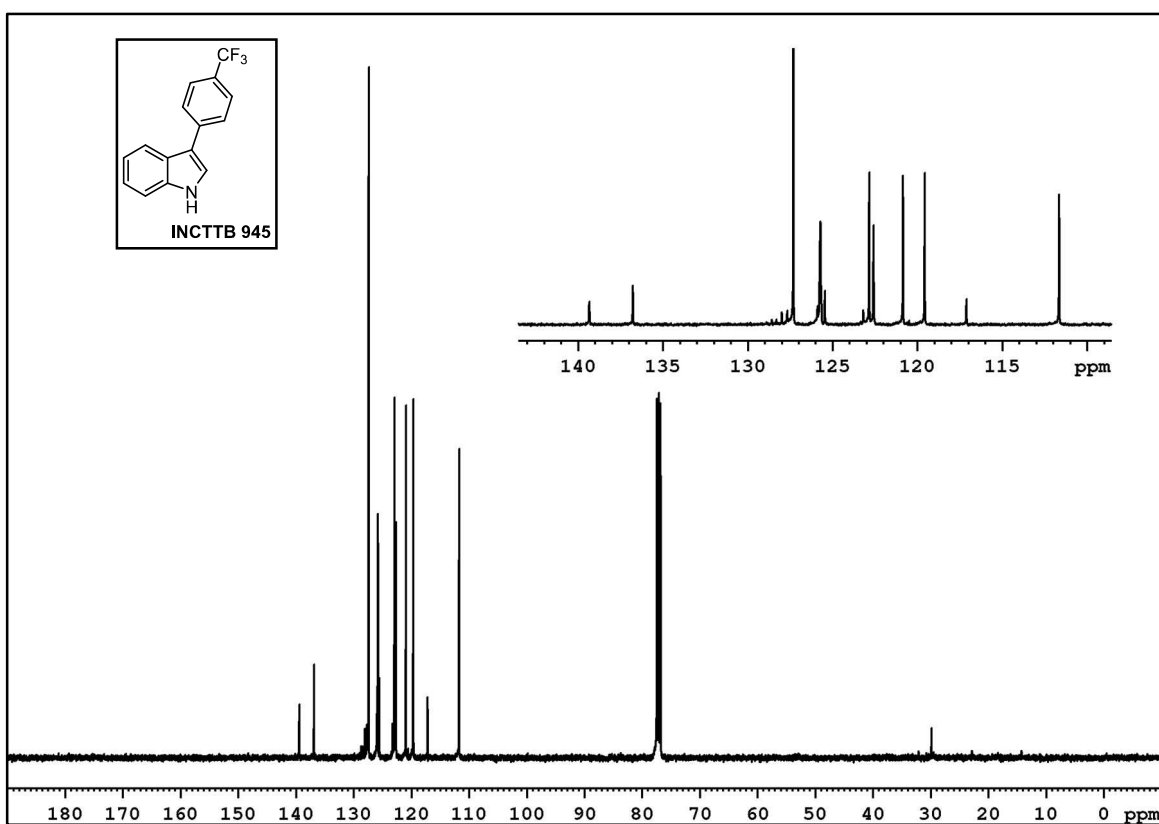


Figure S10 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3e.

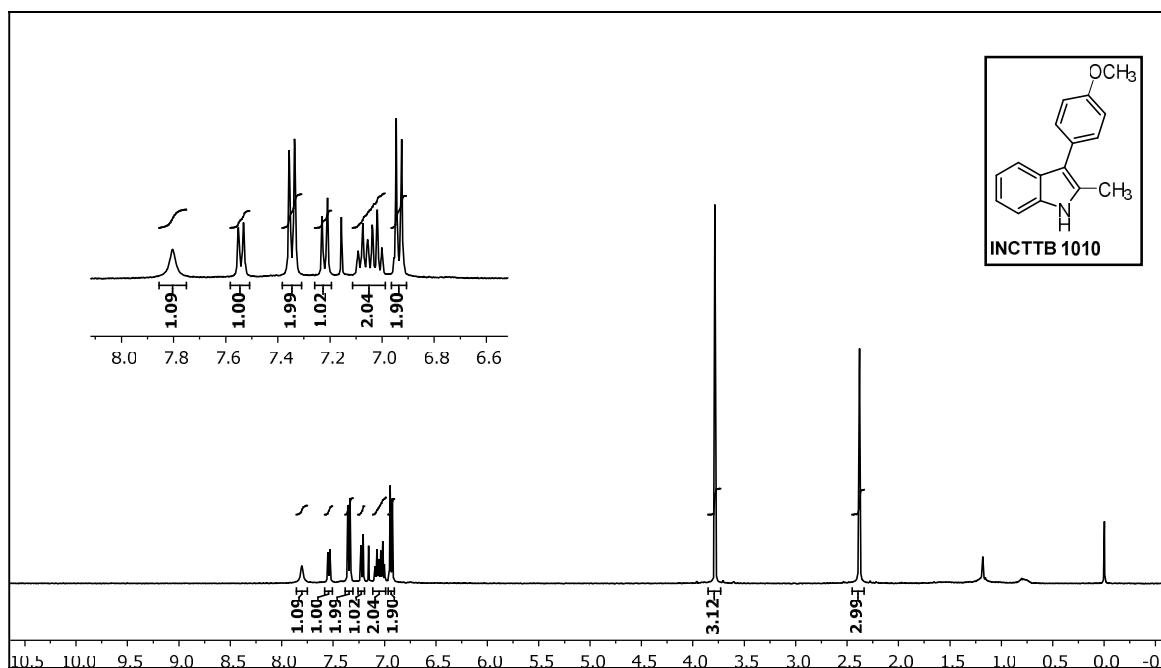


Figure S11 – ^1H NMR spectrum of compound 3f.

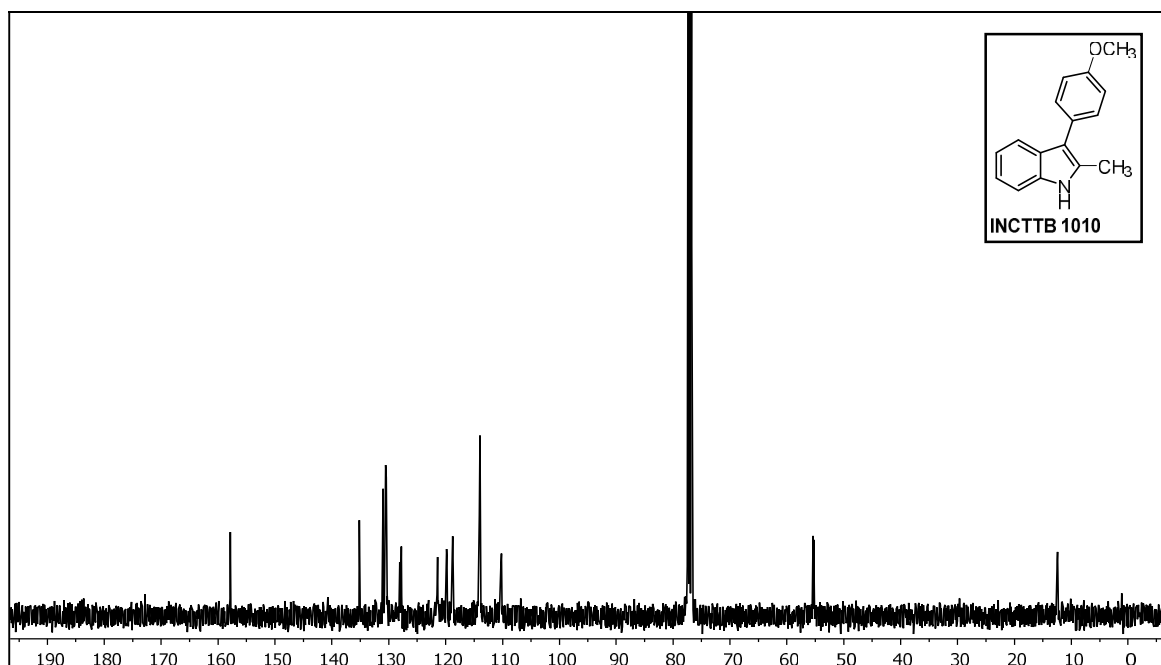


Figure S12 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3f.

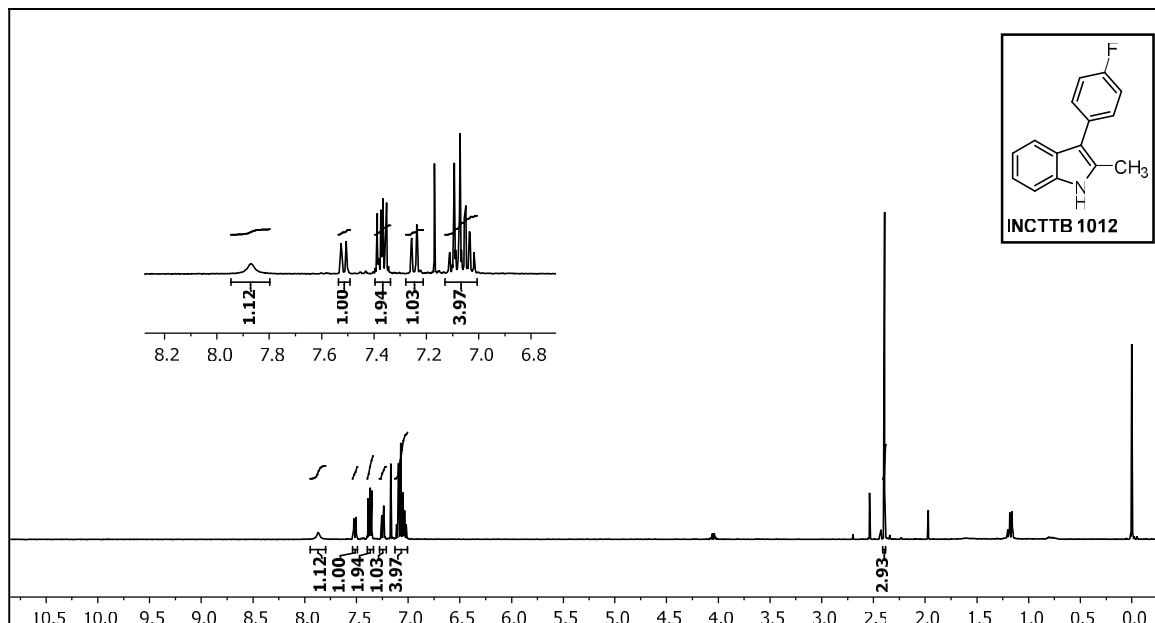


Figure S13 – ^1H NMR spectrum of compound 3g.

