

**DERIVADOS DE TIOUREIAS COM ATIVIDADE
ANTIMICOBACTERIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA COMO
ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO ADJUVANTE DA
TUBERCULOSE PULMONAR SEVERA**

SANDERSON DIAS CALIXTO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO - 2022**

**DERIVADOS DE TIOUREIAS COM ATIVIDADE
ANTIMICOBACTERIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA COMO
ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO ADJUVANTE DA
TUBERCULOSE PULMONAR SEVERA**

SANDERSON DIAS CALIXTO

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.”

Orientadora: Dr^a Michelle Frazão Muzitano

Coorientadora: Dr^a Thatiana Lopes Biá Ventura Simão

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MARÇO - 2022

**DERIVADOS DE TIOUREIAS COM ATIVIDADE
ANTIMICOBACTERIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA COMO
ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO ADJUVANTE DA
TUBERCULOSE PULMONAR SEVERA**

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.”

Aprovada em 29 de março de 2022

Comissão examinadora:



Dr^a Paula Alvarez Abreu – UFRJ
Doutora em Neurociências



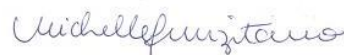
Dr^a Valdirene Moreira Gomes – UENF
Doutora em Ciências Biológicas



Dr^a Elena Lassounskaia - UENF
Doutora em Imunologia



Dr^a Thatiana Lopes Biá Ventura Simão – UFRJ
Doutora em Biociências e Biotecnologia
Coorientadora



Dr^a Michelle Frazão Muzitano – UFRJ
Doutora em Química de Produtos Naturais
Orientadora

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia do Reconhecer, do Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob a orientação da Dr^a Michelle Frazão Muzitano e coorientação da Dr^a Thatiana Lopes Biá Ventura Simão.

Apoio:

- UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
- FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Com os olhos marejados e com uma imensa saudade, dedico esta
Tese à minha avó Maria (*in memoriam*).
Obrigado por todo carinho e amor que me destinou. TE AMO!

Agradecimentos

Encerro a etapa mais importante da minha vida acadêmica e o momento mais esperado nos últimos onze anos. Não tenho palavras que possam expressar o quanto me sinto grato neste momento. Gostaria de agradecer a cada um que, de alguma forma, contribuiu para que eu chegasse até aqui.

Agradeço a Deus, por me dar coragem para enfrentar os desafios do dia-a-dia e por ser fonte de conforto durante os momentos de alegria e tristeza.

A UENF, por me acolher durante todos esses anos, por me proporcionar grandes experiências e me transformar como pessoa e profissional.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Michelle Muzitano, por me aceitar em seu grupo de pesquisa quando eu ainda era um estudante do ensino médio, por todo o incentivo, por encorajar-me e por acreditar em mim e no meu trabalho.

A Dr^a Thatiana Simão, por todo o ensinamento, conselhos, incentivo, colaboração, orientação e amizade. Além de uma grande parceira profissional, uma amiga e conselheira. Obrigado por suas palavras de encorajamento, pelo tempo a mim dedicado e por muitas vezes, fazer além do que estava ao seu alcance. Você foi fundamental para o meu processo de formação, além de ser fonte de inspiração. MUITO OBRIGADO!

A Prof^a Elena Lassounskaia, por colaborar na realização desse projeto e pelo tempo a mim destinado durante a minha formação acadêmica.

As professoras Dr^a Paula Alvarez Abreu, Dr^a Valdirene Moreira Gomes e Dr^a Elena Lassounskaia por terem aceitado participar da minha banca de defesa de Tese de Doutorado.

As professoras Dr^a Érica de Oliveira Mello e Dr^a Denise Oliveira Guimarães, por aceitarem ser suplente da minha banca de defesa.

Ao Dr^o Fabrício Almeida, por aceitar ser o revisor da minha Tese. Suas contribuições foram importantes para o manuscrito.

Ao professor Dr^o Eulógio de Carvalho do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal e toda a sua equipe, pelo auxílio no processamento do material histológico.

Ao professor Dr^o Lúcio Mendes Cabral e Dr^o Gil Mendes Viana do Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica e toda sua equipe, pela síntese dos derivados de Tioureias.

A professora Dr^a Alessandra Souza e ao Dr^o Marcos Palmeira-Mello do Laboratório de Modelagem Molecular, pela colaboração nos estudos *in silico*.

Aos técnicos: Fernando César, Juliana Azevedo, Núbia Alencar, Rita Escocard e Verônica Lanes por todo o auxílio e ensinamento durante esses anos.

Ao Vinícius Mussi, por toda a ajuda, incentivo, parceria e risadas que me proporciona, além de compartilhar os árduos dias de experimento. Com certeza um grande amigo que ganhei durante a pós-graduação.

Ao grupo “Therapy”: Ana Clara Lopes, Camila Couto, Guilherme Sales, Thatiana Simão, Vinícius Mussi e Yasmin Viana por toda ajuda nos experimentos, seminários de resultados e artigos, festas surpresas, conversas paralelas e lanches da tarde. Com vocês os dias foram mais leves.

Aos amigos que a UENF me deu: Andreza Resende, Fabrício Almeida, Giliane de Souza, Letícia Rabello, Isabela Borges e Marlon Heggdorne por todos os momentos de alegria, aprendizado e risadas.

Aos meus amigos de graduação, aos quais não citarei nomes para não esquecer ninguém. Todos os momentos que passamos juntos estão guardados para sempre em minha memória e em meu coração. C.Bio2011 para sempre!

Aos meus melhores amigos: Érica Oliveira, Thiára Chagas, Pedro Mozzer, Marta Sette, Nadiyah Pinter, Teresa Pontes e Yrexam Ribeiro obrigado por cada momento compartilhado, por cada conselho, incentivo e força para continuar essa caminhada.

Ao Rodrigo Gebara, meu amigo e companheiro. Obrigado por todo incentivo, companheirismo e conselhos.

A minha mãe, Adriana, por encorajar-me a seguir meus sonhos, por toda a confiança, amor e dificuldades enfrentadas para que eu pudesse chegar até aqui, essa vitória também é sua!

Ao meu irmão, Carlos Júnior. Amo você!

Aos meus Tios, Charles, Juliana e Fábio, por todo o incentivo, conselhos e amor.

A minha família, em especial: Artur, Auxiliadora, Letícia e Luisa pelo incentivo e apoio.

Ao projeto Jovens Talentos para as Ciências, por me dar a oportunidade de iniciar na área científica e fazer com que eu descobrisse que era possível chegar até aqui.

A CAPES, pela bolsa de doutorado concedida.

SUMÁRIO

SUMÁRIO DE FIGURA	xii
SUMÁRIO DE TABELA	xv
SUMÁRIO DE ESQUEMAS	xv
LISTA DE ABREVIATURA	xvi
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Micobactérias	22
1.2. A Tuberculose	25
1.3. Infecções pulmonares ocasionadas por <i>Mycobacterium kansasii</i>	27
1.4. Resposta imune e imunopatologia	29
1.4.1. <i>Micobacterium tuberculosis</i>	29
1.4.2. <i>Micobacterium kansasii</i>	34
1.5. Tratamento da tuberculose e de infecções pulmonares causadas por <i>M. kansasii</i>	35
1.6. Tratamento adjuvante direcionado ao hospedeiro	39
1.7. Tioureias	40
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo geral	44
3.2. Objetivos específicos	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1. Obtenção das tioureias	45
4.1.1. Síntese dos derivados de tioureia	45
4.1.2. Preparação de tioureias substituídas 1-21, 23-29	45
4.1.3. Preparação de piperazina tioureias 22, 30-46	45
4.1.4. Caracterização dos derivados de tioureias	46
4.1.4.1. <i>N</i> -benzil- <i>N'</i> -metil- <i>N'</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2,3,4,5,6-pentahidroxi-hexil)tioureia	47
4.1.4.2. <i>N</i> -fenetil- <i>N'</i> -(3,4,5-trimetoxifenil)tioureia	47
4.1.4.3. <i>N</i> -benzil- <i>N'</i> -(2,3-di-hidrobenzo[<i>b</i>][1,4]dioxin-6-il)tioureia	47
4.1.4.4. <i>N</i> -benzil- <i>N'</i> -(2,3-di-hidrobenzo[<i>b</i>][1,4]dioxin-6-il)tioureia	47
4.1.4.5. 4-(1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-il)- <i>N</i> -fenetilpiperazina-1-carbotioamida	48
4.1.4.6. <i>N</i> -fenetil-4-(pirimidin-2-il)piperazina-1-carbotioamida	48

4.1.4.7. <i>N</i> -benzil-4-(pirimidin-2-il)piperazina-1-carbotioamida	48
4.1.4.8. 4-(4-hidroxifenil)- <i>N</i> -fenilpiperazina-1-carbotioamida	49
4.1.4.9. <i>N</i> -benzil-4-(tetrahidrofuran-2-carbonil)piperazina-1-carbotioamida	49
4.1.4.10. <i>N</i> -benzil-4-butilpiperazina-1-carbotioamida	49
4.1.4.11. 4-butil- <i>N</i> -fenilpiperazina-1-carbotioamida	49
4.1.4.12. 4-(2-clorofenil)- <i>N</i> -fenilpiperazina-1-carbotioamida	50
4.1.4.13. <i>N</i> -benzil-4-(2,3,4-trimetoxibenzil)piperazina-1-carbotioamida	50
4.1.4.14. <i>N</i> -fenil-4-(2,3,4-trimetoxibenzil)piperazina-1-carbotioamida	50
4.1.4.15. 4-(4-hidroxifenil)- <i>N</i> -(3,4,5-trimetoxifenil)piperazina-1-carbotioamida....	51
4.2. Cultivo celular e tratamento com os derivados de tioureias	51
4.2.1. Quantificação da produção de NO	51
4.2.2. Avaliação da viabilidade celular em cultura de macrófagos	52
4.2.3. Quantificação da produção das citocinas TNF- α e IL-1 β	53
4.2.4. Avaliação da atividade antioxidante	53
4.2.5. Avaliação da capacidade dos derivados de tioureia inibirem a expressão enzimática da iNOS	54
4.3. Cultivo micobacteriano	55
4.3.1. Ajuste da concentração micobacteriana	56
4.3.2. Avaliação da atividade antimicobacteriana	56
4.3.3. Infecção da cultura de macrófagos, tratamento com os derivados de tioureias e quantificação do crescimento micobacteriano intracelular ...	57
4.3.4. Avaliação do potencial inibitório dos derivados de tioureia na viabilidade de agregados extracelulares de <i>M. tuberculosis</i>	57
4.4.1. Relação estrutura-atividade e estudos <i>in silico</i> de ADMET	58
4.5. Infecção experimental de camundongos C57Bl/6 com cepa Mtb de hipervirulência	59
4.5.1. Tratamentos e grupos experimentais	60
4.5.2. Obtenção de células pulmonares e dos bacilos e análises de mediadores inflamatórios produzidos por estas células <i>ex vivo</i>	61
4.5.3. Análise macroscópica e histopatológica do pulmão	62
4.5.4. Método de coloração com Hematoxilina-Eosina (H&E)	62
4.5.5. Método de Ziehl-Neelsen	63
4.5.6. Análise morfométrica do tecido pulmonar	63
4.6. Análise fenotípica do infiltrado celular pulmonar	64
4.7. Análise estatística.....	64

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1. Síntese de tioureias	66
5.2. Efeito dos derivados de tioureia no crescimento de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv em cultura bacteriana, na produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS e avaliação da citotoxicidade	69
5.3. Relação estrutura-atividade	73
5.4. Efeito dos derivados de tioureia no NO liberado a partir do SNP e na expressão da iNOS em macrófagos estimulados por LPS	76
5.5. Efeito inibitório dos derivados de tioureia na produção de TNF- α e IL-1 β em macrófagos estimulados por LPS	78
5.6. Efeito dos derivados de tioureias no crescimento da cepa hipervirulenta <i>M. tuberculosis</i> M299 em cultura bacteriana	80
5.7. Efeito dos derivados de tioureia no crescimento intracelular e na viabilidade de agregados extracelulares de Mtb	81
5.8. Estudos farmacocinéticos e toxicológicos <i>in silico</i>	84
5.9. Avaliação do potencial inibitório dos derivados de tioureias no crescimento de cepas <i>M. kansasii</i>	88
5.10. Avaliação do efeito dos derivados de tioureias no crescimento bacteriano nos pulmões dos camundongos infectados	91
5.10.1. Avaliação do efeito dos derivados de tioureias na patologia dos pulmões de camundongos infectados	94
5.10.2. Análise fenotípica das células inflamatórias nos pulmões dos camundongos infectados e tratados com os derivados de tioureias 28 e 29	101
5.10.3. Análise do perfil de mediadores inflamatórios produzidos <i>ex vivo</i> pelas células dos pulmões dos camundongos infectados tratados com os derivados de tioureias 28 e 29	107
6. CONCLUSÕES.....	111
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
8. ANEXO	134
8.1. Anexo 1. Comissão de ética de uso de animais	134
8.2. Anexo 2. Artigo publicado	135
8.3. Anexo 3. Cromatogramas	136

SUMÁRIO DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da parede celular micobacteriana	24
Figura 2. Representação gráfica da taxa de incidência de tuberculose no mundo no ano de 2020	26
Figura 3. Representação esquemática da sequência de eventos posterior à infecção por <i>M. tuberculosis</i> e a progressão da doença	30
Figura 4. Representação esquemática da resposta imune desencadeada durante a tuberculose	31
Figura 5. Imagem representativa da estrutura do granuloma na TB. O recrutamento de macrófagos ativados, outros leucócitos e células T e B para o pulmão, conduz à formação do granuloma.	33
Figura 6. Estrutura química dos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento convencional da tuberculose	36
Figura 7. Estrutura química de alguns fármacos de segunda linha utilizados no tratamento da TB resistente	37
Figura 8. Estrutura química dos fármacos de segunda linha utilizados no tratamento de casos resistentes de infecção pulmonar por <i>M. kansasii</i>	38
Figura 9. Estrutura química dos fármacos glicocorticoides	40
Figura 10. Estrutura química do grupo funcional uréia e tioureia	41
Figura 11. Esquema da rota sintética mais utilizada para obtenção de tioureias	42

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 12. Estrutura química do inibidor não seletivo da NOS, L-MMMA	52
Figura 13. Estrutura química do nitroprussiato de sódio e do flavonoide rutina	54

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 14. Análise geral de SAR proposta para os derivados de tioureia de acordo com MIC ₅₀ obtido contra <i>Mtb</i> H37Rv em ensaio <i>in vitro</i>	74
--	----

Figura 15. Distribuição do coeficiente LUMO, densidade e mapa do potencial eletrostático molecular (MEP) das tioureias mais promissoras contra cepas de Mtb	75
Figura 16. Efeito dos derivados de tioureias na inibição da produção de NO avaliado através da capacidade de sequestro deste radical livre pelo método de SNP (A) ou da inibição da expressão da enzima iNOS em macrófagos RAW264.7	77
Figura 17. Efeito inibitório de derivados de tioureia na produção de TNF- α e IL-1 β em macrófagos estimulados por LPS	79
Figura 18. Efeito dos derivados de tioureia no crescimento intracelular de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv em macrófagos (A) e na viabilidade de agregados extracelulares de <i>M. tuberculosis</i> M299 (B)	83
Figura 19. Efeito do tratamento com os derivados de tioureias 28 e 29 ou rifampicina no crescimento micobacteriano nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados	93
Figura 20. Efeito do tratamento com os derivados de tioureias 28 e 29 ou rifampicina na macropatologia pulmonar induzida nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa de Mtb hipervirulenta	96
Figura 21. Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados (30 dias de infecção) sem tratamento ou sob tratamento por 15 dias com os derivados de tioureias 28 e 29 ou rifampicina	99
Figura 22. Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados (45 dias de infecção) sem tratamento ou sob tratamento por 30 dias com os derivados de tioureias 28 e 29 ou rifampicina	100
Figura 23. Análise morfométrica da área de pneumonia nos pulmões dos animais infectados sobre efeito do tratamento com os derivados de tioureias 28 e 29 ou rifampicina	101
Figura 24. - Dot plots representativos da definição das regiões selecionadas para imunofenotipagem das células mieloides obtidas do pulmão do animal infectado através da citometria de fluxo	102