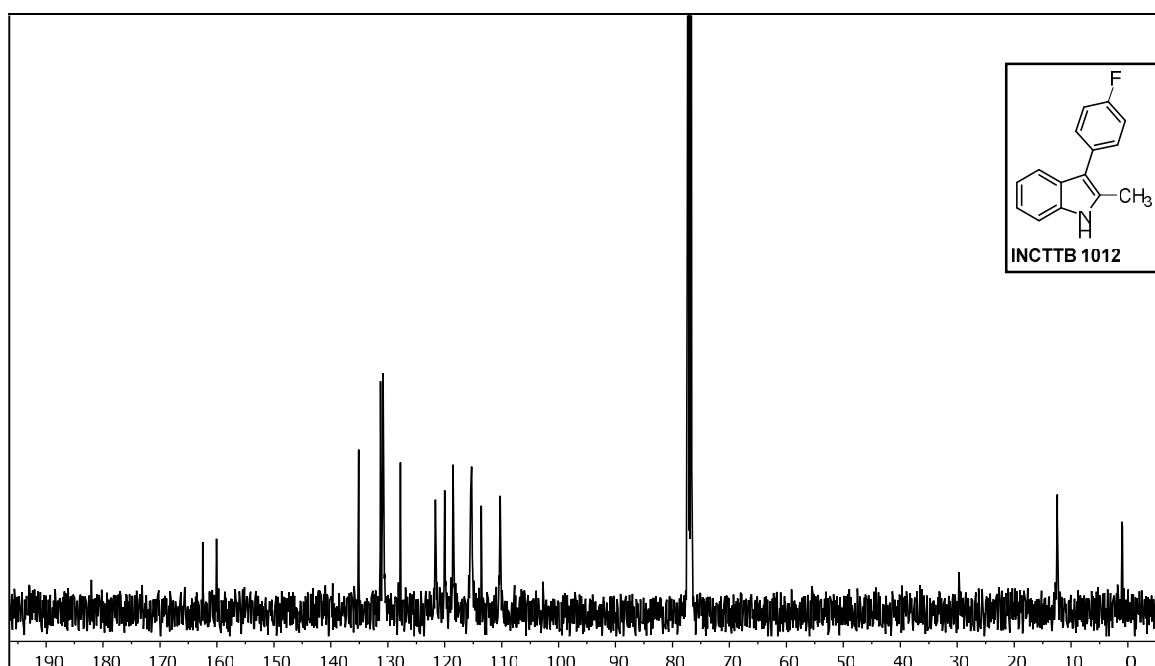


Figure S8 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3g.

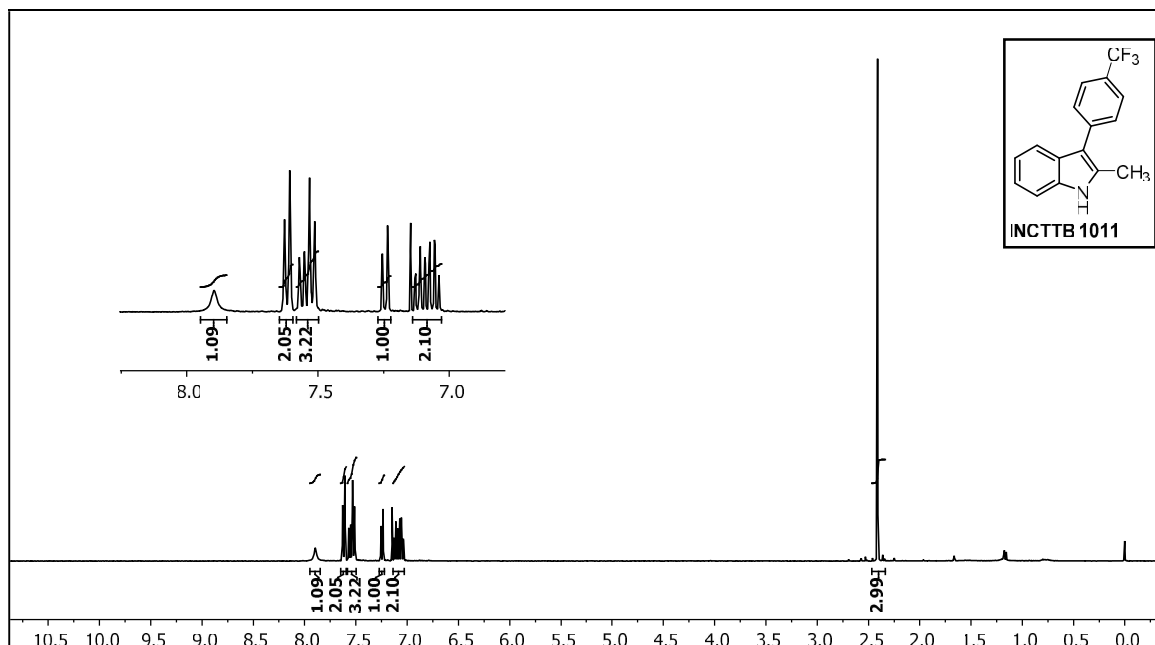


Figure S9 – ^1H NMR spectrum of compound 3h.

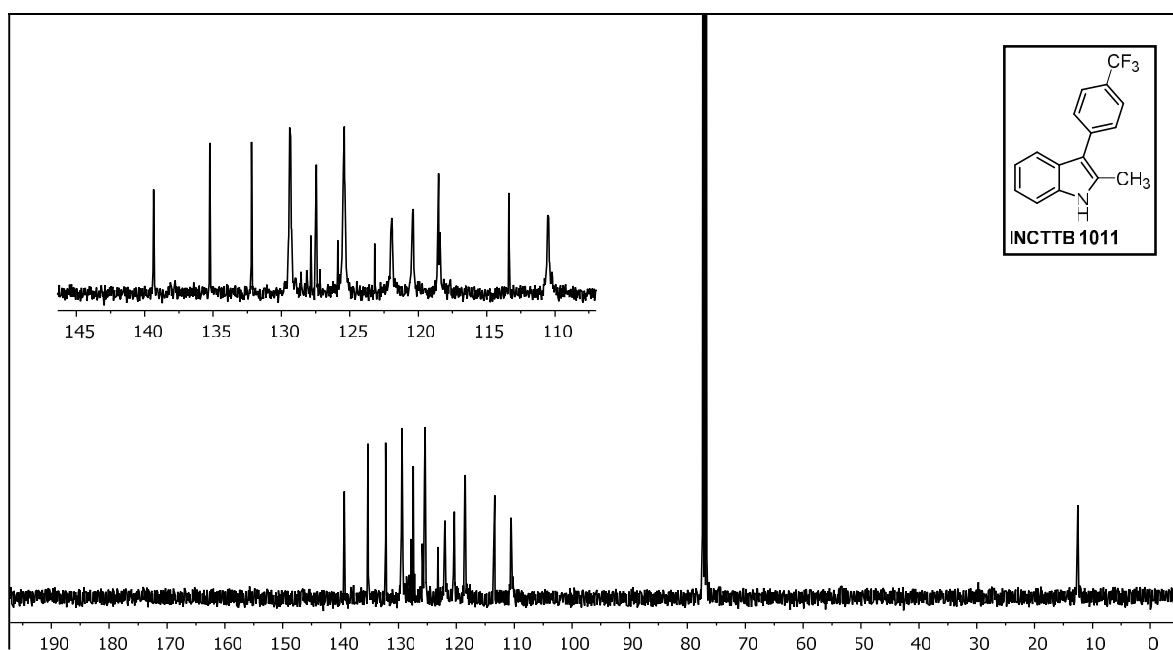


Figure S16 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3h.

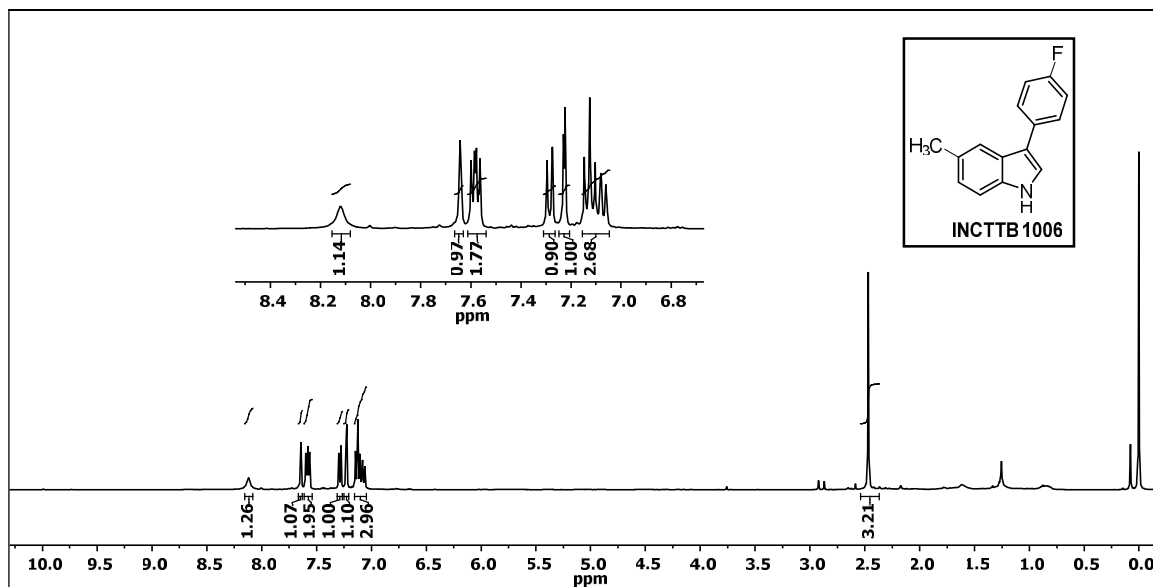


Figure S17 – ^1H NMR spectrum of compound 3i.

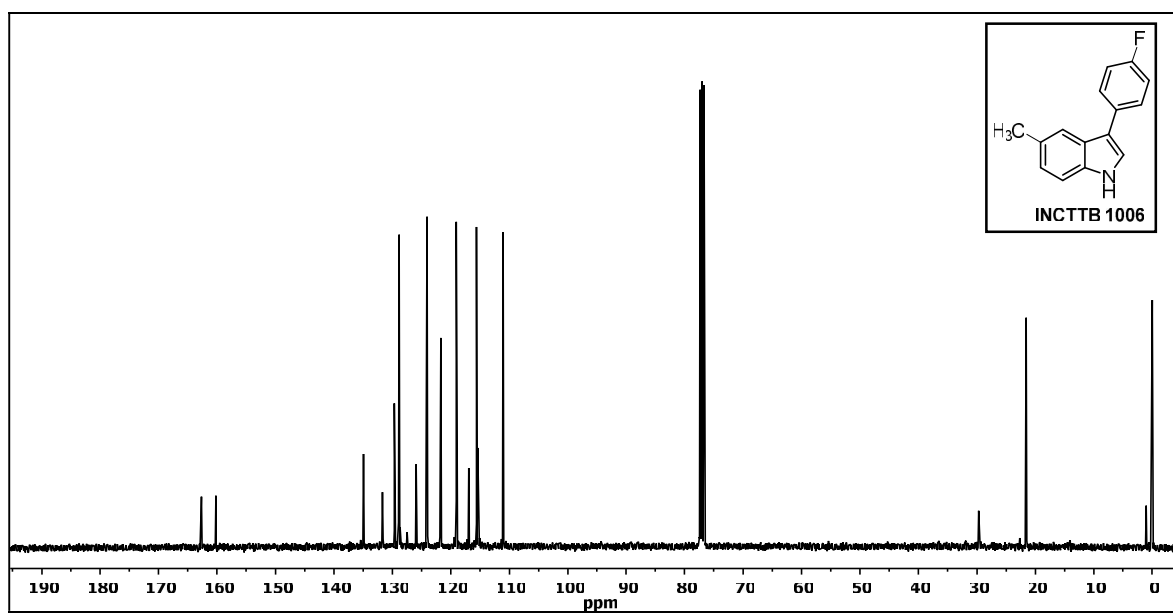


Figure S18 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3i.

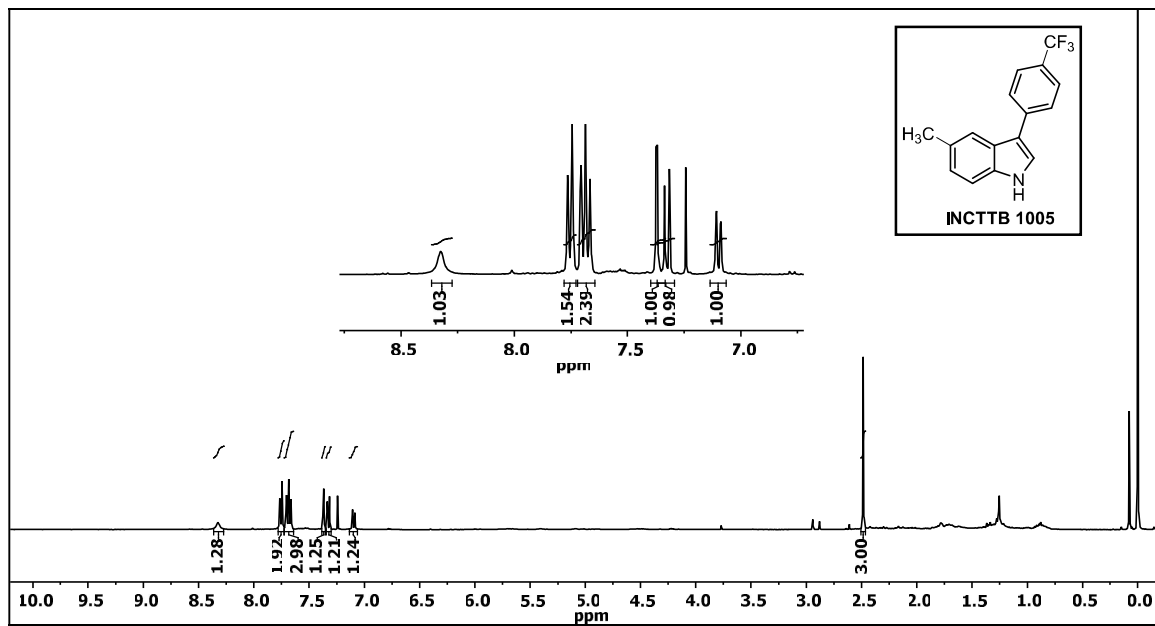


Figure S10 – ^1H NMR spectrum of compound 3j.

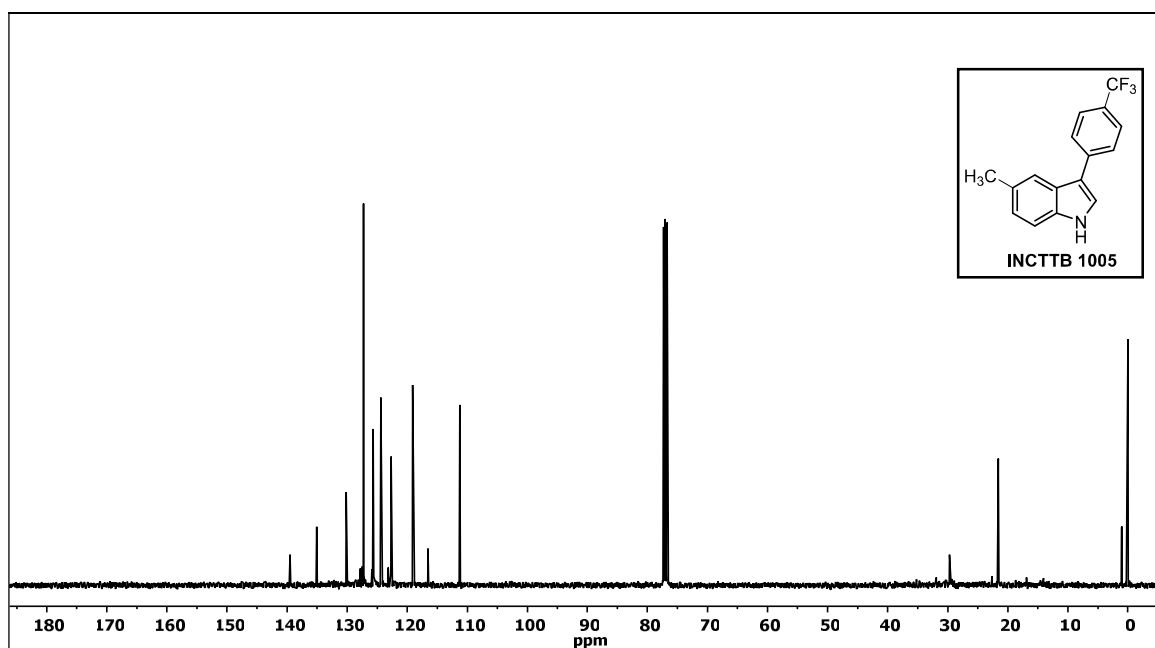


Figure S20 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3j.

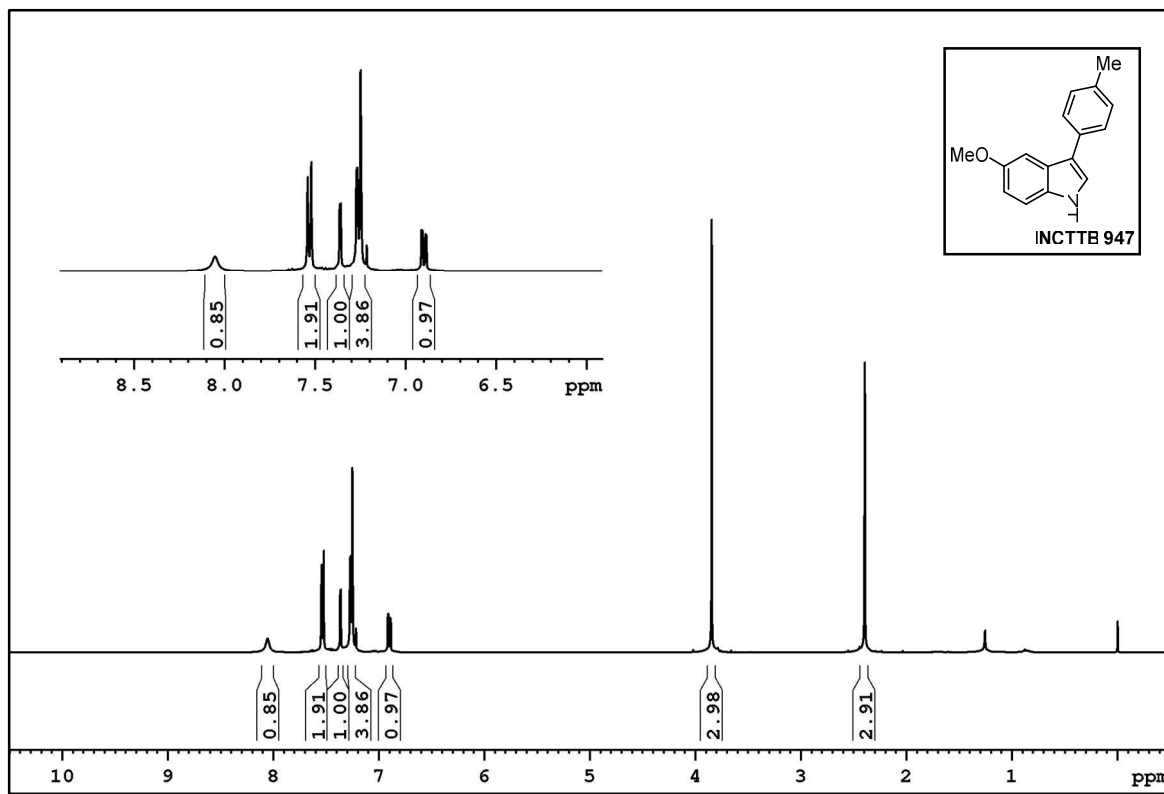


Figure S11 – ^1H NMR spectrum of compound 3k.

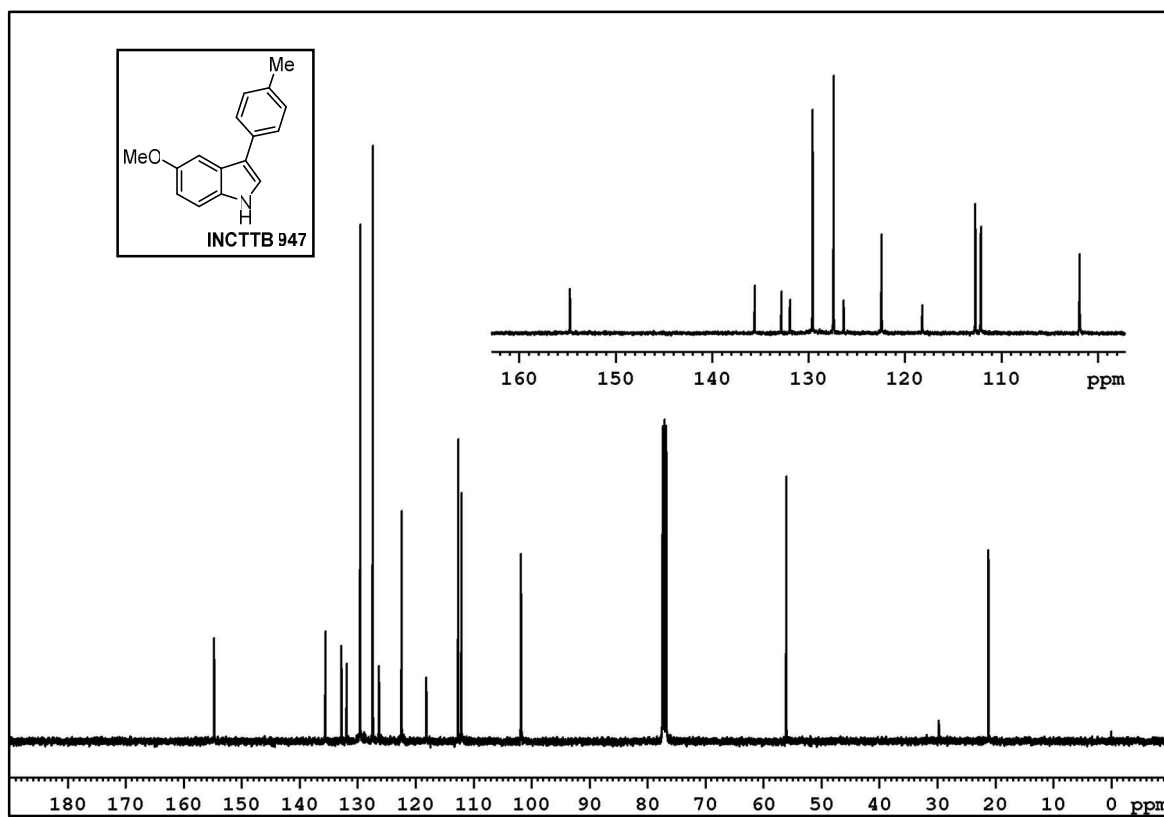


Figure S22 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3k.