Figura 25. Análise fenotípica do infiltrado celular pulmonar dos animais infectados pela cepa de Mtb hipervirulenta M299 sobre efeito do tratamento com os derivados de tioureias 28 e 29 ou rifampicina	106
Figura 26. Análise da produção de citocinas e de óxido nítrico pelas células pulmonares dos animais infectados com a cepa de Mtb hipervirulenta M299 e tratados com a tioureia 28 e 29 e rifampicina	109

SUMÁRIO DE TABELAS

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Condições de reação e rendimentos para tioureias 1-21, 23-29	68
Tabela 2. Condições de reação e rendimentos para tioureias 22, 30-46	69
Tabela 3. Efeitos inibitórios dos derivados de tioureia no crescimento de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv em cultura bacteriana, na produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS e avaliação da citotoxicidade	72
Tabela 4. Atividade antimicobacteriana contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e M299 (MIC ₅₀ em µM), energias HOMO e LUMO (eV) e cargas atômicas parciais obtidas	75
Tabela 5. Concentração inibitória 50% (IC ₅₀) dos derivados tioureias na produção de TNF-α e IL-1β em macrófagos estimulados por LPS	80
Tabela 6. Concentração inibitória mínima de derivados de tioureia contra o crescimento de <i>M. tuberculosis</i> M299 em cultura bacteriana	81
Tabela 7. Parâmetros analisados pela regra dos cinco de Lipinski e propriedades farmacocinéticas moleculares calculadas usando ADMET Predictor™ para os derivados de tioureia promissores	85
Tabela 8. Metabólitos e parâmetros de toxicidade <i>in silico</i> investigados usando ADMET Predictor™	86
Tabela 9. Concentração inibitória mínima (50%) apresentada pelos derivados de tioureias na inibição do crescimento micobacteriano de cepas de <i>M. kansasii</i>	90

SUMÁRIO DE ESQUEMAS

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esquema 1. Estratégia de síntese das tioureias 1-21, 23-29	67
Esquema 2. Estratégia de síntese das tioureias 22, 30-46	67

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ADC** – Albumina, dextrose, catalase
- **ADMET** - Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicologia
- **AG** – Arabinoglicanos
- **AIDS** - Síndrome da imunodeficiência adquirida
- **AINE** - Anti-inflamatório não esteroide
- **ALP** - Fosfatase alcalina
- **ALT** - Alanina transaminase sérica
- **APC** – Células apresentadoras de antígeno
- **AST** - Aspartatotransaminase
- **ATCC** – American Type Culture Collection
- **BAAR** – Bacilo álcool-ácido resistente
- **BITC** - Isotiocianato de benzila
- **C-** - Controle negativo
- **C+** - Controle positivo
- **CC₅₀** – Concentração tóxica de 50%
- **CEUA** - Comissão de Ética em Uso Animal
- **CFU** – Unidade formadora de colônia
- **COX-2** – Ciclooxigenase-2
- **CTL** – Controle
- **CYP** - Citocromo P450
- **D.O.** – Densidade óptica
- **DAB** - Diaminobenzidina
- **DMEM-F12** – Meio Eagle em modificação do Dulbecco com suplemento F12
Dulbecco's Modified Eagle Medium
- **DMF** – Dimetilformamida
- **DMSO** - Dimetilsulfóxido
- **DP** – DESVIO PADRÃO
- **EAI** - East African-Indian
- **ELISA** - Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima
- **eV** - Valores de energia
- **GGT** - gama-glutamilttransferase

- **H&E** - hematoxilina-eosina
- **HBA** - Número de grupos doadores/aceptores de ligações de hidrogênio
- **HBD** - Número de grupos doadores de ligações de hidrogênio
- **HDT** – Terapia direcionada ao hospedeiro
- **HEPAT** - hepatotoxicidade
- **HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- **HOMO** - Orbital molecular de maior energia ocupado por elétrons
- **i.p.** - Intraperitoneal
- **i.t.** - Intratraqueal
- **IC50** – Concentração inibitória necessária para metade da atividade máxima.
- **IFN-γ** – Interferon-gama
- **Ig** - Imunoglobulina
- **IL** – Interleucina
- **INF-γ**- Interferon gama
- **INH** – Isoniazida
- **iNOS** – Óxido nítrico sintase induzida
- **IPCL** - Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
- **KBr** - Brometo de potássio
- **kDa** - Quilodalton
- **LAM** - Latin American-Mediterranean
- **LDH** - lactato desidrogenase
- **L-NMMA** - N^G-acetato de monometil-L-arginina
- **LogP** - Lipofilicidade
- **Lox** - Lipo-oxigenase
- **LPS** – Lipopolissacarídeo
- **LUMO** - Orbital molecular de menor energia não ocupado por elétrons
- **MDR-TB** - Tuberculose multidroga-resistente
- **MEPS** - Mapas de potencial eletrostático molecular
- **MHC** – Complexo principal de histocompatibilidade
- **MIC** - Concentração mínima inibitória
- **Mkan** - *Mycobacterium kansasii*
- **MNT** - Micobactérias não tuberculosas
- **MOI** - Multiplicidade da infecção
- **Mtb** - *Mycobacterium tuberculosis*

- **MTBC** - complexo *Mycobacterium tuberculosis*
- **MTT** – 3-(4, 5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol – sal de tetrazol
- **MUTAGEN** - Mutagenicidade
- **NAD** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- **NF-κB** - Fator nuclear kappa B
- **NK** – Células *natural killer*
- **NO** – Óxido nítrico
- **NOS** - Óxido nítrico sintase
- **OADC** - Ácido oléico, albumina, dextrose, catalase
- **OMS** – Organização Mundial de Saúde
- **PAMPS** - Padrões moleculares associados ao patógeno
- **PAS** – Ácido para-aminosalicílico
- **PBS** - Salina tamponada fosfatada
- **PBST** - Salina fosfatada tamponada acrescida de Tween 20
- **PDB** - Salina fosfatada tamponada
- **PGE₂** - Prostaglandina E₂
- **PGLS** - Glicolípídios fenólicos
- **PIM** - Sulfolípidios e manosídeos de fosfatidilinositol
- **PITC** - Isotiocianato de fenila
- **PZA** – Pirazinamida
- **REPR** - Toxidade reprodutiva
- **RIF** – Rifampicina
- **RLN** - Radicais livres de nitrogênio
- **RLO** – Radicais livres de oxigênio
- **RMN** – Ressonância magnética nuclear
- **RNS** - Espécies reativas de nitrogênio
- **ROS** – Espécies reativas de oxigênio
- **RPMI** – Meio Roswell Park Memorial Institute
- **RRP** - receptores de reconhecimento de padrão
- **SDS** – Dodecilsulfato de sódio
- **SI** – Índice de seletividade
- **SFB** – Soro fetal bovino
- **SNP** – Nitroprussiato de sódio
- **TB** – Tuberculose

- **TDM** - Trealose dimicolato
- **T_H**– Células T Helper
- **TLR** – Receptor Toll-like
- **TNF- α** – Fator de necrose tumoral alfa
- **XDR-Tb** – Tuberculose extensivamente resistente
- **ZN** - Ziehl-Neelsen

RESUMO

O aumento na incidência de cepas *M. tuberculosis* resistentes e de hipervirulência é uma grande ameaça à saúde pública e incentiva a busca por novos fármacos anti-TB. Formas graves de tuberculose (TB) em pacientes hiper-reativos associados à inflamação exacerbada necessitam de terapia adjuvante a fim de reparar ou prevenir os danos necróticos que conduzem à cavitação. Entre as Micobactérias não tuberculosas (MNTs), *M. kansasii* (Mkan) é uma das mais patogênicas, capaz de causar doença pulmonar similar à TB. Cepas de Mkan exibindo alta virulência podem produzir infecção crônica e patologia pulmonar necrótica. Abordagens adjuvantes, como o uso de anti-inflamatórios em adição ao tratamento com antibióticos têm sido incentivado para o tratamento dos casos graves de TB e infecção por MNT. Neste contexto, novas substâncias com ação *dual*, antimicobacteriana e anti-inflamatória, representam uma ferramenta terapêutica promissora, onde os derivados de tioureias descritos por possuírem diversas atividades biológicas podem contribuir. Quarenta e seis derivados de tioureias foram sintetizados e avaliados em *screening* quanto à ação anti-inflamatória, citotoxicidade e atividade antimicobacteriana. Os derivados de tioureias **10**, **15**, **16**, **28** e **29** apresentaram atividade *dual* sendo capazes de inibir a produção de NO, TNF- α , IL-1 β , destacando-se o derivado **28** para IL-1 β , e o **29** para TNF- α . Estes derivados também foram capazes de inibir o crescimento de cepas Mtb laboratorial e hipervirulenta *in vitro*, além de inibir o crescimento de Mtb H37Rv intracelular e de agregados extracelulares de Mtb hipervirulenta, destacando-se as amostras **16**, **28** e **29**. Sete derivados inibiram o crescimento de cepas Mkan de diferentes níveis de virulência, destacando os derivados **2**, **10** e **17**. Os derivados **28** e **29** com maior potencial para ambas as atividades (anti-inflamatória e antimicobacteriana), foram avaliados quanto ao efeito terapêutico no tratamento da TB severa induzida nos camundongos C57Bl/6 por cepa Mtb hipervirulenta. O tratamento com os derivados **28** e **29** durante 2 ou 3 semanas foi capaz de diminuir a área de patologia pulmonar granulomatosa e reduzir o desenvolvimento de áreas necróticas. Em concordância, o tratamento mostrou significativa redução na frequência de leucócitos no pulmão, especialmente de neutrófilos, e diminuiu a produção de citocinas inflamatórias quantificada no sobrenadante da cultura *ex vivo* das células pulmonares. Além disso, foi observada a inibição do crescimento bacilar nos pulmões. Os dados obtidos demonstraram que os derivados de tioureia **28** e em especial **29** é promissor para estudos prospectivos que visam a geração de novos fármacos anti-TB para o tratamento adjuvante da TB grave associada com inflamação exacerbada. Esta foi a primeira descrição destas atividades para os derivados de tioureia, assim como efetivo potencial no tratamento da tuberculose severa em modelo murino.

Palavra-chave: tuberculose, Inflamação, tratamento adjuvante e tioureias.

ABSTRACT

The increase in the incidence of resistant and hypervirulence *M. tuberculosis* strains is a major threat to public health and encourages the search for new anti-TB drugs. Severe forms of tuberculosis (TB) in hyperreactive patients associated with exacerbated inflammation require adjuvant therapy in order to repair or prevent necrotic damage that leads to cavitation. Among the nontuberculous Mycobacteria (NTMs), *M. kansasii* (Mkan) is one of the most pathogenic, capable of causing such lung disease TB. Mkan strains exhibiting high virulence can produce chronic infection and necrotic lung pathology. Adjuvant approaches such as the use of anti-inflammatory drugs in addition to antibiotic treatment have been encouraged for the treatment of severe cases of TB and NTM infection. In this context, new substances with dual action, antimycobacterial and anti-inflammatory, represent a promising therapeutic tool, where thiourea derivatives described for having diverse biological activities can contribute. Forty-six thiourea derivatives were synthesized and evaluated in screening for anti-inflammatory action, cytotoxicity and antimycobacterial activity. The thioureas derivatives **10**, **15**, **16**, **28** and **29** showed dual activity, being able to inhibit the production of NO, TNF- α , IL-1 β , highlighting the derivative **28** for IL-1 β , and **29** for TNF- α . These derivatives were also able to inhibit the growth of laboratory and hypervirulent Mtb strains in vitro, in addition to inhibiting the growth of intracellular Mtb H37Rv and extracellular aggregates of hypervirulent Mtb, especially samples **16**, **28** and **29**. Seven derivatives inhibited growth. Of Mkan strains of different virulence levels, highlighting derivatives **2**, **10** and **17**. Derivatives **28** and **29** with greater potential for both activities (anti-inflammatory and antimycobacterial) were evaluated for the therapeutic effect in the treatment of severe induced TB in C57Bl/6 mice by a hypervirulent Mtb strain. Treatment with derivatives **28** and **29** for 2 or 3 weeks was able to decrease the area of granulomatous lung pathology and reduce the development of necrotic areas. Accordingly, the treatment showed a significant reduction in the frequency of leukocytes in the lung, especially neutrophils, and decreased the production of inflammatory cytokines quantified in the ex vivo culture supernatant of the lung cells. In addition, inhibition of bacillary growth in the lungs was observed. The data obtained demonstrated that thiourea derivatives **28** and especially **29** are promising for prospective studies aimed at the generation of new anti-TB drugs for the adjuvant treatment of severe TB associated with exacerbated inflammation. This was the first description of these activities for thiourea derivatives, as well as their potential effectiveness in the treatment of severe tuberculosis in a murine model.

Key words: tuberculosis, inflammation, adjuvant treatment and thiourea.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Micobactérias

As micobactérias são organismos pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, sendo caracterizadas por serem aeróbicas, em formato de bacilos, imóveis e não esporulados. Algumas espécies se destacam por serem patógenos de importância clínica, tais como *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. ulcerans*, os quais são agentes causadores da tuberculose humana, hanseníase e úlceras de Buruli, respectivamente (TORTOLI, 2006; ORGEUR e BROSCH, 2017).

O gênero *Mycobacterium* é constituído por micobactérias tuberculosas, pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (MTBC), onde está incluso *M. tuberculosis* (Mtb), principal agente etiológico da tuberculose (TB) em humanos (CHAI et al., 2018), e por micobactérias não tuberculosas (MNT), que inclui micobactérias ambientais e oportunistas, destacando as bactérias do complexo *M. avium* e *M. kansasii* (Mkan), a segunda MNT mais comum e potencialmente patogênica a população humana (JOHNSON e ODELL, 2014; GOLDENBERG et al., 2020).

Em geral, as micobactérias apresentam tamanho entre 1 a 10 micrômetros de comprimento e 0,2 a 0,6 micrômetros de largura. São patógenos aeróbicos obrigatório com tempo de replicação que varia entre as espécies, em que as micobactérias de crescimento lento replicam em geral em torno de 18-24 horas em fase logarítmica de crescimento em cultura bacteriana. O crescimento lento dos bacilos e a estratégia de sobrevivência e persistência no interior dos granulomas pode persistir por anos, explicando o desenvolvimento da doença crônica (MURRAY et al., 2010; ORME, 2014; LOSGDON e ALDRIDGE, 2018; COLANGELI et al., 2020).

A parede celular micobacteriana (**Figura 1**) é constituída por uma membrana plasmática circundada por uma camada de peptidoglicano com um espaço periplasmático entre estes. A camada externa da membrana plasmática contém a presença de lipoproteínas, glicolipídios e lipoglicanos (LM e LAM). O núcleo da parede celular consiste de peptidoglicanos covalentemente ligado a arabinogalactanos (AG), que por sua vez estão esterificados em suas extremidades com ácidos graxos de cadeia longa (ácidos micólicos). Os ácidos micólicos estão ligados a uma variedade de lipídios livres, glicolipídios fenólicos (PGL), dimicocerosato de fitiocerol (PDIM), dimicoliltrealose (TDM), sulfolipídios e manosídeos de fosfatidilinositol (PIM), constituindo a membrana externa ou micomembrana. A parte externa da

micomembrana contém proteínas, lipídios e polissacarídeos ligados de forma não covalente formando uma estrutura semelhante a uma cápsula, que pode ser encontrada em *M. tuberculosis* e outras espécies de *Mycobacterium* de crescimento lento e rápido (ANGALA et al., 2018). Os ácidos micólicos são os principais lipídios presentes na parede celular micobacteriana. A proporção e o tipo de ácidos micólicos afetam a patogenicidade e a virulência, sendo alvo de vários fármacos (GROENEWALD et al., 2013). Os glicolípídios, incluindo trealose-dimicolato, dimicoceratos de fitiocerol e os glicolípídios fenólicos são importantes fatores de virulência fundamentais na patogênese e na persistência de lesões crônicas e granulomatosas (KARAKOUSIS et al., 2004).