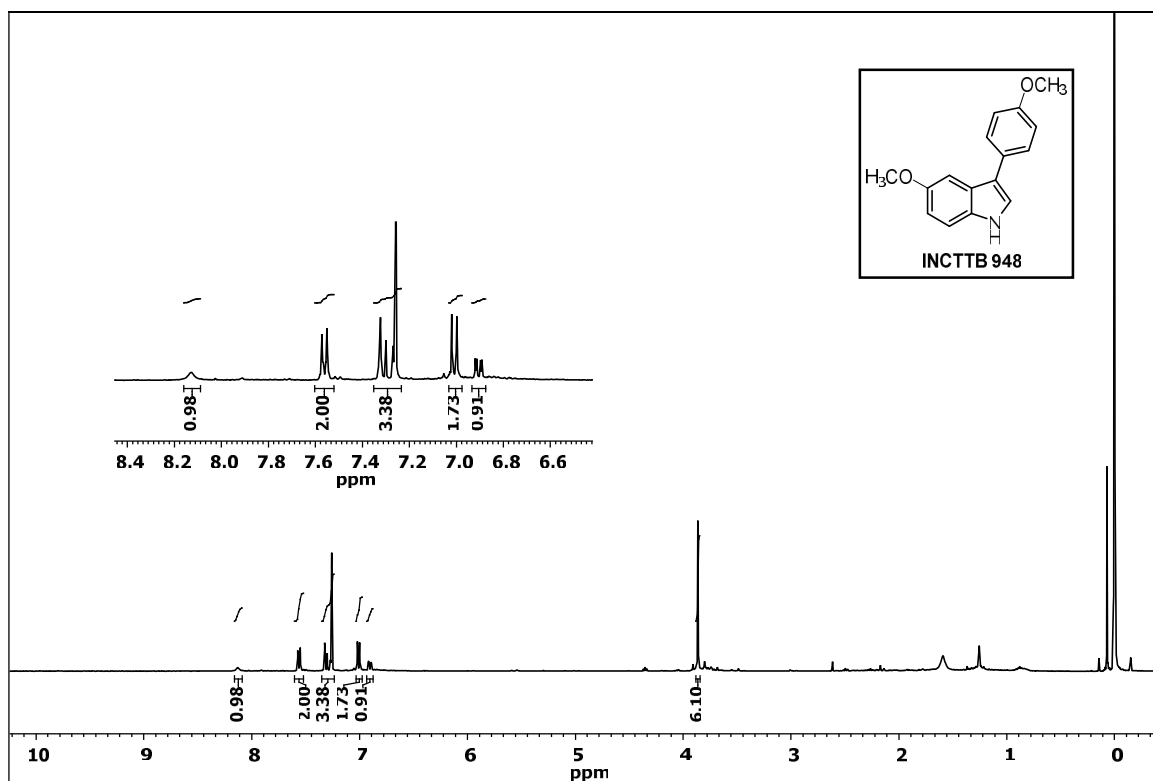


Figure S12 – ^1H NMR spectrum of compound 3l.

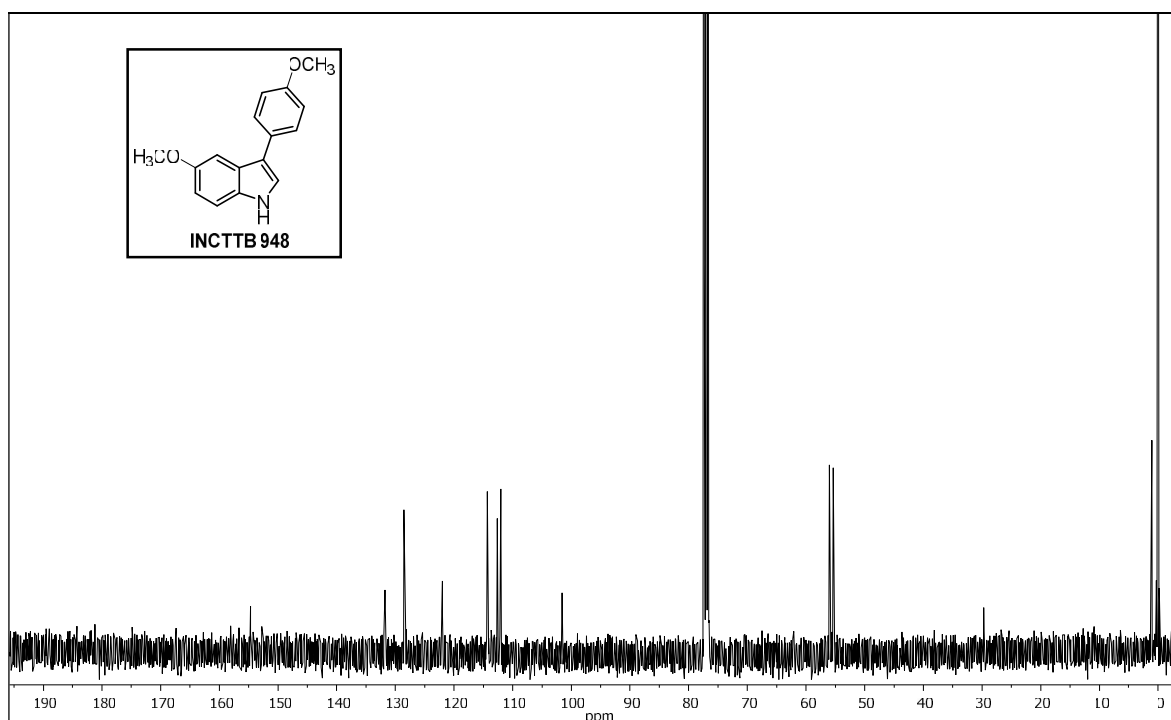


Figure S13 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3l.

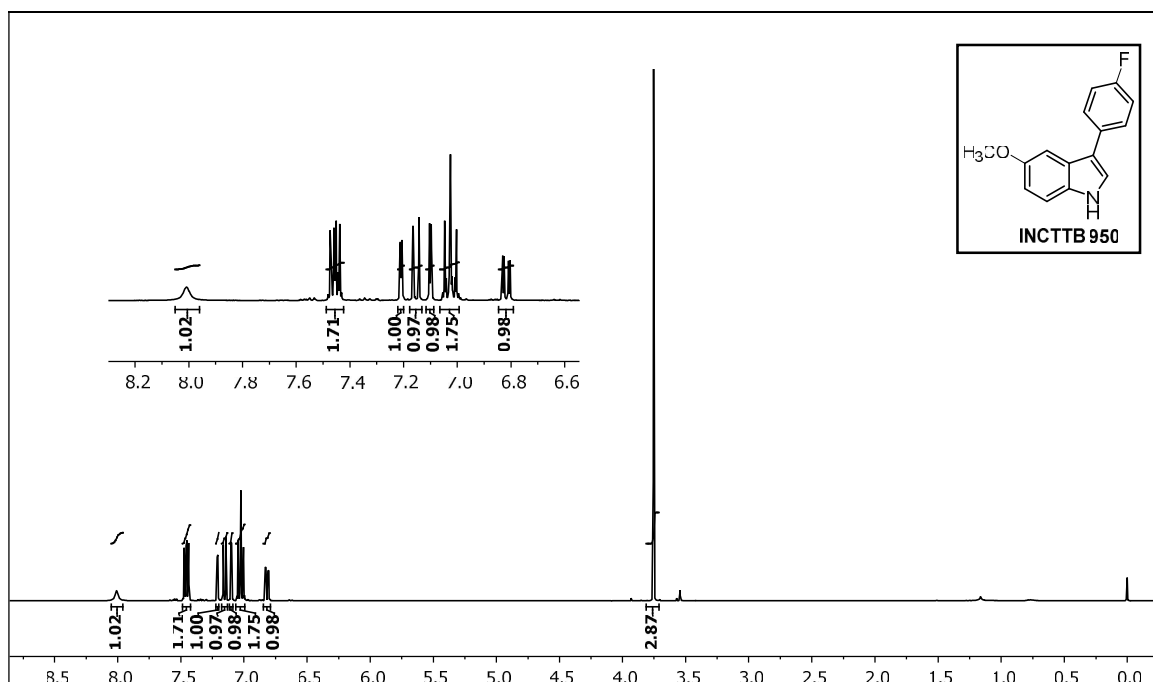


Figure S25 – ^1H NMR spectrum of compound 3m.

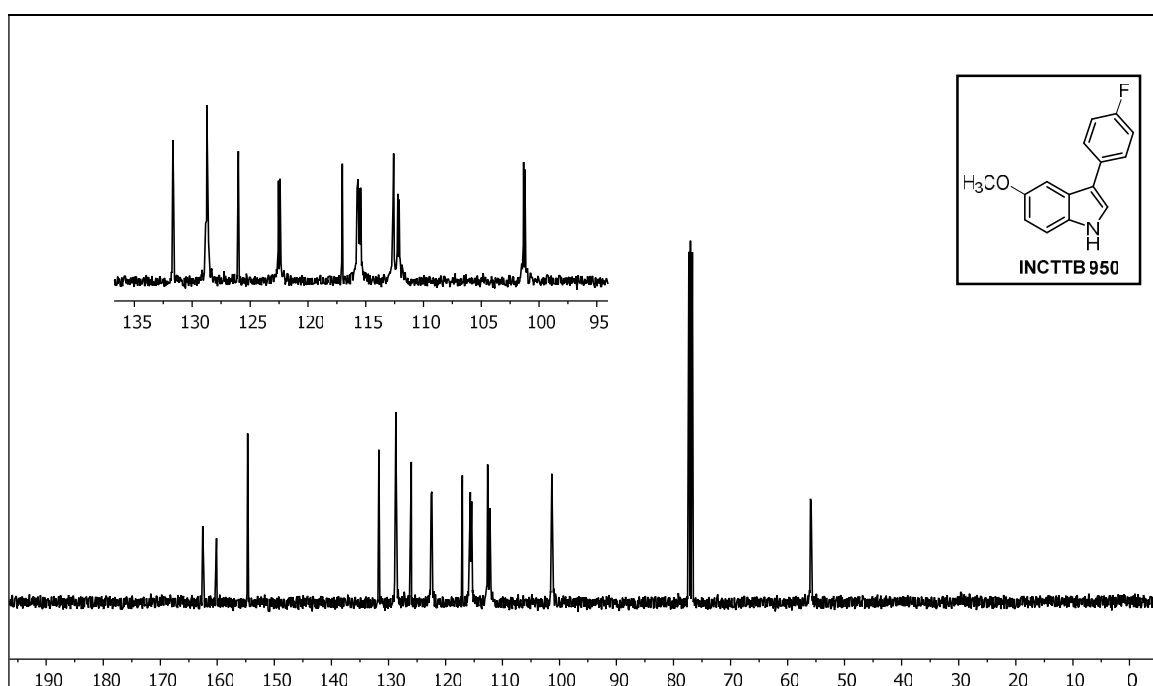


Figure S26 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3m.

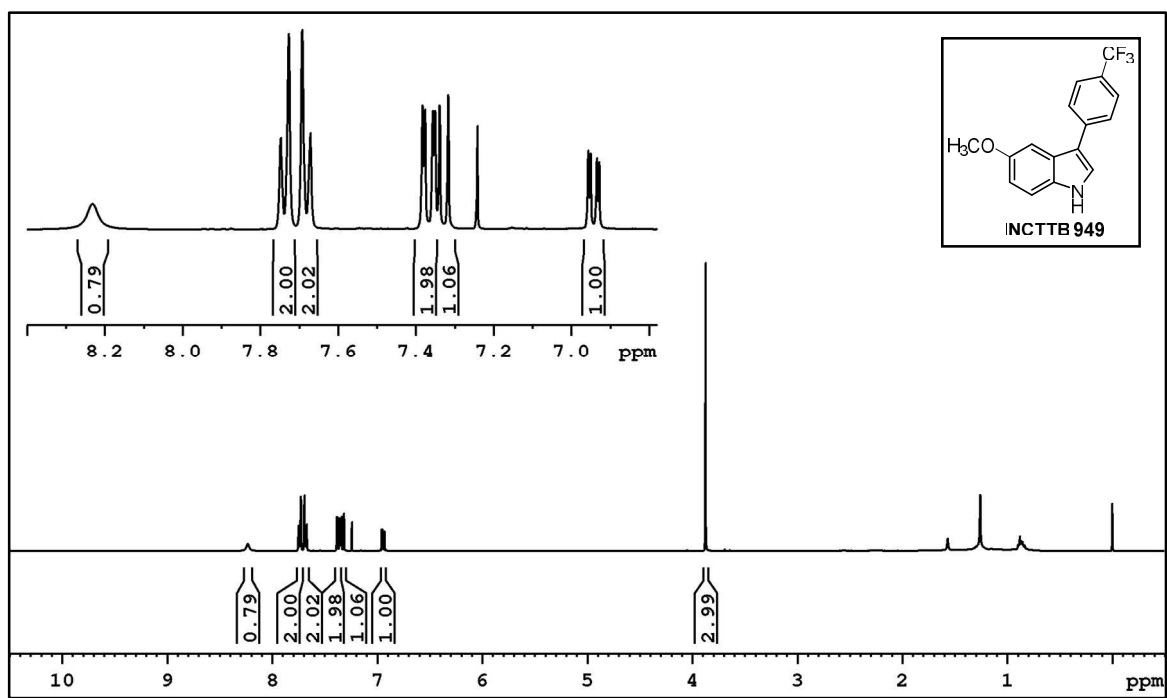


Figure S27 – ^1H NMR spectrum of compound 3n.