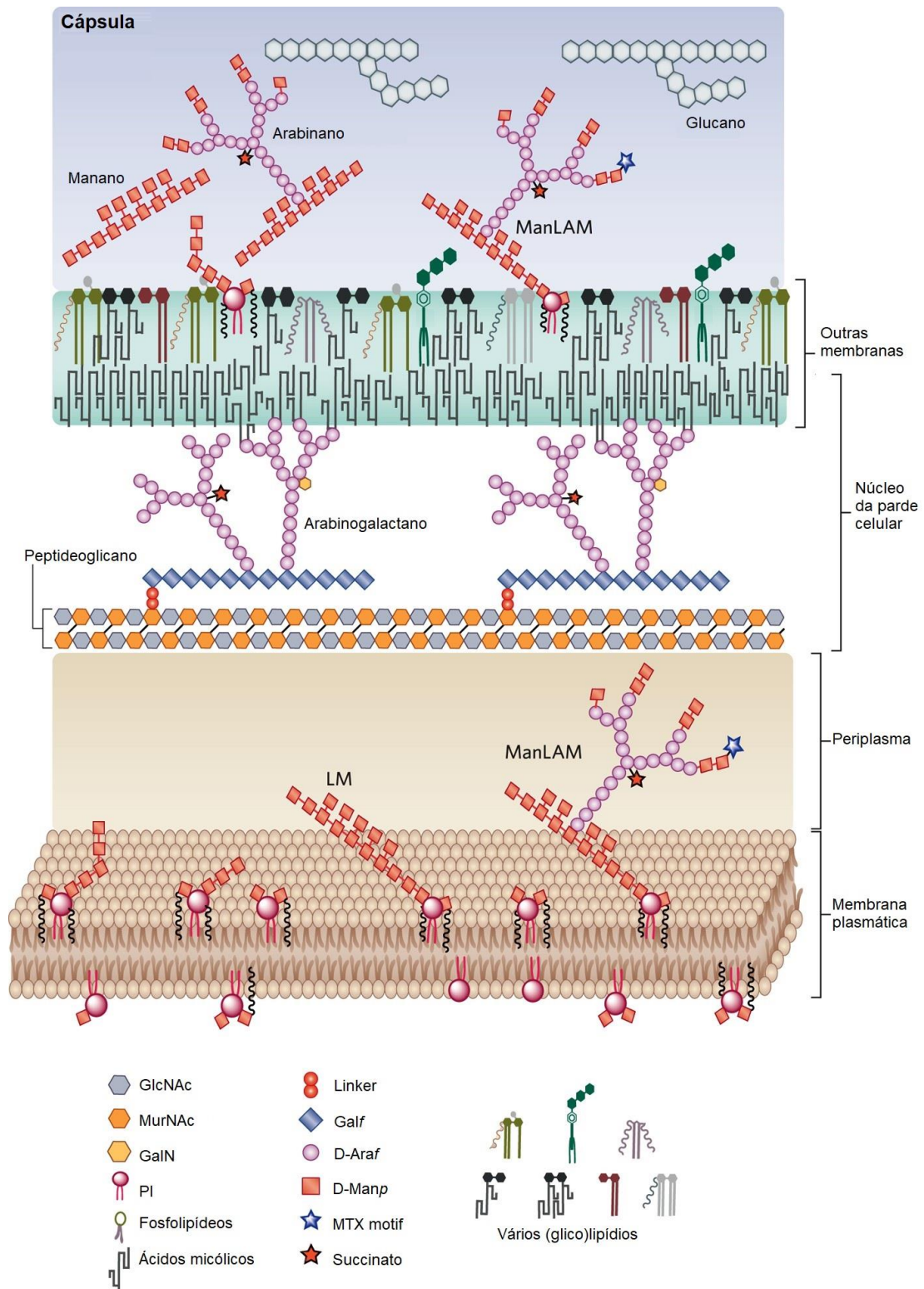


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da parede celular micobacteriana (Adaptado de ANGALA et al., 2018).

A composição da parede celular confere características importantes ao gênero, como: hidrofobicidade, antigenicidade, resistência a detergentes e aos fármacos antimicobacterianos. Em virtude da complexa composição lipídica (50% do peso seco), os bacilos são resistentes à descoloração com solução álcool-ácida após coloração

com fucsina fenicada, por isso a denominação de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (MURRAY et al., 2010; DA SILVA et al., 2018; BARANOWSKI et al., 2019; DULBERGER et al, 2020).

1.2. A Tuberculose

A tuberculose é uma das doenças mais antigas a acometer a população humana, tendo registros arqueológicos de sua ocorrência entre diversos povos (PEZZELLA, 2019). Os sinais clínicos da TB responsáveis por alterações ósseas características como deformidades tuberculosas, lesões erosivas e colapso das vértebras (Doença de Pott) foram primariamente identificadas em múmias egípcias (BARBERIS et al., 2017).

O reconhecimento da TB pulmonar e a compreensão de sua manifestação clínica foram descritos por Hipócrates denominando-a como tísica ou consumpção (BARBERIS et al., 2017).

A TB em humanos é causada principalmente pelo *M. tuberculosis* (Mtb), identificado por Robert Koch em 1882. A tuberculose afeta principalmente os pulmões, contudo podem acometer outros órgãos, sendo conhecida, nesse caso, como TB extrapulmonar. A maioria das pessoas que desenvolvem TB é adulta (cerca de 90%) (MOULE e CIRILLO, 2020; WHO, 2021). Os indivíduos acometidos pela TB têm como principais sintomas tosse produtiva ou seca por mais de três semanas, febre, sudorese noturna, cansaço excessivo, falta de apetite, e emagrecimento acentuado (MOULE e CIRILLO, 2020).

As cepas de Mtb foram agrupadas em sete linhagens: *Beijing*, *Haarlem*, S, T, X, *East African-Indian* (EAI) e *Latin American-Mediterranean* (LAM) (ERIE et al., 2017). A família LAM é altamente prevalente no mundo e constitui um padrão endêmico regional, tendo elevada frequência e diversidade em países da América do Sul, incluindo o Brasil e 58% dos isolados do Estado do Rio de Janeiro (LAZZARINI et al., 2007; DÍAZ ACOSTA et al., 2019). A família *Beijing* possui maior prevalência em países do leste asiático e Rússia e tem aumentado sua prevalência em outras regiões do mundo. Cepas de Mtb do genótipo *Beijing* têm sido associadas com eficiente disseminação, virulência aumentada e maior probabilidade de desenvolvimento de resistência a fármacos (LIU et al., 2017).

Estima-se que um quarto da população mundial esteja infectada por Mtb. Ao longo da vida, 10% dos indivíduos infectados pelo Mtb desenvolvem a doença ativa,

enquanto a contenção da infecção em estágio latente com lenta progressão ocorre em 90% das pessoas infectadas, o que representa um amplo reservatório para novos casos de TB ativa (OTTENHOFF e KAUFMANN, 2012; WHO, 2021).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020 a TB foi a segunda maior causa de morte provocada por um único agente infeccioso, ultrapassada apenas pela pandemia de COVID-19 desencadeada pelo vírus SARS-CoV-2 (WHO, 2021). A pandemia de COVID-19 reverteu anos de progresso global no controle e nas metas de eliminação da TB e pela primeira vez em mais de uma década, o número de óbitos decorrente da TB aumentaram 2020 (5,6%), com muito menos indivíduos acometidos pela doença sendo diagnosticados e tratados (WHO, 2021).

Em 2020, foram notificados 10 milhões de novos casos de TB, incluindo 1,1 milhão de indivíduos coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2021). A maioria dos casos de coinfecção entre TB e HIV se concentra nos países africanos. Em todo mundo, a redução cumulativa na taxa de incidência de TB de 2015 a 2020 foi de 11%, embora a meta a ser alcançada fosse de 20% para este período. O número de casos incidentes de TB varia entre os países desde menos de cinco casos a mais de 500 casos novos e reincidentes por 100.000 habitantes por ano (**Figura 2**).

Estima-se que em 2020, cerca de 1,3 milhão de mortes por TB ocorreram entre indivíduos HIV-negativo e 214 mil mortes em pacientes HIV-positivo, totalizando mais de 1,5 milhão de óbitos (WHO, 2021).

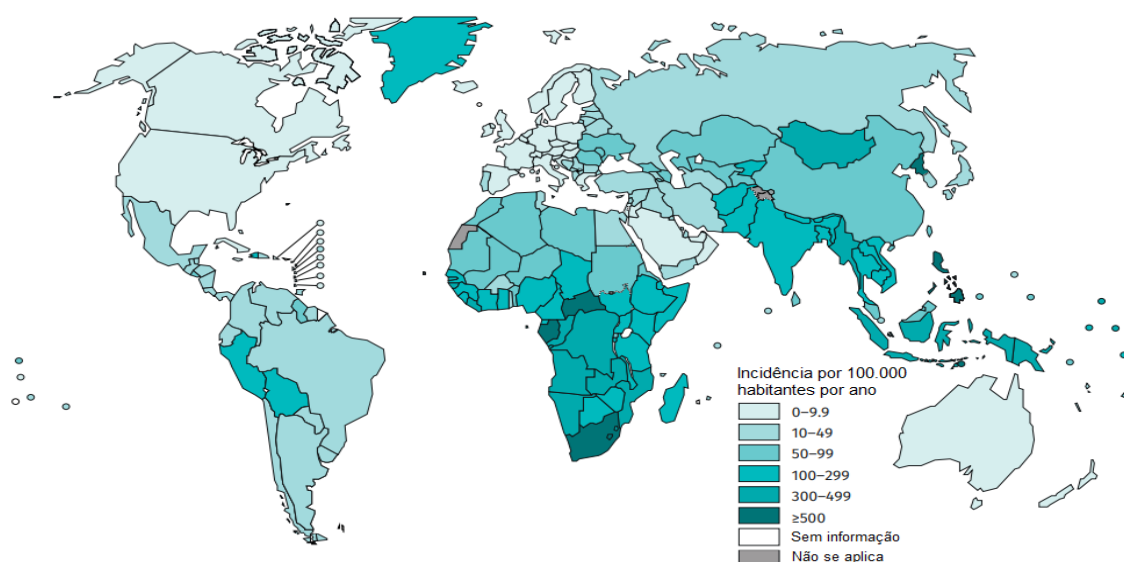


Figura 2 - Representação gráfica da taxa de incidência de tuberculose em diferentes países no ano de 2020. Número de casos estimados por 100 mil habitantes (Adaptado de WHO, 2021).

O Brasil está entre os 30 países com alta carga de TB e de TB associada ao HIV, tendo sido notificados 66,8 mil novos casos da doença em 2020 e 4,5 mil óbitos em decorrência da mesma (Ministério da Saúde, 2020). O Estado do Rio de Janeiro (RJ) está entre os três estados brasileiros que juntamente ao estado do Amazonas e do Acre apresentam taxa de incidência de TB acima de 51 casos/100 mil habitantes, coeficiente de incidência quase duas vezes maior do que o registrado para o país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; SES DO RIO DE JANEIRO, 2021).

Vários fatores influenciam o aumento do número de casos de TB e a interrupção do acesso aos serviços de diagnóstico e tratamento da doença assim como a redução dos recursos humanos e financeiros durante a pandemia de COVID-19 impactam os progressos contra a TB (WHO, 2021). O aumento na prevalência de cepas hipervirulentas e resistentes aos medicamentos disponíveis para o tratamento e o aumento dos casos de coinfeção com o HIV colaboram principalmente para elevação do número de casos da doença. Acrescentam-se a estes fatores, a desnutrição, o tabagismo, o consumo excessivo de álcool, diabetes, poluição do ar, flutuação populacional e a baixa condição socioeconômica (KUMAR et al., 2011; KOUL et al., 2011).

A ausência, interrupção ou tratamento inadequado da TB conduz ao surgimento de cepas de *Mtb* resistentes a múltiplos fármacos (MDR-TB) ou extensivamente resistentes a estes (XDR-TB). O acesso ao tratamento convencional contra a TB reduziu 21% desde 2019 e o número de pessoas tratadas para MDR-TB diminuiu 15%, alcançando um a cada três indivíduos (WHO, 2021).

A OMS destaca a importância da terapia adequada e de qualidade para a TB sensível ao tratamento padrão pré-estabelecido, além de ferramentas de diagnóstico ideais, como a melhor forma de prevenção contra o surgimento e propagação de cepas resistentes de *Mycobacterium*. Ademais, a busca por novos fármacos mais efetivos e de menor toxicidade tem sido amplamente incentivada.

1.3. Infecções pulmonares ocasionadas por *Mycobacterium kansasii*

A crescente prevalência de doenças pulmonares causadas por MNT vem sendo descrita em várias partes do mundo (PREVOTS et al., 2010). Nos países em desenvolvimento, os casos de infecções provocadas por MNT são subestimados, devido à baixa realização da rotina de cultivo das espécies a partir de amostras suspeitas e a dificuldade de obtenção do diagnóstico diferencial da TB (CASSIDY et al.,

2009; DE MELLO et al., 2013). Em adição, os casos diagnosticados de MNT em geral não são sistematicamente notificados uma vez que a doença não é classificada como de notificação obrigatória (RATNATUNGA et al., 2020).

As MNT são um grupo de micobactérias que incluem patógenos ambientais e oportunistas onde 140 espécies são descritas como patogênicas para humanos e 60 espécies são potencialmente patogênicas (HOEFSLOOT et al., 2013). Dentre as MNT patogênicas a humanos, *M. kansasii* é uma das mais prevalentes após *M. avium* sendo a MNT mais comum em algumas regiões, tais como Europa Ocidental, Suíça, Reino Unido e em áreas do Brasil, como no Estado do Rio de Janeiro (MELLO et al., 2013; LI et al., 2016).

Mycobacterium kansasii é um bacilo aeróbico descrito pela primeira vez por Buhler e Pollak em 1953, a partir de uma série de amostras de pacientes com doença pulmonar semelhante à TB (BUHLER E POLLAK, 1953; JAGIELSKI et al., 2020). Assim como para as demais micobactérias, possui parede celular rica em ácidos micólicos, impermeável a nutrientes hidrofílicos sendo classificado como BAAR (ODELL, 2014). Contudo, a parede celular de Mkan apresenta lipooligossacarídeos (LOS), não presentes na parede celular de Mtb (NATARAJ et al., 2015). E alterações na expressão destes lipídios na membrana externa de Mkan estão relacionados ao aumento de hidrofobicidade, virulência e probabilidade de transmissão (JANKUTE et al., 2017).

Estudos genéticos de isolados clínicos e ambientais demonstraram que Mkan é um grupo heterogêneo de espécies divididas em seis subtipos geneticamente distintos (I-VI) e que cepas do subtipo I compõem quase exclusivamente os isolados clínicos obtidos de pacientes com doença pulmonar (JAGIELSKI et al., 2020).

A infecção pulmonar por Mkan frequentemente causa uma doença crônica indistinguível da TB, o que ressalta a importância do diagnóstico diferencial por meio do isolamento da cultura e de testes bioquímicos específicos para implementação do tratamento adequado. No Estado do Rio de Janeiro, cerca de 60% dos pacientes identificados com infecção pulmonar por MNT foram inicialmente diagnosticados e tratados de forma empírica para TB (MELLO et al., 2013).

M. kansasii causa infecções pulmonares com desenvolvimento lento da doença, tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em indivíduos imunocompetentes suscetíveis. A doença disseminada não é comum para indivíduos HIV-negativo e a forma extrapulmonar pode acometer a pele, linfonodos, músculo esquelético e sistema geniturinário embora não seja frequente (CORTI, 2017). A presença de alterações

estruturais crônicas, associadas à doença pulmonar obstrutiva crônica, bronquiectasia, TB prévia e tabagismo constituem fatores de risco e susceptibilidade a infecções por Mkan (GRIFFITH, 2007). Os sintomas da doença pulmonar incluem febre, dor no peito, tosse, suores noturnos e perda de peso, nos estágios mais avançados e severos da doença (MATVEYCHUK *et al.*, 2012). Em pacientes imunocompetentes suscetíveis, a doença pulmonar é a manifestação clínica mais frequente (AKRAM *et al.*, 2021) onde a infecção crônica é similar a TB e foi descrita a presença de cavitação em mais de 70% dos casos (MATVEYCHUK *et al.*, 2012).

1.4. Resposta imune e imunopatologia

1.4.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis é transmitido por via aérea através da liberação de aerossol contendo partículas infecciosas, proveniente da tosse de indivíduos acometidos pela doença pulmonar ativa e posterior inalação das gotículas de aerossol contendo o bacilo por indivíduos saudáveis (ARRANZ-TRULLÉN *et al.*, 2017). O desenvolvimento da doença está associado ao tempo de duração e intensidade da exposição as partículas infectantes (ORME, 2011).

Nos indivíduos expostos ao Mtb podem ocorrer um espectro de manifestações clínicas com diferença no tipo, extensão da patologia desenvolvida no pulmão e intensidade da progressão da doença (LOPEZ *et al.*, 2003).

Após inalação, Mtb pode ser eliminado pelas células imunes; entrar em fase de latência ocorrendo o controle do crescimento bacilar pelas células inflamatórias recrutadas através da formação do granuloma ou pode ocorrer a multiplicação bacilar evoluindo para a doença ativa. Diversos fatores estão relacionados à evolução da fase de latência para a fase ativa e sua progressão, entre eles, fatores relacionados à cepa infectante (dose de infecção e virulência), fatores genéticos do hospedeiro e fatores ambientais (**Figura 3**) (SUBBIAN *et al.*, 2011; CHANDRASEKARAN *et al.*, 2017).

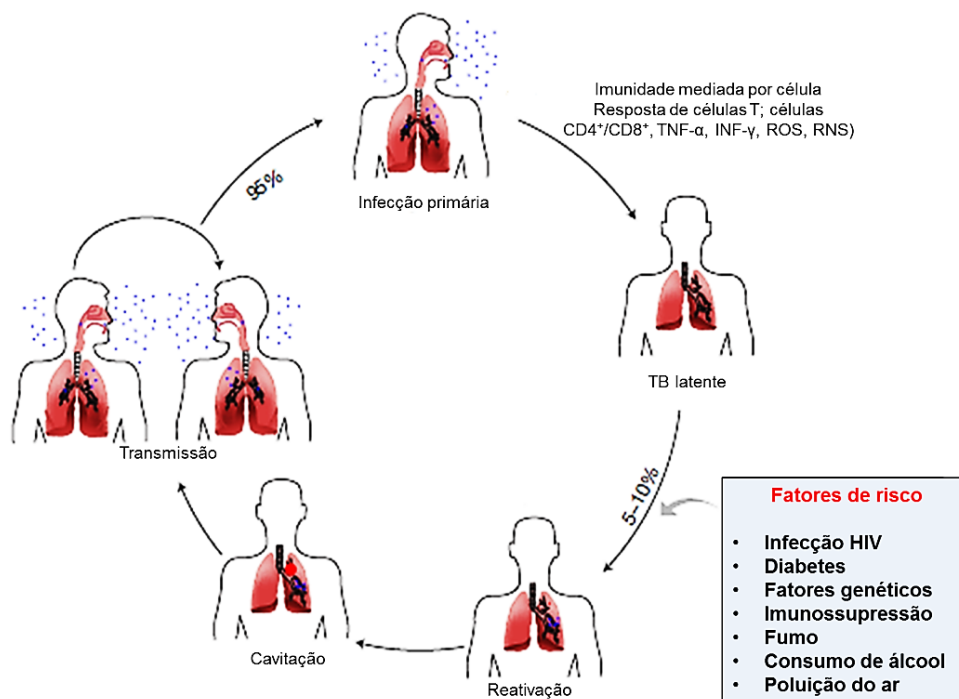


Figura 3 - Representação esquemática da sequência de eventos posterior à infecção por *M. tuberculosis* e a progressão da doença (Adaptado de KUMAR et al., 2011).

A resposta imunológica inata se inicia com os macrófagos alveolares e do parênquima pulmonar fagocitando as micobactérias inaladas. A interação entre os receptores de reconhecimento de padrão (RRP) dos fagócitos e os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) de *Mtb* induz a produção de diversas citocinas, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas IL-12 e IL-1, além de quimiocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ex: óxido nítrico - NO) (THAISS e KAUFMANN, 2014). Este evento ocasiona o recrutamento adicional de outras células inflamatórias, tais como monócitos, células dendríticas e neutrófilos para o local da infecção. Entretanto, dependendo da virulência da cepa de *Mtb*, a mesma pode se utilizar de mecanismos de evasão incluindo a inibição ou atraso da maturação e fusão fagolisossomal (BEHAR et al., 2011), inibição do recrutamento de enzimas lisossomais para o vacúolo fagossomal e da produção de espécies reativas, assim como alterar ou inibir processos autofágicos ou apoptóticos (HMAMA et al., 2015).

As células dendríticas são responsáveis pelo reconhecimento, processamento e apresentação dos antígenos micobacterianos às células T *naïve* do linfonodo torácico propiciando sua ativação tornando-as células efetoras (KRUTZIK e MODLIN, 2004). Estratégias de evasão de *Mtb* também são descritas quanto à inibição ou atraso da apresentação de antígenos nos linfonodos como também da expressão do complexo de histocompatibilidade na superfície das células dendríticas e macrófagos. A

interrupção ou atraso das funções efetoras inatas prejudicam a ativação da resposta adaptativa e uma resposta adequada de controle e eliminação da infecção (HMAMA et al., 2015). As células TCD4⁺, após ativação, se diferenciam principalmente no subconjunto de células T *helper* 1 (Th1), produzindo mediadores químicos, principalmente interferon-γ (IFN-γ) responsáveis pela infiltração celular inflamatória e recrutamento de células T CD4⁺ e T CD8⁺ para o local da infecção, organização do granuloma e aumento da resposta microbicida dos macrófagos infectados (**Figura 4**) (JAYACHANDRAN et al., 2007; LYADOVA e PANTELEEV et al., 2015).

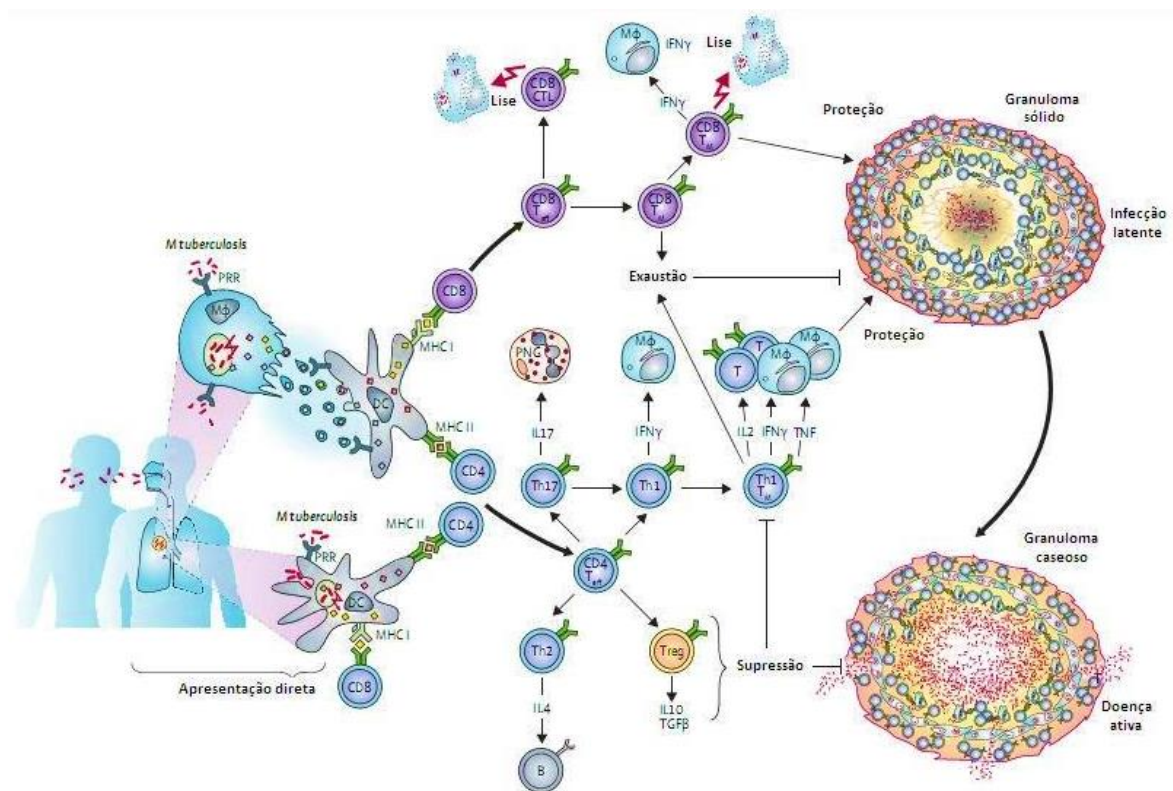


Figura 4 - Representação esquemática da resposta imune desencadeada durante a tuberculose (Adaptado de KAUFMANN et al., 2014).

Outros tipos celulares, tais como os linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ do subtipo Th17 também atuam na resposta imune a TB (COOPER, 2009). As células TCD8⁺ assim como TCD4⁺ também podem produzir IL-2, IFN-γ e TNF, citocinas com funções importantes durante a infecção por Mtb. As funções citolíticas de TCD8⁺ mediada por liberação de grânulos ou interação Fas-FasL possibilitam eliminar células infectadas por Mtb através da indução de apoptose. As células Th17 são produtoras da citocina IL-17, que auxilia na indução da secreção de IL-12 pelas células apresentadoras de antígenos (LIN e FLYNN, 2015). Além disso, as células Th17 na fase aguda da doença contribuem para a formação do granuloma e para o recrutamento de neutrófilos.

Entretanto, o acúmulo neutrofílico e altas concentrações de IL-17 no pulmão possuem papel prejudicial durante o curso da doença (ALMEIDA et al., 2017; NUNES-ALVES et al., 2014).

A formação do granuloma é um mecanismo imune para restringir a área de infecção bacilar e prevenir a disseminação. O granuloma consiste em macrófagos alveolares infectados recrutados ao nicho inicial da infecção que foram circundados por um agregado celular formado por macrófagos epitelióides, macrófagos espumosos (ricos em lipídios), intercalados com neutrófilos, células dendríticas, células NK, células B, células TCD4⁺ e TCD8⁺ rodeados por fibroblastos, os quais formam uma cápsula fibrótica periférica (RAFFETSEDER, 2016) (**Figura 5**).

O processo inflamatório continuado e os fatores micobacterianos induzem a diferenciação dos macrófagos em células epitelióides ricas em lipídios. A morte necrótica destas células infectadas e a liberação de lipídios no centro necrótico levam ao acúmulo central de cáseo caracterizando o granuloma caseoso. A ruptura do granuloma permite a liberação de bactérias nas vias aéreas e sua transmissão (DORHOI et al., 2011). Embora o granuloma atue no controle da proliferação micobacteriana na maioria dos casos, também representa um nicho de sobrevivência e replicação bacilar o que dificulta a entrada de células imunes e fármacos anti-TB. O número e extensão dos granulomas contribuem para os danos no tecido pulmonar (BASARABA, 2017). Os bacilos persistentes são quase todos extracelulares e permanecem viáveis nas massas necróticas intragranulomatosas formadas em decorrência da morte dos neutrófilos e macrófagos (AMARAL et al., 2015).

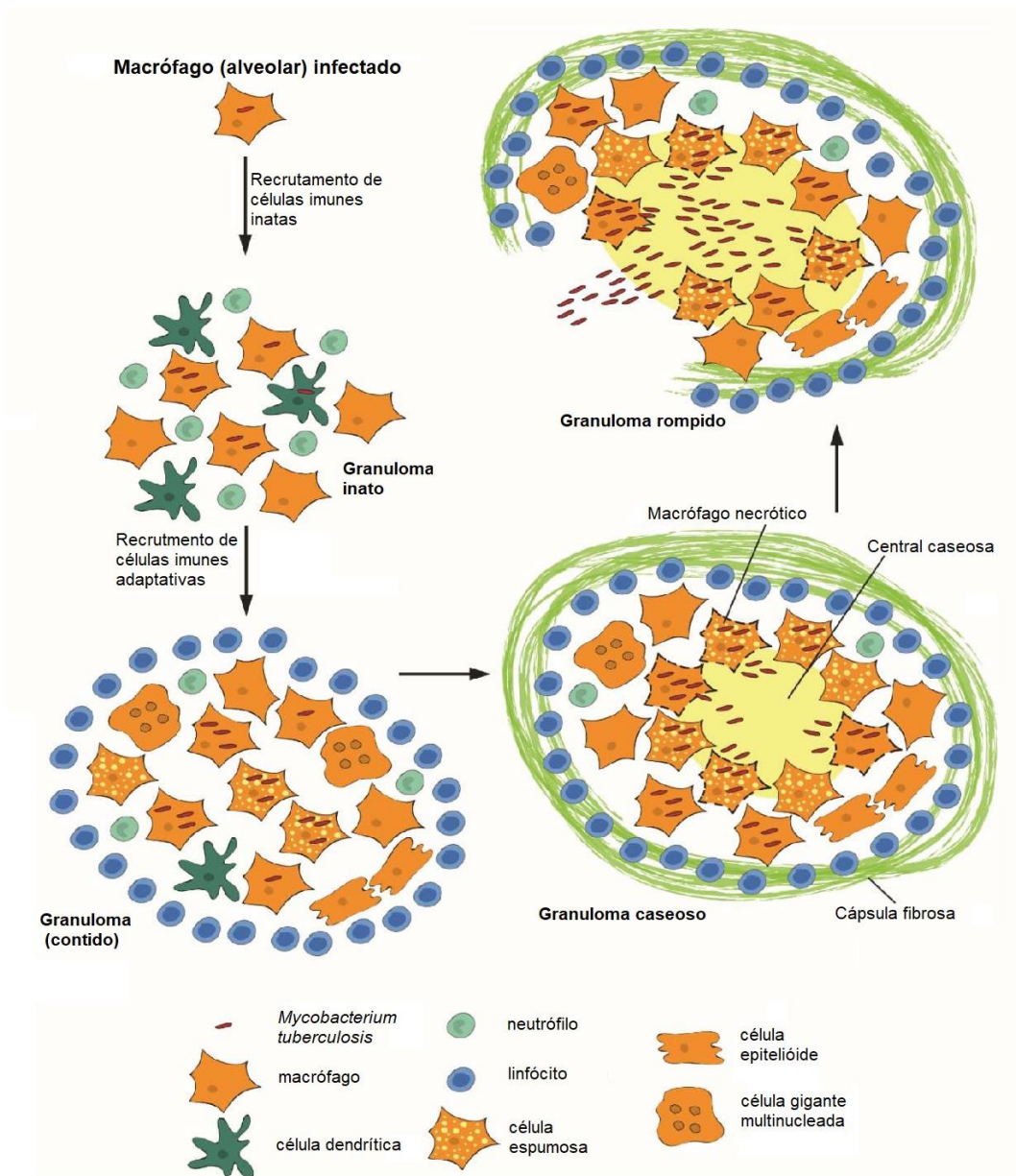


Figura 5 - Imagem representativa da estrutura do granuloma na TB. O recrutamento de macrófagos ativados, outros leucócitos e células T e B para o pulmão, conduz a formação do granuloma. Eventualmente, a progressão da doença pode ocorrer e possibilitar a liberação do bacilo a partir do centro necrótico para espaços aéreos intactos favorecendo a transmissão (Adaptado de RAFFETSEDER, 2016).

A progressão da doença e severidade da TB são determinadas por fatores associadas a bactéria (virulência da cepa), ao paciente acometido (fatores imunogenéticos do hospedeiro e status imunológico) e fatores ambientais. Em relação ao status imune do hospedeiro, a indução de uma resposta imune balanceada com a produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como o $\text{TNF-}\alpha$ e NO , pelos macrófagos infectados é essencial para a proteção contra as micobactérias. No entanto, elevados níveis de inflamação com a produção excessiva de fatores pró-inflamatórios durante o curso da doença pulmonar ativa frequentemente estão associados a casos clínicos

severos da TB, desempenhando uma função deletéria que contribuiu para o agravamento da patologia (GARLANDA et al., 2007).

Em adição, cepas micobacterianas virulentas induzem morte por necrose dos macrófagos infectados permitindo a disseminação da bactéria e infecção de novas células permissíveis. Além disso, a morte necrótica dos macrófagos induz o recrutamento acelerado de células adicionais para o pulmão, como os monócitos e neutrófilos, e libera sinais de alerta, tais como o ATP, que ao ser reconhecido por receptores purinérgicos P2X7 estimula nos macrófagos a formação e ativação do complexo inflamassoma com consequente indução de morte celular e exacerbação do processo inflamatório. A necrose amplia as áreas de lesão pulmonar e a destruição de brônquios e vasos (GARLANDA et al., 2007; LYADOVA et al., 2010). O acúmulo de neutrófilos no foco inflamatório decorrente da morte necrótica das células infectadas favorece a disseminação bacteriana, uma vez que são células permissíveis e de vida curta, além de liberarem uma gama de produtos microbicidas e citotóxicos que contribuem para a patologia pulmonar e desenvolvimento de áreas de necrose (GROMMES e SOEHNLEIN, 2011). A progressão da lesão necrótica pode culminar na formação de cavernas, manifestação mais grave da TB conduzindo a danos permanentes no pulmão e incapacidade funcional a longo prazo (LYADOVA et al., 2010).