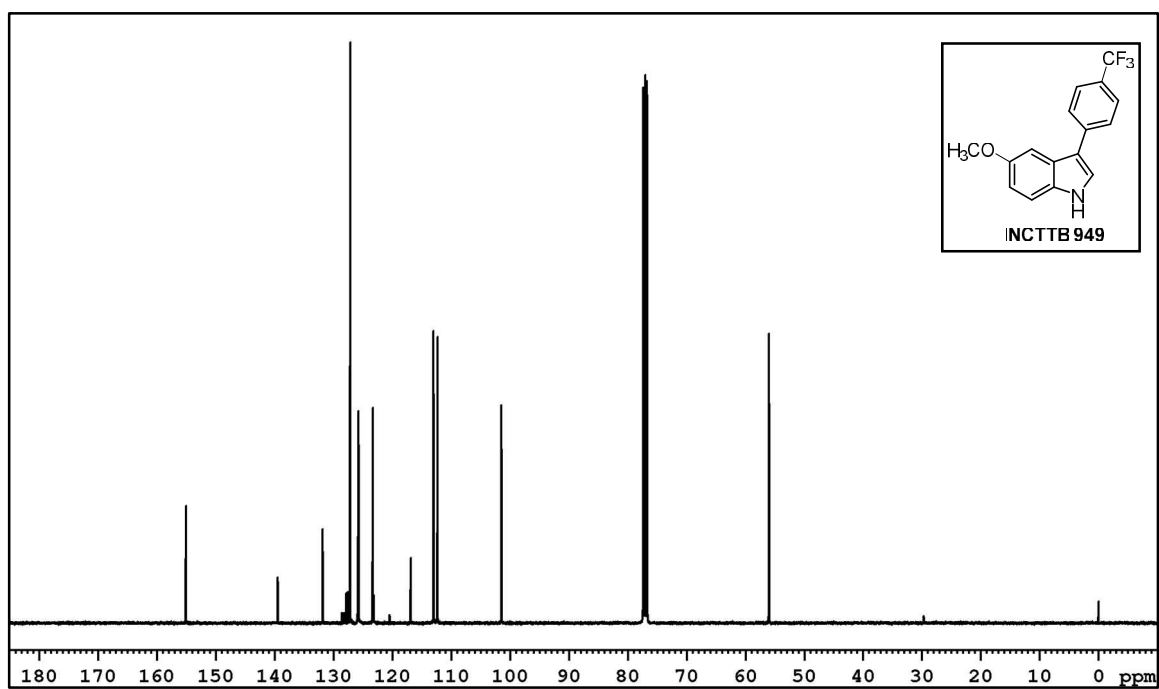


Figure S28 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3n.

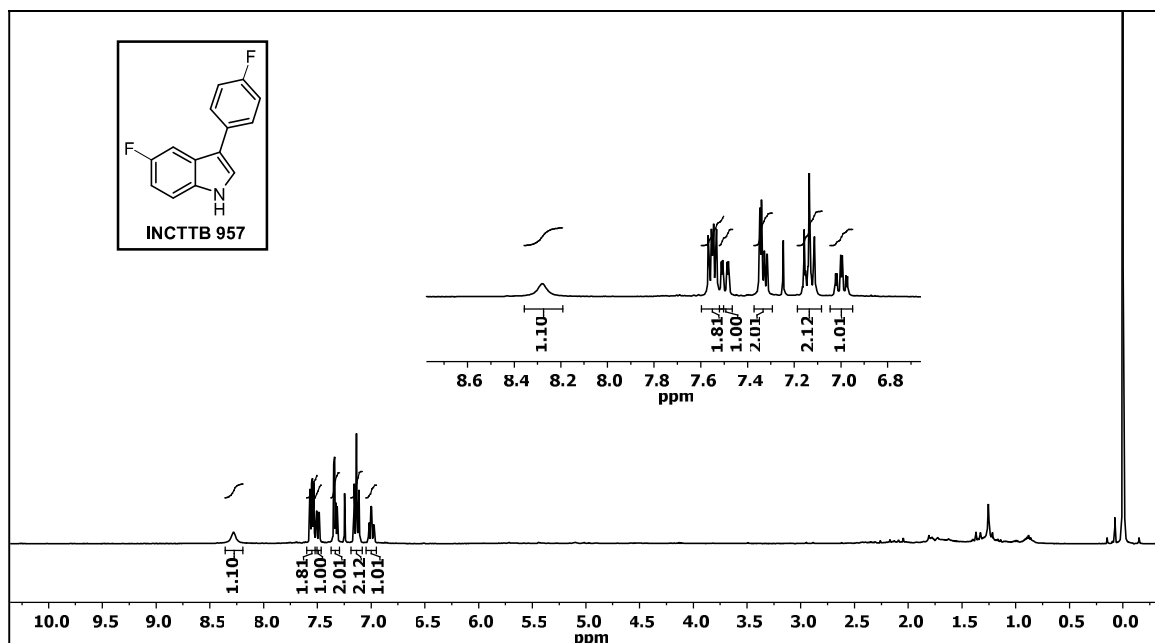


Figure S14 – ¹H NMR spectrum of compound 30.

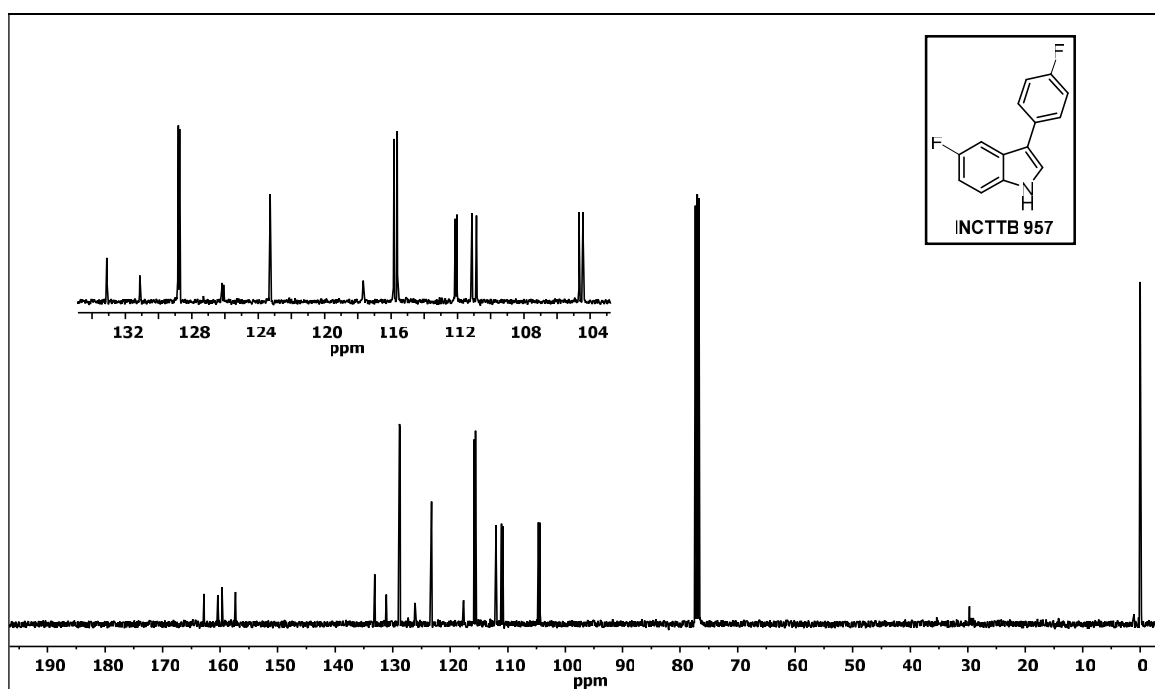


Figure S15 – ¹³C NMR spectrum of compound 30.

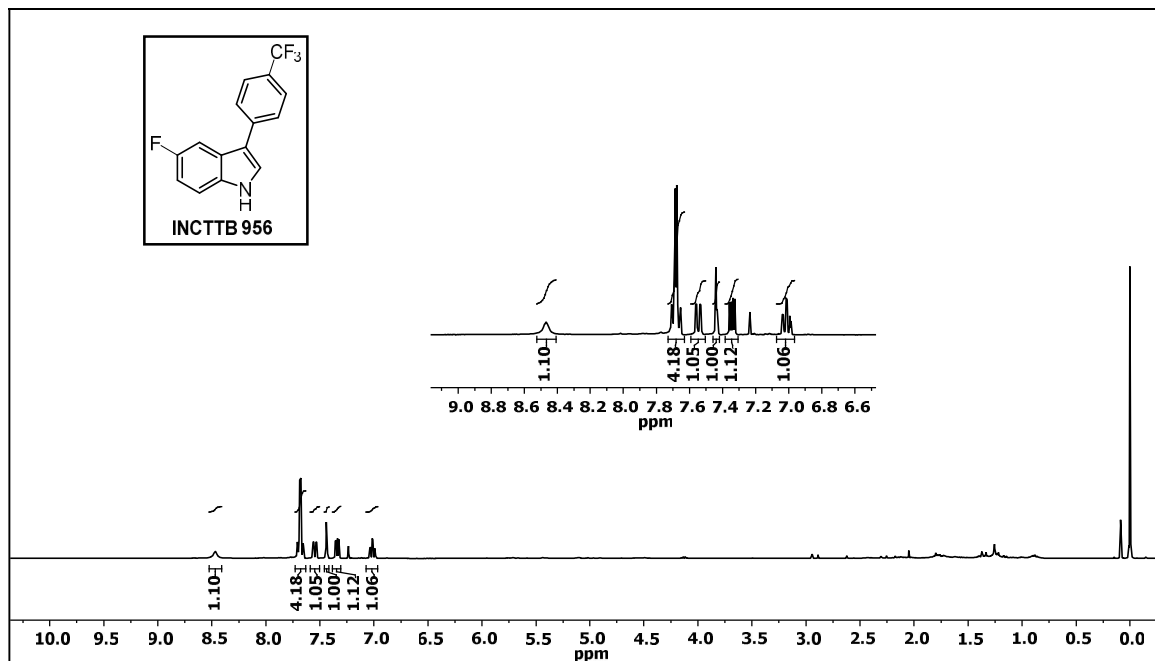


Figure S31 – ^1H NMR spectrum of compound 3p.