Neste contexto, tem sido proposta a utilização de um tratamento anti-inflamatório adjuvante associado à terapia anti-TB padrão para reduzir o quadro inflamatório deletério desenvolvido em indivíduos hiper-reativos e/ou acometido por bactérias virulentas (ZUMLA et al., 2015) .

1.4.2. *Mycobacterium kansasii*

Diferentemente da TB, a via de transmissão de Mkan provavelmente ocorre por meio de aerossóis gerados a partir de reservatórios de água tais como torneira, chuveiro e encanamentos (RICKETTS et al., 2014).

Embora a rota de transmissão de Mkan ainda não seja totalmente elucidada, a infecção também pode ocorrer através de aspiração de conteúdo gástrico ou infecção localizada na pele. A transmissão humano-humano é acreditado não ocorrer (VAN INGEN, 2014; AKRAM et al., 2021).

Na maioria das vezes, a resposta imune inata de um indivíduo sadio contra Mkan é suficiente para controlar o crescimento do bacilo ou mesmo eliminar o bacilo de

menor virulência. Nos indivíduos imunocompetentes suscetíveis, a infecção por Mkan induz resposta imune bastante similar a resposta imune induzida contra Mtb (WIELAND et al., 2006a).

A ativação de macrófagos alveolares e intersticiais, bem como de células epiteliais, está associada a indução de uma cascata pró-inflamatória que envolve respostas mediadas por TLRs e a secreção de mediadores inflamatórios, como IL1- α , IL1- β , NO, TNF- α , IL-12 e quimiocinas. Os macrófagos são as principais células inatas a interagir com o bacilo e são responsáveis após sua ativação pelo recrutamento de outras células imunológicas como monócitos, neutrófilos, NK e células dendríticas com consequente ativação de células T e da resposta imune adaptativa. O papel de ROS na patogênese causada por Mkan ainda não é bem compreendido (LIM et al., 2013; PRASLA et al., 2020). Contudo, o NO é responsável por limitar a atividade do inflamassoma NLRP3, importante para a produção de IL-1 β durante a resposta imune inata. Embora a produção de IL-1 β seja importante para a ativação autócrina dos macrófagos e resposta protetora contra infecções por micobactérias, a produção excessiva desta citocina favorece o desenvolvimento de dano tecidual (MA et al., 2021).

Menor produção de IFN- γ foi observado durante a infecção *in vivo* por Mkan comparado ao descrito em infecções por Mtb, sugerindo menor dependência da presença de células TCD4⁺ ou da produção de IFN- γ durante a resposta imune protetora contra a infecção pulmonar por Mkan (WIELAND et al., 2006b).

Mussi e colaboradores (2021) demonstraram que camundongos C57BL/6 infectados por isolados clínicos de Mkan de alta virulência desenvolveram doença pulmonar progressiva com a formação de grandes granulomas caseosos encapsulados em estágios posteriores, extensa pneumonia granulomatosa e óbito prematuro dos animais infectados.

O desfecho clínico, o desenvolvimento e comprometimento patológico do pulmão de pacientes infectados por TB ou Mkan está intimamente relacionado a fatores genéticos e status imunológico do hospedeiro assim como virulência do bacilo (GOPALASWAMY et al., 2020).

1.5. Tratamento da tuberculose e de infecções pulmonares causadas por *M. kansasii*

O tratamento convencional da TB tem como objetivo a cura do paciente e interromper a transmissão dos bacilos à outras pessoas (NAHID et al., 2019). A OMS estabeleceu a utilização dos fármacos rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (**Figura 6**) por 2 meses (fase de ataque), seguidos por mais 4 meses de tratamento com isoniazida e rifampicina (fase de manutenção), tendo uma taxa de cura de 83% dos pacientes (WHO, 2021). O tratamento da TB suscetível apresenta alta eficácia na eliminação dos bacilos, desde que o paciente tenha total adesão ao tratamento (HOAGLAND et al., 2016).

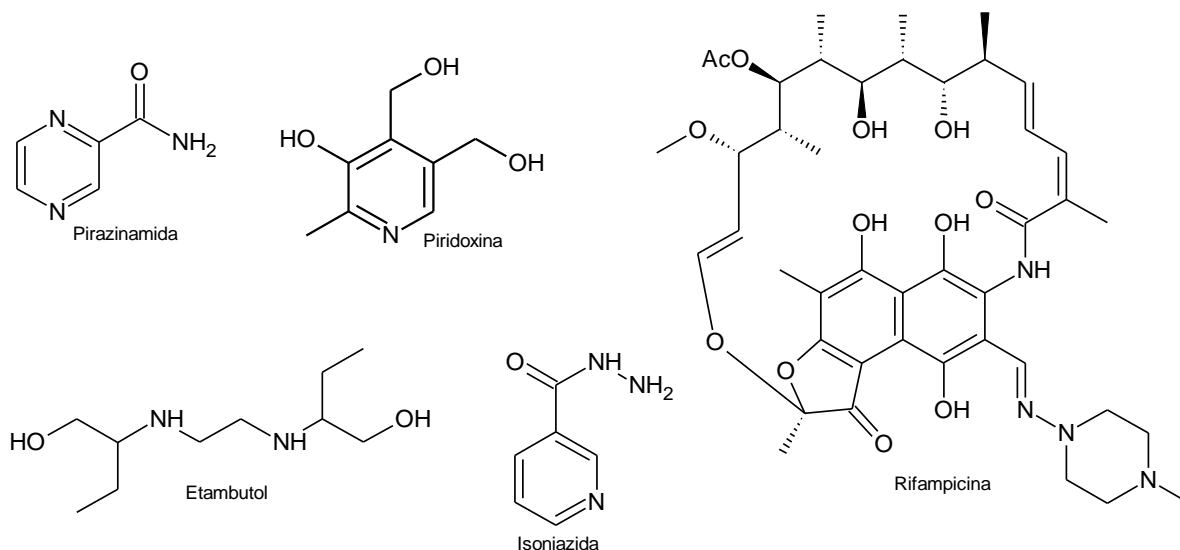


Figura 6 - Estrutura química dos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento convencional da tuberculose.

Nos casos de MDR-TB, resistência a isoniazida e a rifampicina, e XDR-TB (resistência adicional a qualquer fluoroquinolona e pelo menos a bedaquilina ou linezolida), a taxa de cura é baixa (está em torno de apenas 20% para XDR-TB), e exige a utilização de fármacos de segunda e terceira linha, tais como: canamicina, amicacina, capreomicina, moxifloxacina e levofloxacina (**Figura 7**), que são geralmente injetáveis, mais caros e com maiores efeitos adversos (WHO, 2021).

O tratamento convencional para infecções pulmonares causadas por Mkan foi estabelecido pela ATS/IDSA (Sociedade Torácica Americana/Sociedade Americana de Doenças Infecciosas) e consiste na utilização dos fármacos isoniazida, rifampicina, piridoxina e etambutol (**Figura 6**), entre 12 e 18 meses. O tratamento é efetuado até que o paciente apresente resultado de exames de cultura de escarro negativo por 12 meses consecutivos (AKRAM et al., 2021).

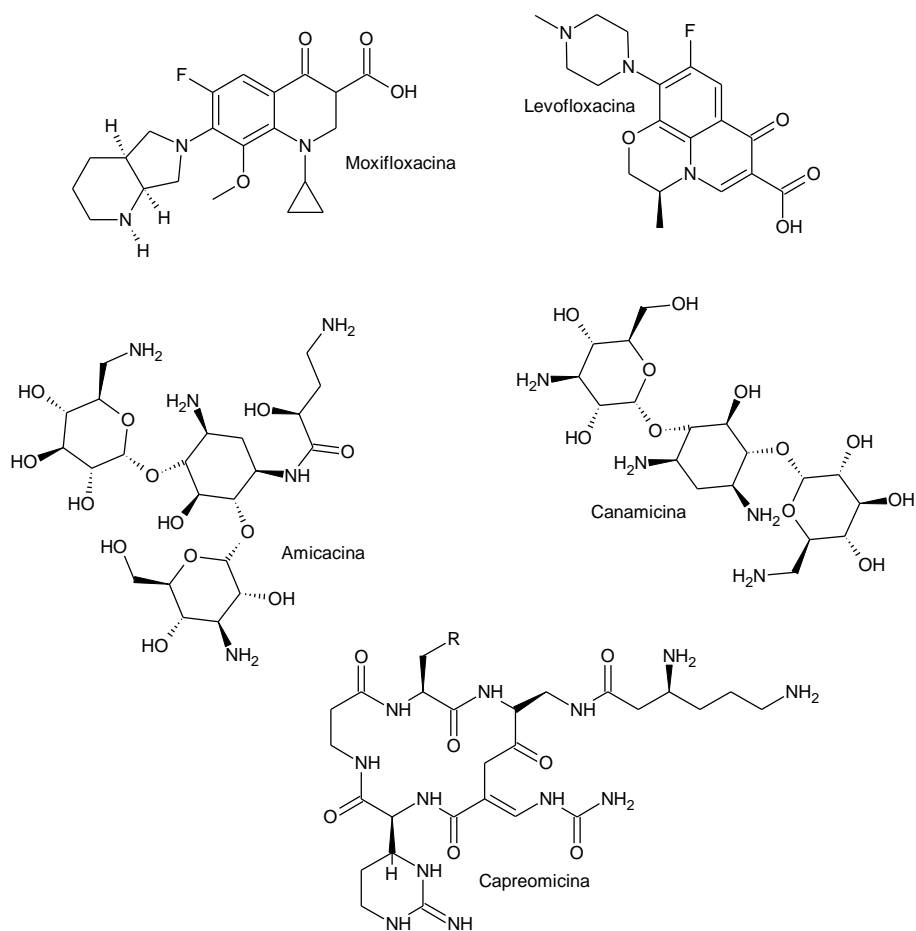


Figura 7 - Estrutura química de alguns fármacos de segunda linha utilizados no tratamento da TB resistente.

O tratamento de infecções causadas por MNTs é mais desafiador do que o tratamento convencional para TB (6 meses), tendo em vista maior período de tempo de adesão necessário do paciente. Em casos de cepas de Mkan resistentes a rifampicina ou de pacientes que apresentem intolerância a um dos antibióticos de primeira linha, é necessário a substituição por outros fármacos dependendo da susceptibilidade *in vitro*, tais como: claritromicina, azitromicina, moxifloxacin, sulfametoxazol e estreptomicina (**Figura 7 e 8**) (DALEY, 2020).

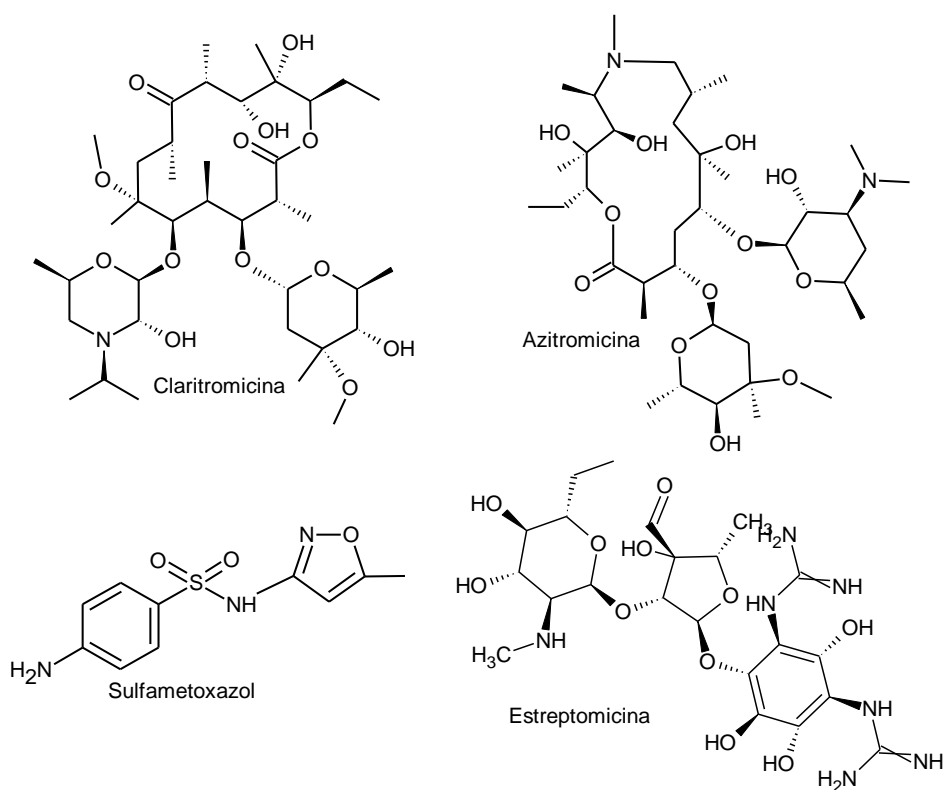


Figura 8 - Estrutura química dos fármacos de segunda linha utilizados no tratamento de casos resistentes de infecção pulmonar por *M. kansasii*.

Diferente do que ocorre para outras bactérias, que adquirem resistências por meio da transferência horizontal de genes, a aquisição de resistência aos fármacos é principalmente devido a mutações nos genes cromossômicos, que em sua maioria, resultam de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) culminando em alterações nos genes que expressam proteínas alvos dos fármacos (MABHULA e SINGH, 2019).

É de suma importância buscar novos fármacos antimicrobianos que sejam mais potentes, a fim de evitar o surgimento de infecções resistentes à terapia padrão. Dentro deste contexto, também são necessários fármacos com menores efeitos adversos.

Deve-se considerar, no entanto, a avaliação da eficácia da substância nos diferentes estados fisiológicos e de replicação bacilar, substâncias mais eficazes que possibilitem a diminuição do período de tratamento favorecendo a conclusão da terapia e que previnam ou reduzam a disfunção pulmonar residual (ORME, 2011).

Em conjunto, a considerável carga global de doenças micobacterianas (TB e infecções pulmonares por MNT) requer estudos adicionais muito necessários e o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e prevenção.

A busca por novas substâncias com propriedades *dual*, anti-inflamatória e antimicobacteriana, constitui uma estratégia terapêutica importante para os casos severos de TB pulmonar e de infecções pulmonares por MNTs relacionados à resposta inflamatória excessiva (VENTURA et al., 2015b; KILINÇ et al., 2021).

1.6. Tratamento adjuvante direcionado ao hospedeiro

Nos últimos anos, novas abordagens terapêuticas direcionadas a resposta imune do hospedeiro, HDT (*host-directed therapy*) foram consideradas cruciais para complementar o tratamento antimicobacteriano com antibióticos (WHO, 2019).

A progressão da infecção por micobactérias é determinada pelo balanço entre as respostas pró e anti-inflamatórias. Alterações neste equilíbrio que culminem em excessiva resposta pró-inflamatória ou falha na resposta inflamatória geram deficiência no controle micobacteriano e desenvolvimento de extensos danos teciduais (KOLLOLI e SUBBIAN, 2017).

Deste modo, a terapia adjuvante consiste na utilização de imunomoduladores, de forma complementar ao tratamento com antibióticos. Uma das vertentes de atuação proposta é na redução da resposta inflamatória excessiva, reparação ou prevenção dos danos teciduais necróticos em indivíduos hiper-reativos como também aumento da capacidade do organismo na eliminação ou contenção micobacteriana. Diferentes abordagens de terapia adjuvante ao tratamento da TB têm sido descritas para os casos associados ao desenvolvimento de resposta inflamatória excessiva incluindo o uso de anti-inflamatórios (ZUMLA et al., 2015; YOUNG et al., 2020).

O tratamento anti-inflamatório adjuvante direcionado a casos severos de TB extrapulmonar foi inicialmente utilizado na clínica terapêutica, com o uso de glicocorticoides, tais como: dexametasona e prednisolona (**Figura 9**), em associação a terapia anti-TB padrão nos casos de meningite e pericardite tuberculosa (PRASAD e SINGH, 2008; BUONSENSO et al., 2010). Em relação ao tratamento da pericardite tuberculosa, o uso de corticoides atualmente não é mais recomendado devido ao seu uso não parecer alterar os resultados em termos de melhoria da prevenção do déficit pulmonar. Em contraste, o uso de corticoides no tratamento da meningite tuberculosa é considerado obrigatório e vem demonstrando benefício de sobrevida para o paciente (KRUG et al., 2021). Contudo, a utilização desta abordagem necessita de estudos adicionais para os casos de TB pulmonar (ZUMLA et al., 2014). Critchley e colaboradores (2014) revisaram sistematicamente estudos clínicos relevantes que

avaliaram os efeitos do uso de corticoides na mortalidade da TB e embora poucos estudos recentes tenham investigado o efeito desses em pacientes acometidos com TB pulmonar, foi sugerido que os esteroides poderiam ser eficazes na redução da mortalidade para TB pulmonar. Contudo, é necessário reconhecer os riscos metabólicos e cardiovasculares do uso dos corticoides (dose e tempo de utilização) do ponto de vista do risco-benefício para o paciente com TB pulmonar (WALLIS, 2014).

Além dos glicocorticoides, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) têm sido avaliados no tratamento adjuvante anti-TB em modelos murinos.

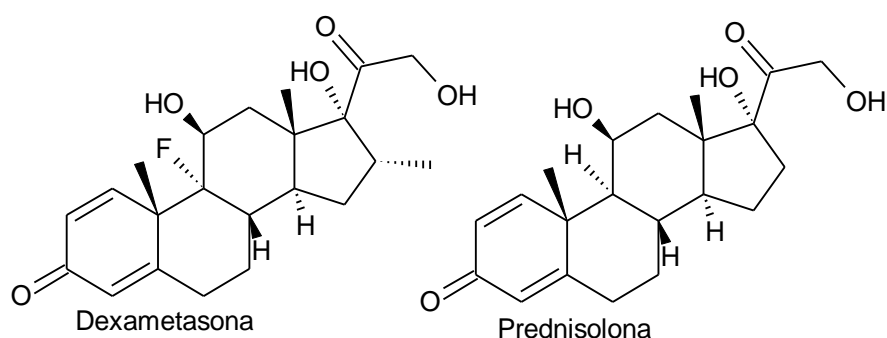


Figura 9 - Estrutura química dos fármacos glicocorticoides

Trabalhos recentes têm reportado possibilidades de uso de abordagens de tratamento HDTs, direcionadas a modulação da resposta imune inadequada durante o curso de infecções por MNT (CRILLY et al., 2021; STRONG e LEE, 2021; KILINÇ et al., 2021). Kilinç e colaboradores (2021) revisaram abordagens HDTs que podem vir a ser eficazes e seguras no contexto de infecções por MNTs. Dentre elas, estão a promoção de autofagia através da ação na via mTOR (proteína alvo da rapamicina, reguladora principal do complexo autofágico), modulação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e dos níveis de TNF- α e redirecionamento do perfil de células T.

Assim sendo, novas substâncias que possuam a combinação de propriedades antimicrobacteriana e anti-inflamatória podem proporcionar uma vantagem importante no tratamento da TB pulmonar severa e infecções pulmonares causadas por MNTs que estejam associadas a exacerbação da resposta inflamatória.

1.7. Tioureias

As tioureias constituem uma importante classe de substâncias capazes de formar ligações intermoleculares do tipo N-H...S, e apresentam em sua constituição o grupamento ureia, com o átomo de oxigênio substituído por um átomo de enxofre, sendo denominado tioureia (**Figura 10**).

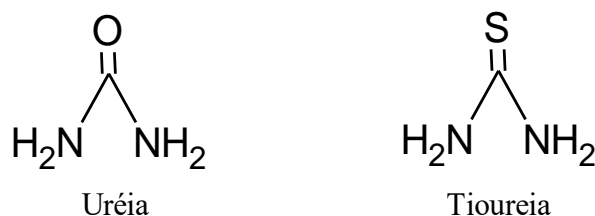


Figura 10 - Estrutura química do grupamento funcional uréia e tioureia.

O grupo funcional tioureia (**Figura 10**) tem sido abordado como um farmacóforo importante em diversos protótipos químicos potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos (LOURENÇO et al., 2015). Derivados de tioureia têm sido utilizados como precursores para a síntese de diferentes classes de compostos acíclicos e heterocíclicos, além de por si próprios serem biologicamente ativos (GHORAB et al., 2016).

O amplo espectro de atividade biológica de derivados de tioureia e os seus complexos metálicos tem sido descrito na literatura como: antialérgico (VENKATACHALAM et al., 2003), inibidor de óxido nítrico (KIM et al., 2007), antiviral para o vírus Influenza (NAIR, 2008) e para o Herpes simples (DI GRANDI et al., 2004), antitumoral (ROSTOM, 2006), antifúngica (EWEIS et al., 2006), antibacteriano (SAEED et al., 2007), antimicobacteriano para cepa *M. tuberculosis* H37Rv (ERŞEN et al., 2017; SUDHAMANI et al., 2017), na prevenção do envelhecimento atuando como sequestrador de radicais livres (TAKAHASHI et al., 2005), agentes anti-inflamatórios, antimicrobianos (KECHE et al., 2012), antimalárica (EKOUE-KOVI et al., 2009), pesticida (ZHONG et al., 2008) e antagonistas de receptores de serotonina (BIELENICA et al., 2018). Ressalta-se ainda que os derivados de tioureias representam uma das classes mais promissoras de agentes anticancerígenos, com vasto potencial contra diferentes tipos de tumores sólidos e leucemia (GHORAB et al., 2016; BIELENICA et al., 2018).

As propriedades farmacológicas, incluindo antimicrobiana, antioxidante, anticancer, antidiabetes e antialzheimer, são atribuídas a fosforilação de compostos de ureia (MITTA, 2015). A potente atividade de derivados de tioureia estimula o grande

interesse de síntese de tais substâncias para estudos de relação estrutura-atividade biológica. Cunha e colaboradores (2007) destacaram que derivados de tioureias contendo grupos benzoil são mais ativos que o grupo fenil contra bactérias gram-positivas. Abbas e colaboradores (2013) descreveram derivados de tioureia com uma porção de ácido hipúrico que exibem atividade de largo espectro antimicrobiano. Observou-se que em derivados de tioureia com íons de metais de transição, os átomos de nitrogênio presentes no grupamento tioureia são capazes de formar ligações de hidrogênio intermoleculares do tipo N-H • -S e C-H • -O, e a atividade biológica pode estar associada à presença deste tipo de ligação.

A busca pela síntese de substâncias bioativas com potencial atividade biológica, como as tioureias, se torna muito importante devido a gama de produtos sintéticos medicinalmente relevantes obtidos a partir desta classe (AGUIAR et al., 2011; VIANA et al., 2017). Diferentes metodologias de síntese química foram descritas na literatura para a obtenção de tioureias, incluindo vantagens e desvantagens dos processos. Dentre as principais metodologias, a mais utilizada é a que consiste na obtenção de tioureias a partir de isotiocianatos e aminas, devido a apresentação de altos rendimentos e a possibilidade de se obter uma grande diversidade de estruturas contendo o grupo tioureia (**Figura 11**) (SCHROEDER, 1955).

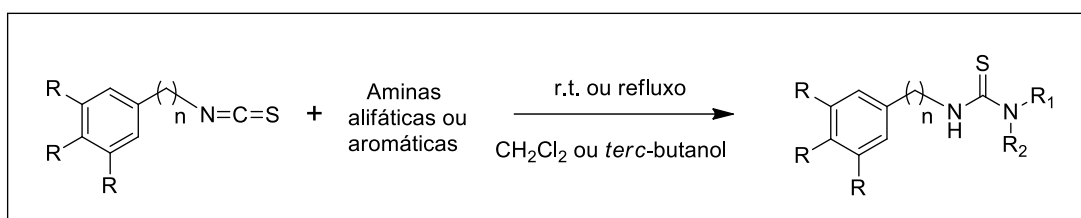


Figura 11 - Esquema da rota sintética mais utilizada para obtenção de tioureias.

No âmbito da classe das tioureias e seus derivados, substâncias com atividade dual, antimicobacteriana e anti-inflamatória, ainda não foram descritas o que incentiva a busca nesta área emergente de saúde pública tendo em vista o vasto potencial biológico da classe.

2. JUSTIFICATIVA

O aumento na prevalência de cepas *Mtb* resistentes aos fármacos convencionais está intimamente associado ao crescente número de casos de TB (WHO, 2021). A pandemia de COVID-19 preocupa o controle da TB e pode contribuir para a reativação da TB latente e o agravamento do quadro clínico da TB ativa (CHEN et al., 2020).

As infecções por *Mtb* resistente ou por cepas mais patogênicas são um desafio, com prognóstico desfavorável, regimes de tratamento mais complexos, de maior duração e efeitos adversos (HOAGLAND et al., 2016; SILVA et al., 2018), incentivando a obtenção de novas substâncias mais eficazes e menos tóxicas.

Casos clínicos de TB, pulmonar severa em indivíduos hiper-reativos estão frequentemente associados a uma resposta inflamatória deletéria, com elevada produção de mediadores inflamatórios, desenvolvimento de lesões necróticas e cavitação (GUERRA-DE-BLAS et al., 2018) reforçando a necessidade de terapia imunomodulatória conjunta ao tratamento anti-TB para estes casos clínicos.

Entre as MNTs, *M. kansasii* é uma das mais patogênicas, capaz de causar doença pulmonar similar a TB em indivíduos imunocompetentes suscetíveis (DESTEFANO et al., 2018). Vale ressaltar, o longo período de tratamento de infecções causadas por MNT, a presença de efeitos adversos e a capacidade de cepas de *Mkan* de alta virulência induzirem patologia pulmonar necrótica (MUSSI et al., 2021).

Neste contexto, a utilização de uma abordagem terapêutica adjuvante direcionada a redução da resposta inflamatória inadequada e prevenção dos danos pulmonares, em combinação com antibióticos pode resultar em melhor desfecho clínico e preservação da função pulmonar. A busca por substâncias com atividade *dual*, antimicobacteriana e anti-inflamatória representa uma ferramenta potencial e vantajosa.

Os derivados tioureias apresentam vasto potencial na química medicinal, tendo um amplo espectro de atividades biológicas descritas na literatura, embora não haja descrição de atividade *dual*, antimicobacteriana e anti-inflamatória para esta classe. Deste modo, a avaliação do potencial *dual* de tioureias possui ineditismo para este grupo de substâncias e para o tratamento adjuvante da TB pulmonar severa e infecções pulmonares causadas por *M. kansasii*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar o potencial de 46 derivados de tioureia quanto à capacidade anti-inflamatória e antimicobacteriana (contra *M. tuberculosis* e *M. kansasii*) e o impacto na imunopatologia induzida em camundongos por cepa Mtb hipervirulenta focando numa abordagem *dual* de tratamento anti-TB.

3.2. Objetivos específicos

- Obtenção dos 46 derivados de tioureias;
- Avaliar os derivados de tioureias quanto à inibição da produção de NO, TNF- α e IL-1 β em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS;
- Avaliar a viabilidade da cultura de macrófagos RAW 264.7 tratada com os derivados de tioureias através do método de MTT;
- Investigar *in silico* a relação estrutura atividade e estudos farmacocinéticos e toxicológicos para as tioureias mais ativas contra Mtb H37Rv;
- Avaliar o potencial das tioureias em inibir o crescimento da cepa laboratorial Mtb H37Rv e o isolado clínico hipervirulento Mtb M299;
- Investigar o mecanismo de ação das tioureias mais ativas em inibir a produção de NO através da verificação do potencial antioxidante destas no sequestro do radical NO como também na expressão enzimática da iNOS;
- Verificar o potencial das tioureias **10, 15, 16, 28 e 29** em inibir o crescimento micobacteriano em cultura de macrófagos infectados e na viabilidade de agregados extracelulares de Mtb;
- Avaliar a capacidade das tioureias em inibir o crescimento da cepa de referência *M. kansasii* 12478 e dos isolados clínicos de alta virulência, Mkan 10953 e 8835, em cultura bacteriana;
- Avaliar os efeitos terapêuticos das tioureias, com atividade *dual in vitro*, no modelo murino de TB pulmonar severa induzida em camundongos C57Bl/6 por cepa hipervirulenta, avaliando efeitos na imunopatologia pulmonar, crescimento bacilar e modulação da resposta imune induzida pela bactéria.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção das tioureias

As tioureias foram obtidas através de uma colaboração entre o Laboratório de Biologia do Reconhecer/UENF e o Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica coordenado pelo Prof^o Lúcio Mendes Cabral da Faculdade de Farmácia (UFRJ). A síntese foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Aguiar et al., (2011) e as diferentes alquilas e ariltioureias foram preparadas através da reação entre as suas aminas correspondentes com o isotiocianato de fenila (PITC), o isotiocianato de benzila (BITC), o isotiocianato de feniletila (PEITC) ou isotiocianato de 3,4,5-trimetoxifenilisotiocianato (TMPITC).

4.1.1. Síntese dos derivados de tiourea

Todos os reagentes e solventes foram adquiridos de fonte comercial (Merck Chemical) e foram utilizados sem purificação adicional. Todos os pontos de fusão foram obtidos em analisador térmico Shimadzu DSC-60 a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, de 30°C a 200°C, sob uma vazão de nitrogênio de 50 mL/min e usando um padrão de alumínio. Os espectros de infravermelho (IV) foram registrados em um espectrofotômetro Nicolet Magna-IR 760 usando Pastilhas de brometo de potássio (KBr). Os espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN foram registrados em espectrômetro Bruker Avance 200 MHz, Bruker Avance 300 MHz, Bruker Avance III 400 MHz ou Bruker Avance III 500 MHz com CDCl₃ ou DMSO-*d*₆ como solvente. Todos os valores de deslocamento químico foram relatados em unidades de (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram fornecidas em hertz (Hz). Os dados de massa de alta resolução foram obtidos em espectrômetro Bruker ESI-q TOF. A cromatografia em camada fina (TLC), foi realizada em placas de sílica gel (folhas de alumínio 60 F254, Merck), usando acetato de etil-hexano (1:4 v/v) como eluente e empregando luz ultravioleta ou solução de ácido fosfomolibdico em etanol 5% (p/v) para visualização.

4.1.2. Preparação de tioureias substituídas 1-21, 23-29

Método geral A1: Na solução de isotiocianato **1** (1,0 mmol) em diclorometano (10 mL) foi adicionada a amina **2** correspondente (1,2 mmol) em excesso e a mistura foi

agitada à temperatura ambiente até o isotiocianato ser consumido (monitorado por TLC) . Após, a fase orgânica foi lavada com 5% de HCL (aq) (3 × 10 mL), seca com Na₂SO₄ anidro e evaporada no rotaevaporador para obtenção da tioureia pura, sem exigência de purificação adicional.

Método geral A2: A respectiva amina **2** (1,0 mmol) foi adicionada a uma solução com excesso de isotiocianato **1** (1,2 mmol) e diclorometano (10 mL), e a reação foi agitada à temperatura ambiente até a amina ser consumida (TLC). Em seguida, a mistura reacional foi evaporada em rotaevaporador e o produto bruto obtido foi lavado pelo menos por três vezes com hexano, até a obtenção da tioureia pura.

Método geral B1: A solução de isotiocianato **1** (1,0 mmol) em terc-butanol (10 mL) foi adicionada a amina **2** correspondente (1,2 mmol) e a mistura foi refluxada até o isotiocianato ser consumido (monitorado por TLC). Posterior a evaporação do solvente, 10 mL de CH₂Cl₂ foram adicionados e em seguida o mesmo procedimento utilizado no método A1 foi realizado.

Método geral B2: A respectiva amina **2** (1,0 mmol) foi adicionada a uma mistura com excesso de isotiocianato **1** (1,2 mmol) e terc-butanol (10 mL), e a reação refluxada até a amina ser consumida (monitorado por TLC). Em seguida, o solvente foi evaporado e o mesmo procedimento utilizado no método A2 foi seguido.

4.1.3. Preparação de piperazina tioureias 22, 30-46

Uma solução de isotiocianato **1** (1,1 mmol) e a respectiva piperazina **3** (1,0 mmol) em diclorometano (15 mL) foi agitada à temperatura ambiente durante 1 h. O solvente foi então evaporado e o produto bruto foi lavado por três vezes com hexano até ser obtida a tioureia pura.