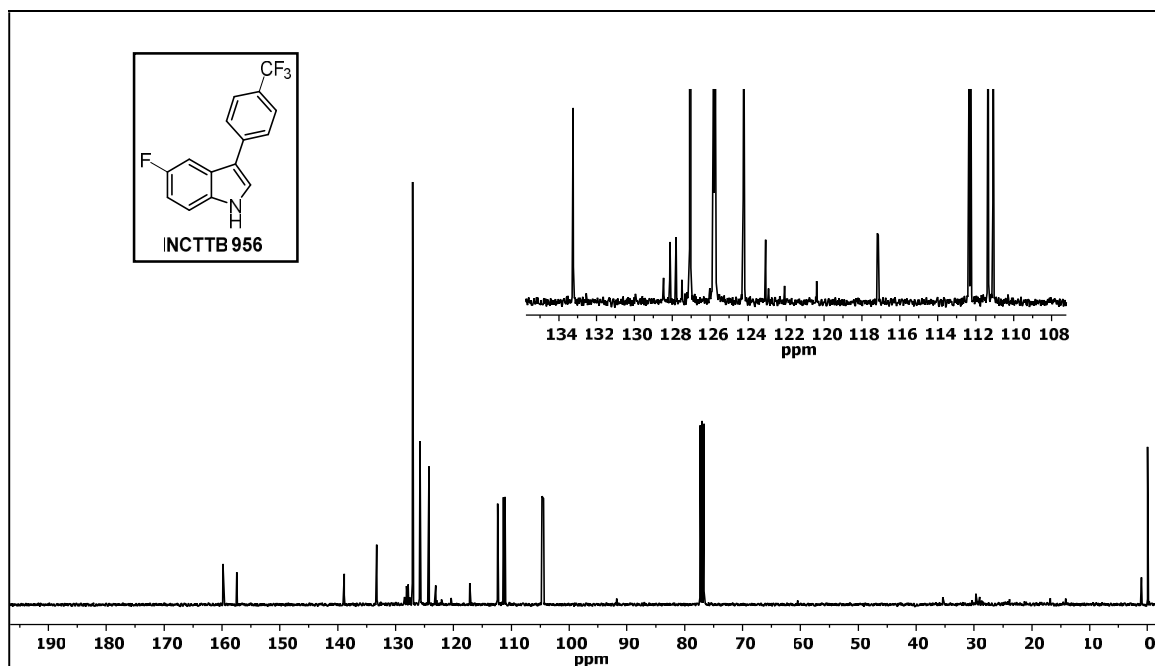


Figure S32 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3p.

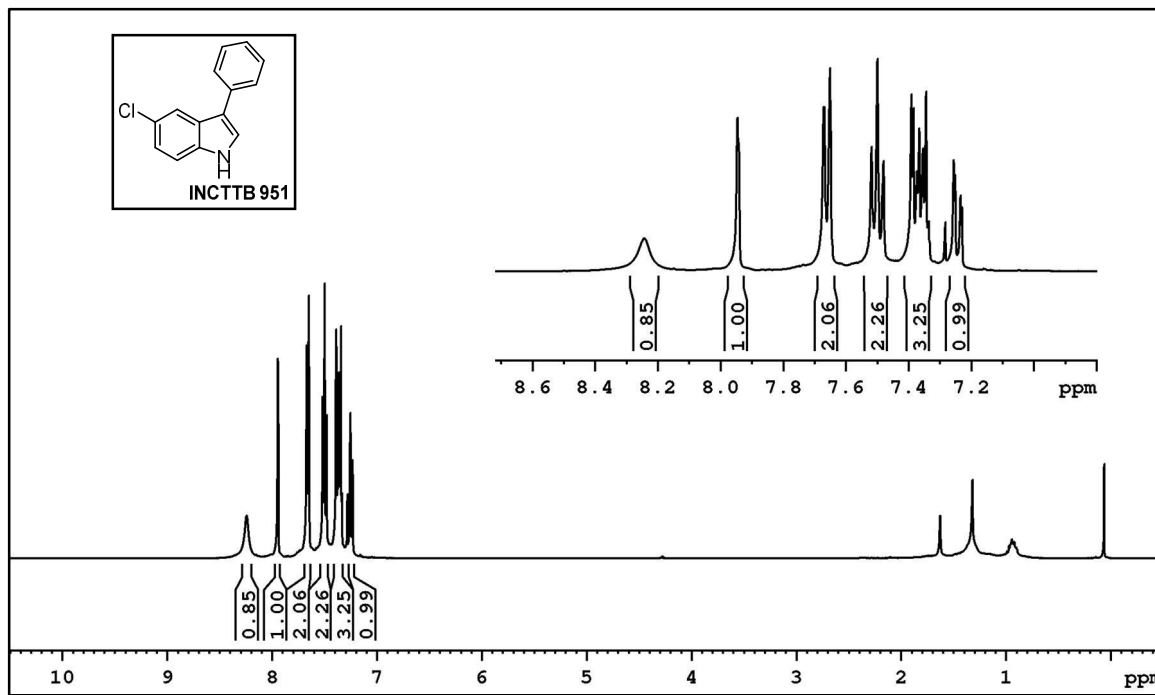


Figure S33 – ^1H NMR spectrum of compound 3q.

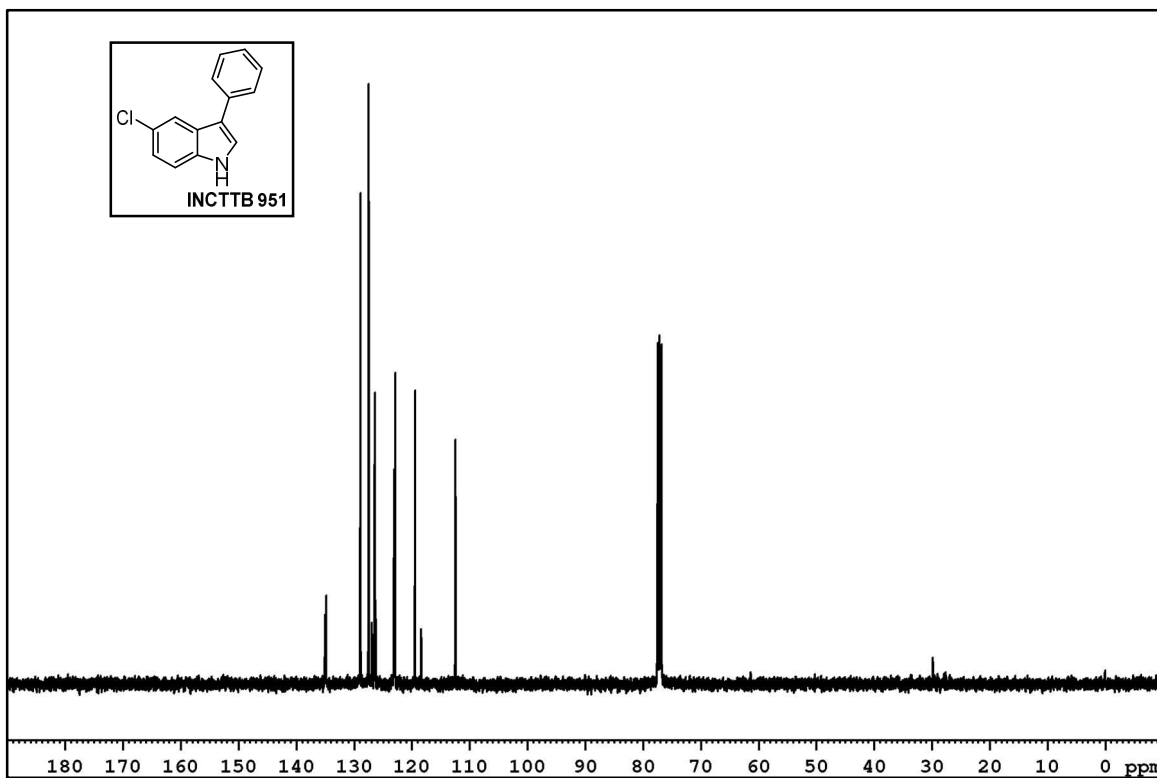


Figure S34 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3q.

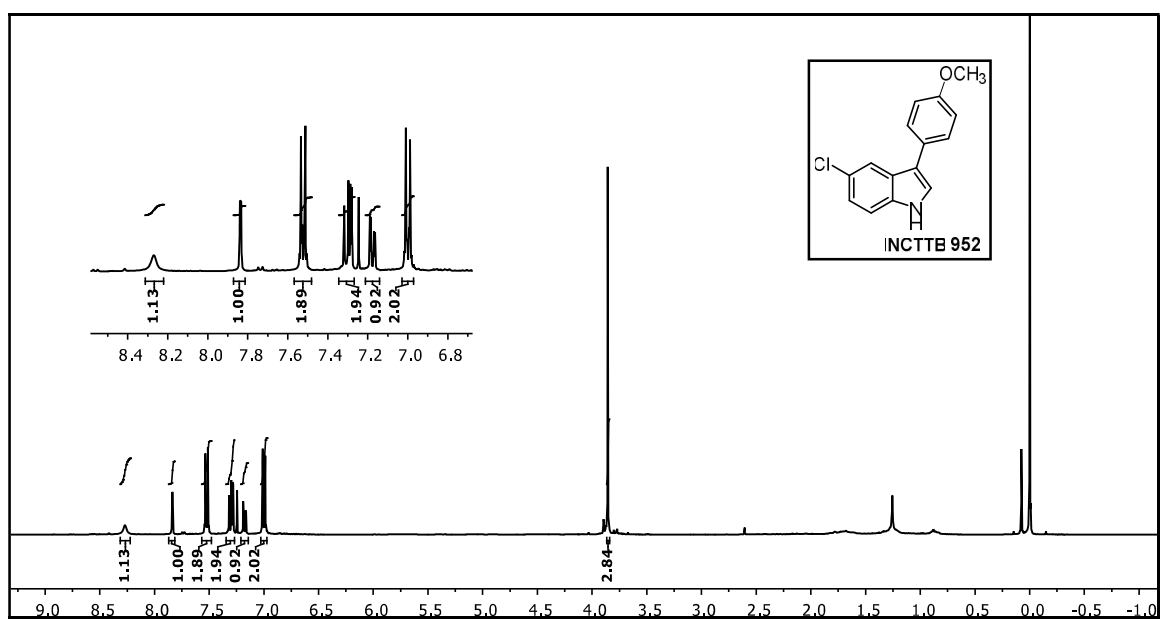


Figure S35 – ^1H NMR spectrum of compound 3r.

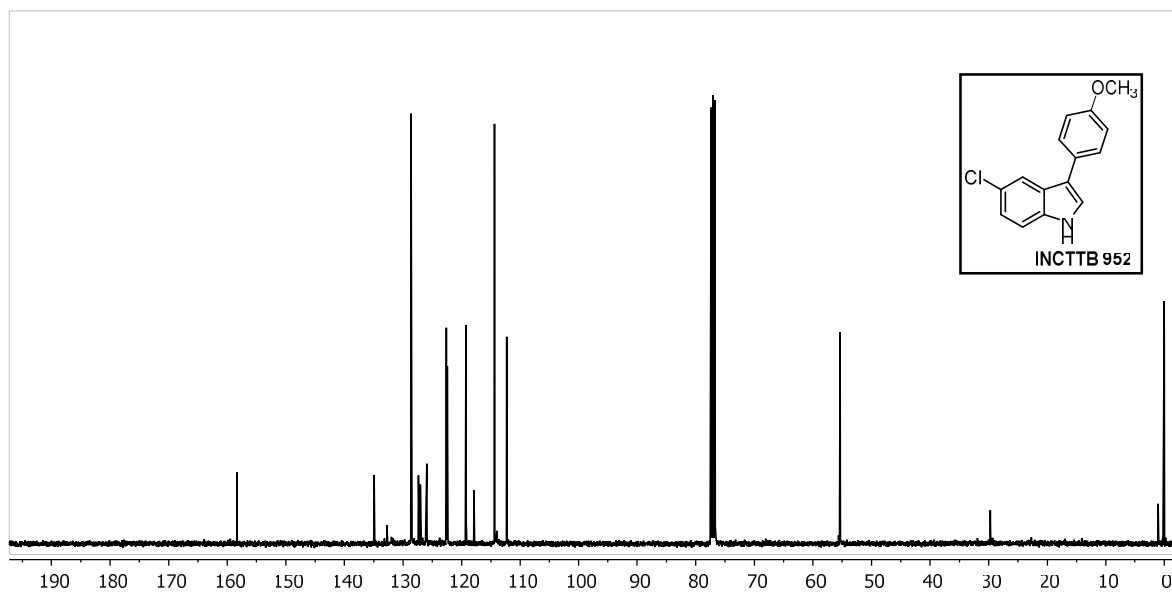


Figure S36 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3r.