4.1.4. Caracterização dos derivados de tioureias

Os dados de caracterização dos derivados de tioureia sintetizados, exceto para tioureias **1, 2, 4-6, 11, 12, 17-21 e 24**, que foram relatadas anteriormente (LOURENÇO et al., 2015; VIANA et al., 2017), foram descritos neste trabalho. As tioureias **3, 10, 28, 31, 32, 34-37, 39, 40 e 43-46** são inéditas.

As tioureias **7-9, 13, 14, 22, 23, 25, 27 e 30** foram relatadas anteriormente, porém sem informações de caracterização, e derivados de tioureia **15, 22, 26, 29, 33, 38, 41 e 42** foram relatadas na literatura apenas com caracterização parcial (BATEY E POWELL, 2000; CANSIZ et al., 2006; DEPREZ-POULAIN et al., 2007; AGUIAR et al.,

2011; KHAN et al., 2014; TAHA et al., 2015; ANGYAL et al., 2017; WAGH et al., 2018; PINGAEW et al., 2017).

4.1.4.1. *N*-benzil-*N'*-metil-*N'*-((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)tioureia (3)

Sólido branco; 135.53°C; IR (KBr): 3304, 3018, 2935, 2910, 1610, 1541, 1448, 1392, 1338, 1269, 1205, 1082, 1051, 1012 cm⁻¹; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.96 (br t, *J* = 5.54 Hz, 1H), 7.34-7.18 (m, 5H), 5.08 (d, *J* = 4.50 Hz, 1H), 4.77 (d, *J* = 5.40 Hz, 2H), 4.56-4.32 (m, 4H), 4.00-3.80 (m, 2H), 3.70-3.40 (m, 6H), 3.21 (s, 3H); ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 182.17, 139.71, 128.05, 127.04, 126.46, 72.14, 71.76, 71.34, 69.43, 63.24, 55.87, 48.37; ¹³C-NMR-DEPT 135 (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 128.55 (CH), 127.53 (CH), 126.96 (CH), 72.62 (CH), 72.26 (CH), 71.82 (CH), 69.91 (CH), 63.73 (CH₂), 56.37 (CH₂), 48.85 (CH₂), 40.52 (CH₃); HR-MS-ESI: *m/z* [M+H]⁺ calculado para C₁₅H₂₄N₂O₅S: 344.1571; encontrado: 345.1478.

4.1.4.2. *N*-fenetil-*N'*-(3,4,5-trimetoxifenil)tioureia (10)

Marrom sólido; 138.82°C; IR (KBr): 3350, 3136, 3016, 2823, 1595, 1541, 1458, 1338, 1225, 1120, 1007 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (br s, 1H), 7.30-7.10 (m, 5H), 6.30 (s, 2H), 6.04 (br s, 1H), 3.93-3.85 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.71 (s, 6H), 2.93 (t, *J* = 6.55 Hz, 2H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 180.71, 154.09, 138.48, 137.25, 131.26, 128.69 (2C), 126.66, 103.18, 60.89, 56.22, 46.15, 34.70; HR-MS-ESI: *m/z* [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₂₂N₂O₃S: 347.1417; encontrado: 347.1420.

4.1.4.3. *N*-benzil-*N'*-(2,3-di-hidrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-il)tioureia (28)

Sólido cinza; 153.90°C; IR (KBr): 3568, 3481, 3348, 3163, 2972, 1591, 1508, 1307, 1060, 885, 702, 590 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (br s, 1H), 7.36-7.26 (m, 5H), 6.85 (d, *J* = 8.48 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.70 (d, *J* = 8.50 Hz, 1H), 6.25 (br s, 1H), 4.87 (d, *J* = 5.39 Hz, 2H), 4.23 (s, 4H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 181.39, 144.51, 143.35, 137.62, 129.07, 128.91, 127.81, 127.75, 119.36, 118.61, 115.39, 64.45, 64.40, 49.46; HR-MS-ESI: *m/z* [M+H]⁺ calculado para C₁₆H₁₆N₂O₂S: 301.0998; encontrado: 301.1005.

4.1.4.4. *N*-benzil-*N'*-(2,3-di-hidrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-il)tioureia (31)

Sólido branco; 152.66°C; IR (KBr): 3332, 2930, 2852, 1589, 1538, 1410, 1230, 1161, 979, 868, 649, 510, 429 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.17 (d, *J* = 3.78 Hz, 1H), 7.54-7.47 (m, 1H), 7.35-7.29 (m, 2H), 7.28-7.20 (m, 3H), 6.65 (dd, *J* = 5.00 Hz and *J* = 6.95 Hz, 1H), 6.57 (d, *J* = 8.60 Hz, 1H), 5.55 (br s, 1H), 3.97 (q, *J* = 6.30 Hz, 2H), 3.91 (t, *J* = 5.40 Hz, 4H), 3.68 (t, *J* = 5.40 Hz, 4H), 2.98 (t, *J* = 6.87 Hz, 2H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 181.80, 158.45, 147.89, 138.82, 137.72, 128.81, 128.80, 126.71, 113.53, 106.61, 46.89, 46.35, 43.66, 35.18; HR-MS-ESI: *m/z* [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₂₂N₄S: 327.1629; encontrado: 327.1637.

4.1.4. 5,4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)-N-fenetilpiperazina-1-carbotioamida (32)

Sólido branco; 254.33°C; IR (KBr): 3222, 3056, 2842, 1625, 1531, 1459, 1340, 1236, 1184, 997, 919, 869, 738, 700, 499 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.45 (br s, 1H), 7.93 (br s, 1H), 7.30 (t, *J* = 7.25 Hz, 2H), 7.22 (t, *J* = 8.13, 5H), 6.94 (d, *J* = 2.95 Hz, 2H), 3.99-3.89 (m, 4H), 3.77-3.68 (m, 2H), 3.58-3.49 (m, 4H), 2.88 (t, *J* = 7.55 Hz, 2H); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 181.91, 156.22, 139.99, 129.12, 128.83, 126.55, 120.09, 47.37, 46.94, 45.96, 35.25; HR-MS-ESI: *m/z* [M+H]⁺ Calculado para C₂₀H₂₃N₅S: 366.1739; encontrado: 366.1746.

4.1.4.6. N-fenetil-4-(pirimidin-2-il)piperazina-1-carbotioamida (34)

Sólido branco; 156.99°C; IR (KBr): 3291, 3021, 2921, 1585, 1496, 1334, 1257, 1184, 981, 862, 703, 638, 480 cm⁻¹; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.31-8.23 (m, 2H), 7.25 (t, *J* = 7.10 Hz, 2H), 7.17 (t, *J* = 7.48 Hz, 3H), 6.51-6.46 (m, 1H), 5.48 (br s, 1H), 4.00-3.71 (m, 10H), 2.91 (t, *J* = 6.60 Hz, 2H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 181.96, 161.23, 157.74, 138.80, 128.78, 128.75, 126.66, 110.43, 46.86, 46.54, 42.67, 35.12; HR-MS-ESI: *m/z* [M+H]⁺ calculado para C₁₇H₂₁N₅S: 328.1582; encontrado: 328.1589.

4.1.4.7. N-benzil-4-(pirimidin-2-il)piperazina-1-carbotioamida (35)

Sólido branco; 211.54°C; IR (KBr): 3309, 2987, 2861, 1591, 1548, 1375, 1321, 1243, 1018, 935, 862, 752, 700, 597, 509 cm⁻¹; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.39 (d, *J* = 4.71 Hz, 2H), 8.29 (t, *J* = 5.56 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 4.64 Hz, 4H), 7.25-7.20 (m, 1H), 6.66 (dt, *J* = 0.55 Hz and *J* = 4.72 Hz, 1H), 4.83 (d, *J* = 5.46 Hz, 2H), 3.98-3.93 (m,

4H), 3.82-3.77 (m, 4H); ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 182.31, 161.49, 158.41, 140.11, 128.55, 127.68, 127.04, 110.87, 48.84, 47.35, 43.22; HR-MS-ESI: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{S}$: 314.1425; encontrado: 314.1433.

4.1.4.8. 4-(4-hidroxifenil)-N-fenilpiperazina-1-carbotioamida (36)

Sólido branco; 196.83°C; IR (KBr): 3230, 2823, 1589, 1513, 1444, 1322, 1270, 1213, 1139, 1020, 931, 761, 700, 516 cm^{-1} ; ^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.40 (br s, 1H), 8.89 (br s, 1H), 7.35-7.27 (m, 4H), 7.14-7.07 (m, 1H), 6.84 (d, $J = 8.70$ Hz, 2H), 6.68 (d, $J = 8.70$ Hz, 2H), 4.09-3.97 (m, 4H), 3.09-2.98 (m, 4H); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 182.01, 151.83, 144.07, 141.50, 128.47, 125.68, 124.76, 118.71, 116.01, 50.43, 48.49; HR-MS-ESI: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{OS}$: 314.1313; encontrado: 314.1326.

4.1.4.9. N-benzil-4-(tetrahidrofuran-2-carbonil)piperazina-1-carbotioamida (37)

Óleo amarelo; 208.79°C; IR (KBr): 3284, 2865, 2157, 2080, 1631, 1529, 1324, 1199, 1008, 734, 696, 565, 451 cm^{-1} ; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.40-7.27 (m, 5H), 5.88 (t, $J = 4.37$ Hz, 1H), 4.86 (d, $J = 4.90$ Hz, 2H), 4.57-4.51 (m, 1H), 4.11-4.03 (m, 1H), 3.94-3.74 (m, 6H), 3.73-3.65 (m, 1H), 3.64-3.51 (m, 2H), 2.31-2.21 (m, 1H), 2.08-1.85 (m, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 182.45, 170.34, 137.75, 128.84, 128.11, 127.84, 75.99, 69.14, 50.41, 47.47, 46.36, 44.39, 41.17, 28.20, 25.75; HR-MS-ESI: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$: 334.1576; encontrado: 334.1599.

4.1.4.10. N-benzil-4-butilpiperazina-1-carbotioamida (39)

Sólido amarelo; 78.51°C; IR (KBr): 3249, 3054, 2927, 2802, 1602, 1540, 1448, 1373, 1334, 1263, 1201, 1130, 1022, 958, 871, 811, 725, 694, 613, 449 cm^{-1} ; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.37-7.26 (m, 5H), 5.69 (br s, 1H), 4.85 (d, $J = 4.84$ Hz, 2H), 3.81 (t, $J = 5.15$ Hz, 4H), 2.46 (t, $J = 5.15$ Hz, 4H), 2.34 (t, $J = 7.55$ Hz, 2H), 1.50-1.41 (m, 2H), 1.37-1.26 (m, 2H), 0.91 (t, $J = 7.30$ Hz, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 182.03, 137.95, 128.82, 128.14, 127.77, 58.09, 52.61, 50.38, 47.48, 28.94, 20.64, 14.01; HR-MS-ESI: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{S}$: 292.1832; encontrado: 292.1849.

4.1.4.11. 4-butil-N-fenilpiperazina-1-carbotioamida (40)

Sólido branco; 111.85°C; IR (KBr): 3166, 3016, 2923, 1592, 1523, 1448, 1402, 1321, 1220, 1128, 1010, 923, 823, 709, 620 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (br s, 1H), 7.30 (t, *J* = 7.84 Hz, 2H), 7.15-7.06 (m, 3H), 3.80 (t, *J* = 5.08 Hz, 4H), 2.45 (t, *J* = 5.08 Hz, 4H), 2.33 (t, *J* = 7.56 Hz, 2H), 1.49-1.39 (m, 2H), 1.36-1.25 (m, 2H), 0.90 (t, *J* = 7.30 Hz, 3H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 183.08, 140.10, 129.11, 125.07, 122.93, 58.01, 52.53, 49.51, 28.94, 20.62, 14.00; HR-MS-ESI: *m/z* [M+H]⁺ calculado para C₁₅H₂₃N₃S: 278.1675; encontrado: 278.1684.

4.1.4.12. 4-(2-clorofenil)-*N*-fenilpiperazina-1-carbotioamida (43)

Sólido branco; 175.78°C; IR (KBr): 3222, 2809, 1585, 1529, 1479, 1411, 1307, 1218, 1172, 1022, 943, 761, 721, 597 cm⁻¹; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.49 (br s, 1H), 7.39-7.31 (m, 3H), 7.27-7.20 (m, 1H), 7.17-7.11 (m, 3H), 7.03-6.98 (m, 2H), 3.98 (t, *J* = 4.53 Hz, 4H), 3.08 (t, *J* = 4.84 Hz, 4H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 183.57, 148.30, 140.05, 130.75, 129.25, 128.90, 127.76, 125.20, 124.43, 122.83, 120.56, 50.69, 49.88; HR-MS-ESI: *m/z* [M+H]⁺ calculado para C₁₇H₁₈ClN₃S: 332.0913; encontrado: 332.0982.

4.1.4.13. *N*-benzil-4-(2,3,4-trimetoxibenzil)piperazina-1-carbotioamida (44)

Sólido branco; 94.97°C; IR (KBr): 3266, 2927, 2815, 1600, 1540, 1411, 1249, 1093, 1047, 998, 873, 748, 701, 522 cm⁻¹; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.37-7.27 (m, 5H), 6.98 (d, *J* = 8.50 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 8.50 Hz, 1H), 5.73 (br s, 1H), 4.85 (d, *J* = 4.85 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.84-3.80 (m, 4H), 3.54-3.51 (m, 2H), 2.53 (t, *J* = 4.83 Hz, 4H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 182.07, 153.29, 152.64, 142.29, 137.96, 128.81, 128.13, 127.75, 125.33, 107.08, 61.23, 60.81, 56.14, 56.01, 52.12, 50.37, 47.43; HR-MS-ESI: *m/z* [M+H]⁺ calculado para C₂₂H₂₉N₃O₃S: 416.1996; encontrado: 416.2002.

4.1.4.14. *N*-fenil-4-(2,3,4-trimetoxibenzil)piperazina-1-carbotioamida (45)

Sólido amarelo; 145.61°C; IR (KBr): 3417, 3174, 2937, 2796, 1598, 1535, 1492, 1434, 1315, 1230, 1159, 1103, 995, 898, 763, 692, 570, 489 cm⁻¹; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.40 (br s, 1H), 7.33-7.28 (m, 2H), 7.15-7.09 (m, 3H), 6.97 (d, *J* = 8.50 Hz,

1H), 6.63 (d, $J = 8.50$ Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.84-3.81 (m, 4H), 3.52 (s, 2H), 2.53 (t, $J = 4.80$ Hz, 4H); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 183.06, 153.25, 152.64, 142.31, 140.11, 129.10, 125.27, 125.06, 122.95, 107.07, 61.23, 60.81, 56.14, 56.01, 52.13, 49.49; HR-MS-ESI: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: 402.1839; encontrado: 402.1845.

4.1.4.15. 4-(4-hidroxifenil)-N-(3,4,5-trimetoxifenil)piperazina-1-carbotioamida (46)

Sólido branco; 236.51°C; IR (KBr): 3438, 3158, 2940, 1604, 1508, 1463, 1322, 1216, 1126, 1031, 931, 840, 728, 555 cm^{-1} ; ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.30 (br s, 1H), 8.88 (br s, 1H), 6.83 (d, $J = 8.88$ Hz, 2H), 6.69-6.65 (m, 4H), 4.00 (t, $J = 4.65$ Hz, 4H), 3.73 (s, 6H), 3.64 (s, 3H), 3.03 (t, $J = 4.65$ Hz, 4H); ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 181.70, 152.65, 151.78, 144.12, 137.24, 134.89, 118.66, 115.99, 103.56, 60.54, 56.31, 50.40, 48.45; HR-MS-ESI: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 404.1631; encontrado: 404.1638.

4.2. Cultivo celular e tratamento com os derivados de tioureias

As linhagens murinas de macrófagos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) e J774A.1 (ATCC TIB-67) foram cultivados em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Gibco/ Invitrogen, NY, USA) e acrescido de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina (GibcoBRL) e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B (Sigma-Aldrich), sendo mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Para o cultivo de J774A.1 foi adicionado ao meio de cultura acima 2mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 1mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich). Quando em experimentação, os macrófagos RAW 264.7 e J774A.1 (5×10^5 células/mL) foram plaqueados em placa de 96 pocos com 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de meio DMEM-F12 suplementado com 2% SFB (sem acréscimo de antibiótico), na presença ou ausência dos derivados de tioureias (25, 50, 100 ou 200 μM) e/ou LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Escherichia coli* 055:B5; Sigma-Aldrich, USA). A placa foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO_2 e após 24 h, o sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação dos parâmetros inflamatórios.