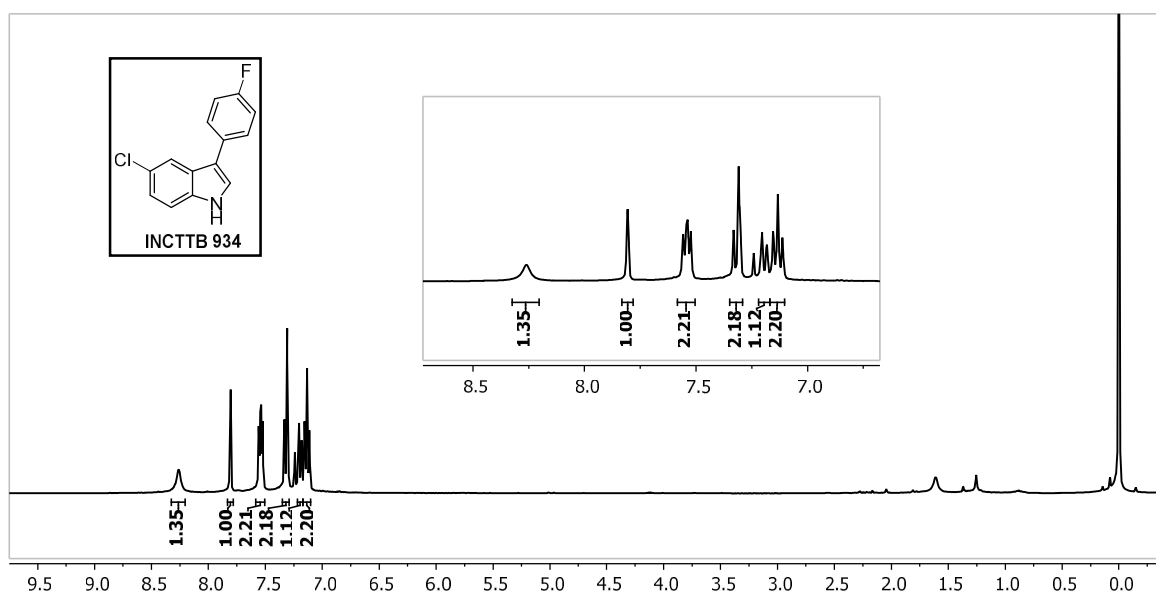


Figure S37 – ^1H NMR spectrum of compound 3s.

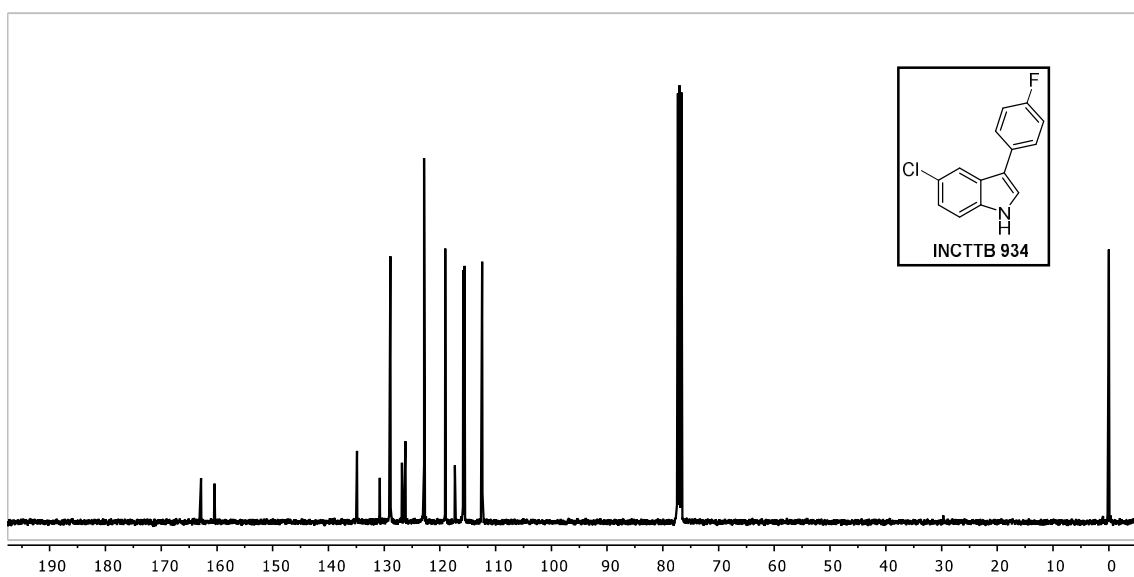


Figure S38 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3s.

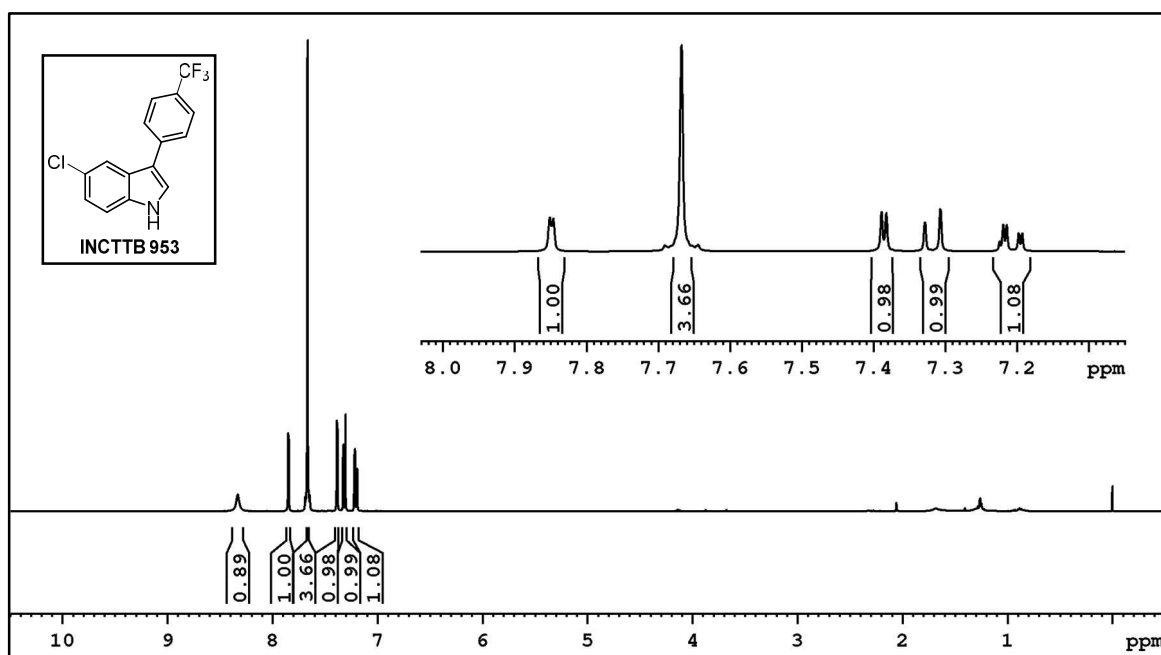


Figure S39 – ^1H NMR spectrum of compound 3t.

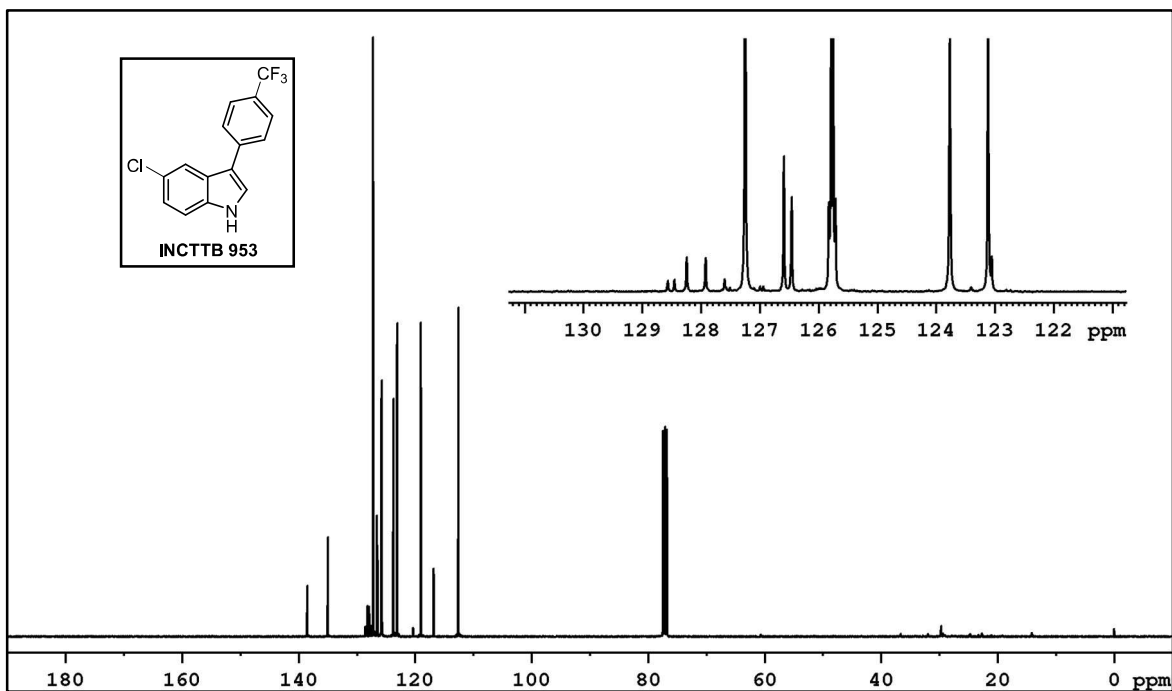


Figure S40 – ^{13}C NMR spectrum of compound 3t.

4. Considerações Finais

O desenvolvimento de novos fármacos é fundamental e urgente para conter o avanço da tuberculose no mundo, ainda mais em cenário de pandemia da COVID-19, cujos efeitos ainda não são totalmente conhecidos. A coinfeção com HIV e o crescente número de cepas resistentes, faz com que seja necessária a identificação de moléculas com novos alvos terapêuticos, que sejam de baixo custo, com terapias mais simples e efeitos adversos menos tóxicos, na tentativa de garantir o sucesso do tratamento.

Nesse contexto, no presente trabalho uma classe de 3-*aril-1H*-indóis foi sintetizada, caracterizada e sua possível atividade antimicobacteriana foi avaliada. A etapa de síntese foi realizada no laboratório de química do centro de pesquisas em biologia molecular e funcional (CPBMF). Esta etapa é fundamental para a utilização da estratégia de desenvolvimento de novos fármacos baseada na triagem fenotípica (*phenotypic screening*). Conforme já citado, dentre os componentes principais desta estratégia estão: biblioteca de compostos; ensaios de triagem baseados em células; e métodos para identificar o mecanismo de ação dos compostos.

No estudo da atividade dos compostos 3-*aril-1H*-indóis, determinamos a concentração inibitória mínima (MIC) contra cepa laboratorial H37Rv e cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*. Os compostos mais efetivos da série (compostos *hits*) foram os compostos **3h**, **3n**, **3r** e **3t**, com valores de MIC inferiores a 20 μ M. Foram obtidas respostas quanto às características de citotoxicidade e genotoxicidade dos compostos *hits*, em que o composto **3r** não foi capaz de afetar a viabilidade de células das linhas HepG2 e Vero (com CC_{50} superior a 30 μ M), bem como não foi capaz de gerar danos ao DNA no ensaio do cometa alcalino utilizando a linhagem HepG2. Foi realizado também o ensaio da curva *Time-kill*, para determinação da cinética de morte do composto **3r** e sua concentração bactericida mínima (MBC), além da aplicação de uma modelagem matemática para prever dados de farmacodinâmica. O MBC obtido para o composto **3r** foi de 2XMIC (40 μ M) e a cinética de morte foi dependente do tempo. A modelagem Farmacodinâmica utilizada avaliou os parâmetros de taxa de crescimento, MIC farmacodinâmico e coeficiente de Hill (que avalia a resposta

da cultura em relação ao aumento da concentração do composto com atividade inibitória). Os resultados obtidos na modelagem foram satisfatórios e corroboram os dados obtidos na *Time-kill*, com valores de MIC semelhantes e coeficiente de Hill compatível a compostos com cinética de morte dependente do tempo.

De maneira geral, os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios e os compostos 3-aril-1*H*-indóis demonstraram um efeito inibitório interessante, com atividade contra cepa sensível e cepas MDR, sem resistência cruzada; um dos compostos demonstrou ausência de toxicidade aparente e ausência de genotoxicidade; *Time-kill* e de modelo farmacodinâmico demonstraram que essa molécula tem atividade bactericida, com um comportamento dependente do tempo. Portanto, Essa classe de moléculas pode ser candidata ao desenvolvimento de novos fármacos anti-TB, despertando interesse para trabalhos futuros.

Uma etapa muito importante desta abordagem de triagem fenotípica para o desenvolvimento de novos fármacos, consiste na geração de mutantes espontâneos de *Mtb*, expostos a altas concentrações de composto com atividade inibitória, seguido pelo sequenciamento completo do genoma das bactérias mutantes, com objetivo de elucidar o mecanismo de ação da atividade antimicobacteriana dessa classe química. Este ensaio está entre as perspectivas futuras deste projeto, bem como a otimização do composto **3r**.

REFERÊNCIAS

Anastasia Koch and Valerie Mizrahi. *Mycobacterium tuberculosis*. Trends in Microbiology, Volume 26, Issue 6, 2018, Pages 555-556, ISSN 0966-842X, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.012>.

Anil Koul, Eric Arnoult, Nacer Lounis, Jerome Guillemont and Koen Andries. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*. 469: 483-490. 2011.

Ashley J. Jacobs, Juthathip Mongkolsapaya, Gavin R. Screaton, Helen McShane, Robert J. Wilkinson. Antibodies and tuberculosis. *Tuberculosis* 101: 102-113. 2016.

Bavesh Davandra Kana, Petros C. Karakousis, Tanya Parish, Thomas Dick, Future target-based drug discovery for tuberculosis. *Tuberculosis*, Volume 94, Issue 6, 2014. Pages 551-556, ISSN 1472-9792. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.10.003>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil. 2ª edição. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Indicadores operacionais da tuberculose no Brasil e a covid-19: análise comparativa dos anos de 2019 e 2020. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico de Tuberculose. 2021.

C.J. Cambier, Stanley Falkow and Lalita Ramakrishnan. Host Evasion and Exploitation Schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 159, 18, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.024>.

Cláudio Nunes-Alves, Matthew G. Booty, Stephen M. Carpenter, Pushpa Jayaraman, Alissa C. Rothchild and Samuel M. Behar. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nature Reviews. Microbiology* Volume 12. 2014.

Dal Molin, M., Selchow, P., Schäfle, D. et al. Identification of novel scaffolds targeting *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Med*. 97, 1601–1613, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01840-7>.

D. Visca, C.W.M. Ong, S. Tiberi, R. Centis, L. D'Ambrosio, B. Chenc, J. Mueller, P. Mueller, R. Duartej, M. Dalcolmol, G. Sotgiu, G.B. Migliori, D. Goletti. Tuberculosis and COVID-19 interaction: A review of biological, clinical and public health effects. *Pulmonology* 27, 151-165, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2020.12.012>.

E. Cambau and M. Drancourt. Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, 1882. *Clinical Microbiology and Infection*. 20: 196-201. 2014.

Gangireddy Sujeevan Reddy, Manojit Pal. Indole derivatives as anti-tubercular agents: An overview on their synthesis and biological activities. *Curr Med Chem*. 2020 Sep 18. doi: 10.2174/0929867327666200918144709.

Giampietro Sgaragli, Maria Frosini, Silvana Saponara and Federico Corelli. Human Tuberculosis. III. CUrrent and Prospective Approaches in Anti-Tubercular Therapy. *Current Medicinal Chemistry*. 23: 2245-2274. 2016.

Houben RMGJ, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLoS Med* 13(10): e1002152. 2016. doi:10.1371/journal.pmed.100215.

<https://www.newtdrugs.org/pipeline/compound>

Inoue K, Kashima S. Association of the past epidemic of *Mycobacterium tuberculosis* with mortality and incidence of COVID-19. *PLoS ONE* 16(6): e0253169. 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253169>.

Jineetkumar Gawad e Chandrakant Bonde. Decaprenyl-phosphoryl-ribose 2'-epimerase (DprE1): challenging target for antitubercular drug discovery. *Chemistry Central Journal* (2018) 12:72 <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0441-2>.

Karen Magdalena Garcia-Rodriguez, Estela Isabel Bini, Armando Gamboa-Domínguez, Clara Inés Espitia-Pinzón, Sara Huerta-Yopez, Silvia Bulfone-Paus & Rogelio Hernández-Pando. Differential mast cell numbers and characteristics in human tuberculosis pulmonary lesions. *Scientific Reports*. 2021. 11:10687. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89659-6>.

Kesego Tapela, Charles Ochieng' Olwal & Osbourne Quaye. Parallels in the pathogenesis of SARS-CoV-2 and *M. tuberculosis*: a synergistic or antagonistic alliance? *Future Microbiol.* (2020) 15(18), 1691–1695 ISSN 1746-0913 Doi:10.2217/fmb-2020-0179.

Kevin Pethe; Pablo Bifani and Jaeseung Kim. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature Medicine* volume 19, pages1157–1160. 2013

Lalita Ramakrishnan. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Immunology – Nature reviews*. 12: 352-366. 2012.

Luies L, du Preez I. 2020. The echo of pulmonary tuberculosis: mechanisms of clinical symptoms and other disease-induced systemic complications. *Clin Microbiol Rev* 33. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-20>.

Madhukar Pai, Marcel A. Behr, David Dowdy, Keertan Dheda, Maziar Divangahi, Catharina C. Boehme, Ann Ginsberg, Soumya Swaminathan, Melvin Spigelman,

Mario C Raviglione and Mukund W Uplekar. WHO's new Stop TB Strategy. *Lancet*. 367: 952–55. 2006.

Mohd Adil Shareef, Hemshikha Rajpurohit, K. Sirisha, Ibrahim Bin Sayeed, Irfan Khan, Manasa Kadagathur, Thipparapu Ganapathi, C. Ganesh Kumar, Ahmed Kamal, and Bathini Nagendra Babu. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Substituted (1-(4-chlorobenzyl)-1H-indol-3-yl) 1H-(1,2,3-triazol-4-yl) methanones as Antifungal Agents. *ChemistrySelect* 2019, 4, 2258 –2266. DOI: 10.1002/slct.201803572.

Monica Demurtas, Anna Baldisserotto, Ilaria Lampronti, Davide Moi, Gianfranco Balboni, Salvatore Pacifico, Silvia Vertuani, Stefano Manfredini, Valentina Onnis. Indole derivatives as multifunctional drugs: Synthesis and evaluation of antioxidant, photoprotective and antiproliferative activity of indole hydrazones. *Bioorganic chemistry* 85 (2019) 568-576. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.007> Received 3 December 2018;

Nagendra Kumar Kaushik, Neha Kaushik, Pankaj Attri, Naresh Kumar, Chung Hyeok Kim, Akhilesh Kumar Verma and Eun Ha Choi. Biomedical Importance of Indoles. *Molecules* 2013, 18, 6620-6662; doi:10.3390/molecules18066620.

Norimitsu Hariguchi, Xiuhao Chen, Yohei Hayashi, Yoshikazu Kawano, Mamoru Fujiwara, Miki Matsuba, Hiroshi Shimizu, Yoshio Ohba, Izuru Nakamura, Ryuki Kitamoto, Toshio Shinohara, Yukitaka Uematsu, Shunpei Ishikawa, Motohiro Itotani, Yoshikazu Haraguchi, Isao Takemura, Makoto Matsumoto. OPC-167832, a novel carbostyryl derivative with potent anti tuberculosis activity as a DprE1 inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2020. doi:10.1128/AAC.02020-19.

Padmini Salgame, Carolina Geadas, Lauren Collins, Edward Jones-López, Jerrold J. Ellner. Latent tuberculosis infection – Revisiting and revising concepts. *Tuberculosis*. 95: 373-384. 2015.

Pedro Eduardo Almeida da Silva and Juan Carlos Palomino. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66: 1417-1430. 2011.

Prefeitura Municipal de Porto Alegre, Indicadores da Tuberculose. Junho de 2021. <https://pentaho-pmpa.procempa.com.br/pentaho/api/repos/%3Apublic%3ASMS%3AIndicadores%3ATuberculose%3Atuberculose.wcdf/generatedContent>. (Acessado em 12 de Julho de 2021).

R. Singh, S. P. Dwivedi, U. S. Gaharwar, R. Meena, P. Rajamani and T. Prasad. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Applied Microbiology*. 2019. Doi: 10.1111/jam.14478.

Rebeca Bailo, Apoorva Bhatt, José A. Aínsa. Lipid transport in *Mycobacterium tuberculosis* and its implications in virulence and drug development. *Biochemical Pharmacology*. 96: 159-167. 2015.

Santos FLd, Souza LLL, Bruce ATI, Crispim JdA, Arroyo LH, Ramos ACV, et al. Patients' perceptions regarding multidrug-resistant tuberculosis and barriers to seeking care in a priority city in Brazil during COVID-19 pandemic: A qualitative

study. PLoS ONE 16(4): e0249822. 2021).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249822>.

Sarentha Chetty, Muthusamy Ramesh, Ashona Singh-Pillary, Mahmoud E. D. Soliman. Recent advancements in the development of anti-tuberculosis drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 27: 370-386. 2017.

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. Informe Epidemiológico: Tuberculose. 2019. Programa Estadual de Controle da Tuberculose – PECT/RS Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Hospital Sanatório Partenon. 2019.

Sobia Tariq, Abdul Rauf Raza, Muhammad Khalid, Syeda Laila Rubab, Muhammad Usman Khan, Akbar Ali, Muhammad Nawaz Tahir, Ataulpa Albert Carmo Braga. Synthesis and structural analysis of novel indole derivatives by XRD, spectroscopic and DFT studies. *Journal of Molecular Structure* 1203. 2020.

S. T. Cole, R. Brosch, J. parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry III, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Kroghs, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quali, M.-A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead & B. G. Barrell. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393: 537-544. 1998.

Thomas M. Daniel. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*. 100: 1862-1870. 2006.

U.S. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention Division of Tuberculosis Elimination. Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis. Atlanta, Georgia 2019.

Vadim Makarov and Katarína Mikušová. Development of Macozinone for TB treatment: An Update. *Appl. Sci*. 2020, 10, 2269; doi:10.3390/app10072269.

Vinayak Singh and Valerie Mizrahi. Identification and validation of novel drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Drug Discovery Today* Volume 22, Number 3. 2017.

World Health Organization (WHO). Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. 2014.

World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report, 2015.

World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report, 2016.

World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report, 2017.

World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report, 2020.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br