4.2.1. Quantificação da produção de NO

A produção de NO pelos macrófagos foi estimada indiretamente, medindo-se a concentração de nitrito no meio de cultura. Cinquenta microlitros do sobrenadante da cultura de macrófagos RAW 264.7 tratada e estimulada conforme item 4.2 foram acrescidos de 50 μ L de reagente de Griess (p-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico, Sigma Aldrich). Após 10 min, a absorbância foi mensurada a 570 nm em espectrofotômetro de placa (Epoch UV-Vis, Biotek, USA). A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada em μ M utilizando como referência uma curva de nitrito de sódio decrescida do valor obtido com os aditivos sem células (GRIESS, 1864). A substância padrão, L-MMMA (Acetato de N^G- metil-L-arginina) (**Figura 12**) conhecido pela inibição não seletiva da NOS, foi utilizado, na concentração de 20 μ g/mL ($40,86 \pm 1,06\%$, $IC_{50} 78,3 \pm 6,5 \mu$ g/mL) para comparação da atividade inibitória com as apresentadas pelos derivados de tioureias em estudo. Em concentrações maiores, a substância apresentou citotoxicidade elevada e em concentrações menores não foi capaz de manter sua atividade inibitória (VENTURA, 2015b). As quantidades obtidas em μ M de NO no sobrenadante de cada amostra foram comparadas ao controle negativo de produção de NO, na cultura de macrófagos sem estímulo e tratamento, e ao controle positivo de produção de NO, na cultura de macrófagos estimulados com LPS e não tratados.

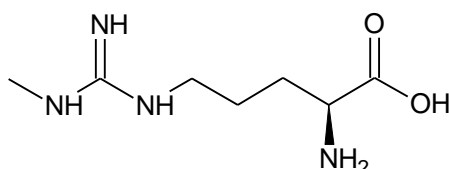


Figura 12- Estrutura química do inibidor não seletivo da NOS, L-MMMA (VALLANCE e LEIPER, 2002).

4.2.2. Avaliação da viabilidade celular em cultura de macrófagos

A avaliação da viabilidade da cultura de macrófagos tratada com os derivados de tioureias foi efetuado através da análise do potencial de células metabolicamente ativas em reduzir o 3-(4,5dimetiliazol-2-il)-2,5- difeniltetrazol (MTT) a um cristal de formazan. Após 24 h do tratamento da cultura celular de RAW 264.7 conforme descrito no item 4.2, 10 μ L/poço da solução de MTT (5 mg/mL, Sigma Aldrich) foi acrescido a cultura e incubado por 2 h a 37°C e 5% CO₂. Posteriormente, o sobrenadante da placa de cultivo foi removido e os cristais de formazan obtidos foram solubilizados com 100

uL/poço de solução de isopropanol adicionado de ácido clorídrico (HCl) (4mM) (MOSMANN, 1983). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 570 nm (Epoch UV-Vis, Biotek, USA). O percentual de viabilidade celular obtido através do método do MTT foi convertido à percentual de citotoxicidade utilizando como referência os valores obtidos nos controles utilizados, segundo a fórmula: $100 - ((D.O._{amostra} - D.O._{c+}) * 100 / D.O._{c-} - D.O._{c+})$. Como controle positivo (C+) de mortalidade foi utilizado a cultura de macrófagos estimulados e não-tratados acrescida de 10 µL de Triton X-100 a1% e como controle negativo (C-), a cultura de macrófagos estimulados e não-tratados. Ressalta-se que o controle foi tratado com o solvente DMSO (Sigma Aldrich) utilizado na mesma proporção da diluição das tioureias.

4.2.3. Quantificação da produção das citocinas TNF-α e IL-1β

A presença das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulada e tratada (conforme descrito no item 4.2) foi quantificada separadamente utilizando kits comerciais de ELISA (ensaio de imunoadsorção ligado à enzima) tipo sanduíche (R&D Systems, MN, USA) e a execução experimental ocorreu segundo o protocolo do fabricante. Como controle positivo da produção de ambos mediadores foi utilizado o sobrenadante da cultura de macrófagos estimulada e não tratada e como controle negativo, o sobrenadante da cultura celular não estimulada e não tratada.

4.2.4. Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante dos derivados de tioureia mais ativos em inibir a produção de NO em cultura de macrófagos estimulada foi utilizado como doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP) diluído em PBS estéril a 100 mM. O método foi previamente padronizado quanto à concentração de SNP a ser utilizada e o tempo de incubação para maior proximidade com o obtido no ensaio celular em termos de quantidade em micromolar de NO (CALIXTO, 2016). Cinco microlitros da solução de SNP (5mM) foi adicionada a 45 µL do meio de cultura DMEM-F12 acrescido dos derivados de tioureias ou do flavonoide rutina (**Figura 13**), conhecido por sua capacidade sequestradora de NO, nas concentrações de 25, 50, 100 ou 200 µM. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 1,5 h na presença de luz. Após este período, o ensaio de Griess foi efetuado (como descrito no item 4.2.1) (ZHAI et al.,

2009). As quantidades obtidas em μM de NO no meio de cultura para cada amostra foram comparadas ao controle negativo, somente meio de cultura, e ao controle positivo, meio de cultura acrescido de SNP.

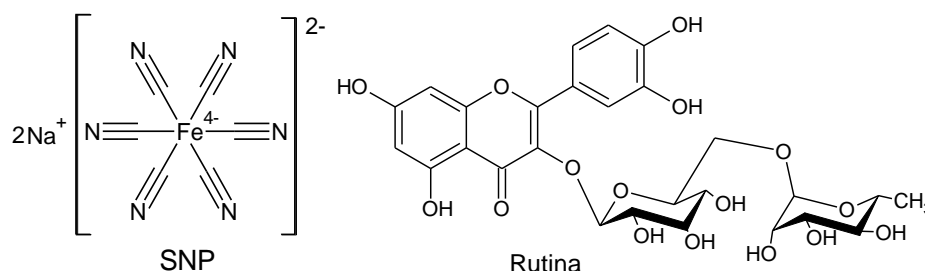


Figura 13 - Estrutura química do nitroprussiato de sódio e do flavonoide rutina (COUTINHO et al., 2009; ZHAI et al., 2009).

4.2.5. Avaliação da capacidade dos derivados de tioureia inibirem a expressão enzimática da iNOS

Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados na concentração de 2×10^7 células/mL com meio DMEM-F12 sem antibiótico e 10% SFB em placas de Petri e incubados por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, os macrófagos confluentes foram estimulados com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) e tratados com os derivados de tiureias mais ativos em inibir a produção de NO em cultura celular estimulada na concentração de 50 e 100 μM (concentração selecionada devido a não interferência da citotoxicidade e a presença do potencial de inibição da produção do NO) por mais 24 h a 37°C e 5% de CO₂.

Para a confirmação da presença do estímulo celular após 24 h, o sobrenadante da cultura foi coletado e avaliado pelo método de Griess. O sobrenadante de cada placa de petri foi removido e a monocamada celular foi lavada com PBS 1X para posterior remoção com auxílio de *cell scraper* (espalhadores ou raspadores de células), sendo transferida para microtubos que foram centrifugados (1200 rpm, 5') para obtenção do sedimento de células. Após remover o sobrenadante, as células foram lisadas com tampão de lise (10% SDS, 20% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 2% azul de bromofenol e 1 M Tris HCl, pH 6.8), contendo inibidor de proteases (2 mM de AEBSF, 0,3 μM de aprotinina, 116 μM de bestatina, 14 μM de E-64, 1 μM de leupeptina e 1 mM de EDTA/ Sigma Aldrich) e a concentração de proteínas em cada lisado foi estimada pelo método de Bradford.

Sessenta microgramas do lisado celular foram submetidos ao gel de 10% SDS-poliacrilamida no sistema MiniVE Vertical Eletrophoresis System (GE- Healthcare).

Após a eletroforese, as proteínas devidamente separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando tampão fosfato (Amersham Hybond-ECL, GE-Healthcare). Posteriormente, a membrana foi bloqueada com 2,5% de albumina sérica bovina (BSA) dissolvida em TBS acrescido de Tween 0,05% (PBST), overnight a 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada 3X com PBST 0,05% e incubadas com anticorpo primário anti-iNOS monoclonal (BD Transduction Laboratories), 1:1000, ou com anticorpo monoclonal anti-COX-2 (BD Transduction Laboratories), 1:500, ambos diluídos em TBST 0,05% acrescido de 1% de leite desnatado, por 1h, a temperatura ambiente.

Em seguida, a membrana foi lavada 3X com PBST 0,05% e incubada com anticorpo secundário anti-mouse IgG-peroxidase respectivamente (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology) em TBS por 1 h, a temperatura ambiente. A membrana foi então lavada três vezes com TBST 0,05% e revelada com solução de 0,5 mg de 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich) em 50 mM de Tris HCl, pH 7,5 e 0,03% de peróxido de hidrogênio.

O peso molecular das bandas foi comparado ao peso molecular padrão (Full Range Rainbow - GE-Healthcare). As bandas proteicas reveladas foram digitalizadas utilizando scanner de alta resolução e a análise densitométrica foi realizada através do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD). O valor para a condição estimulada (células estimuladas com LPS) foi inferido como 1 e as outras condições foram calculadas em correlação com este parâmetro.

4.3. Cultivo micobacteriano

As cepas de *M. tuberculosis* e *M. kansasii* utilizadas neste estudo foram genotipadas e cedidas pelo Dr. Philip Suffys (Instituto Oswaldo Cruz/RJ). A cepa laboratorial *M. tuberculosis* H37Rv e a cepa *Beijing*, *M. tuberculosis* M299, proveniente de um isolado clínico de paciente com TB em Moçambique foram cultivadas em meio *Middlebrook* 7H9 (DIFCO, Detroit, MI), acrescido de 0,05% Tween 80 suplementado com 10% de ADC (albumina, dextrose, catalase- Difco Laboratories) durante 7 dias até a fase mid-log, em estufa bacteriológica à 37°C e 5% de CO₂. Enquanto a cepa de referência Mkan ATCC 12478 e os isolados clínicos de pacientes (8835 e 10953) foram crescidas em meio de cultura *Middlebrook* 7H9 acrescido de 0,05% glicerol e de 10% de ADC, sendo também mantidas em estufa sob os mesmos parâmetros utilizados no cultivo de *Mtb*.

O monitoramento do crescimento micobacteriano foi efetuado através da medida de densidade óptica (D.O 600nm), por espectrofotometria (Biospectro – modelo SP-220).

4.3.1. Ajuste da concentração micobacteriana

Um criotubo com alíquotas de 1 mL (10^7 a 10^8 bactérias) de cada uma das cepas foram retiradas do estoque acondicionado à -70°C . Antes da execução dos experimentos, as culturas de Mtb mantidas em cultivo por 7 dias e de Mkan por 5 dias passaram por 3 ciclos intercalados de agitação novórtex (BIOMATIC) e banho de ultrassom por 1 min (Ultrasonic Maxi cleaner 800–UNIQUE) para dispersão dos grumos e obtenção de uma suspensão homogênea. O ajuste da concentração bacteriana utilizada nos experimentos foi realizado através da leitura prévia da densidade óptica a 600 nm de 1 mL da suspensão das culturas em espectrofotômetro (Biospectro – modelo SP-220) subtraído da D.O do meio de cultura 7H9 somente suplementado. Após quantificação da D.O. da suspensão bacteriana de cada cepa, foi realizada a diluição das suspensões de Mtb para a D.O. 0,100 e as suspensões de Mkan foram diluídas para a D.O. 0,200. A diluição das suspensões obedeceu ao critério de relação da densidade óptica *versus* número de bacilos, no qual a D.O 0,100 para as cepas *M. tuberculosis* H37Rv e M299 corresponde a 2×10^7 bacilos/mL e a D.O 0,200 para as cepas *M. kansasii* 12478/ATCC, 8835 e 10953 correspondem a 5×10^7 , 4×10^7 e 2×10^7 bacilos/mL respectivamente.

4.3.2. Avaliação da atividade antimicobacteriana

Durante a fase logarítmica de crescimento das cepas de *Mycobacterium* com as D.O. ajustadas conforme o item 4.3.1, 50 μL da suspensão de cada cepa foram plaqueados em placa de 96 poços (1×10^7 CFU/mL) e acrescido de cinquenta microlitros dos derivados de tioureias diluído em concentração 2X maior do que a concentração final desejada (25, 50, 100 e 200 μM para todas as cepas micobacterianas). A placa foi então incubada a 37°C por 5 dias para ambas as cepas de Mtb e Mkan. Após este período, foram adicionados 10 μL /poço de solução de MTT em cada poço da placa em análise por 3 horas, após esse tem, 100 μL de tampão de lise (20% p/v de SDS, 50% v/v de DMF, Sigma Aldrich) foi adicionado para diluição dos cristais de formazan e eliminação do bacilo. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 570 nm

(CAVIEDES et al., 2002). Como controle positivo de crescimento foi utilizado meio de cultura 7H9 suplementado acrescido de bactérias e não tratado e como controle negativo, somente meio de cultura suplementado.

O potencial dos derivados de tioureias contra Mtb foi comparado a rifampicina, fármaco padrão para tratamento da TB. A rifampicina foi utilizada na concentração de 0,0039 – 1,2µM para a cepa H37Rv e 0,009 - 12 µM para a cepa M299. Toda manipulação e cultivo das micobactérias obedeceram às normas de biossegurança de nível III.

4.3.3. Infecção da cultura de macrófagos, tratamento com os derivados de tioureias e quantificação do crescimento micobacteriano intracelular

Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados na concentração de 5×10^5 células/mL, e 100 uL foram adicionado a cada poço de placa de 96 poços 24 h antes da infecção micobacteriana, com meio DMEM-F12 sem antibiótico e suplementado com 10% SFB. Após este período, a cultura de macrófagos foi infectada com a suspensão micobacteriana de Mtb H37Rv previamente preparada conforme item 4.3.1 e com a densidade óptica ajustada para 0,1. A cultura de macrófagos foi infectada na razão de multiplicidade da infecção (MOI) 1:1 (macrófago/bactéria). A fagocitose foi permitida por 3 h, e logo após, as micobactérias extracelulares foram removidas por 3 lavagens com PBS 1X estéril. Posteriormente, a monocamada celular infectada foi tratada por 4 dias com os derivados de tioureias nas concentrações de 25, 50 e 100 µM. No quarto dia pós infecção, as células foram lisadas com solução de saponina 1% por 20 min (Sigma Aldrich) para liberar as bactérias intracelulares. O lisado da cultura foi agitado, sonificado em banho de ultrassom e diluído em série de 10 vezes em PBS 1X estéril. Cinquenta microlitros das alíquotas do lisado celular foram semeadas em duplicata em placas de ágar 7H10 suplementadas. As placas foram incubadas por 21 dias à 37°C, e após foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (CFU). O número de colônias quantificadas foi utilizado para cálculo da concentração CFU/mL. Controle positivo, macrófagos infectados e não tratados, e controle negativo macrófagos não infectados e não tratados.

4.3.4. Avaliação do potencial inibitório dos derivados de tioureia na viabilidade de agregados extracelulares de *M. tuberculosis*

Macrófagos RAW 264.7 foram cultivados e semeados conforme descrito acima (item 4.3.3) e uma variação dos métodos de KALSUM et al. (2017) foi utilizado. Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com Mtb M299 (cepa de alta virulência) em MOI 10:1 (macrófago/bactéria) por 3 h, seguido por 3 lavagens com PBS para remoção de bactérias extracelulares não fagocitadas. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L de DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB a monocamada de células infectadas que foram incubadas a 37°C por 12 dias. Neste período a cada 2 dias foi realizada a observação microscópica da cultura infectada para acompanhamento da morte celular necrótica dos macrófagos e liberação dos agregados micobacterianos extracelulares. No 12º dia após a infecção, para garantir a liberação dos agregados de Mtb, foi adicionada solução de saponina a 1% a cada poço por 20 min. Após esse período, agregados extracelulares de Mtb disponíveis no meio de cultura foram tratados com os derivados (25, 50 e 100 μ M) por 4 dias. As suspensões bacterianas foram recuperadas no dia 4 de tratamento e, em seguida, foram vigorosamente agitadas em vórtex por 1 min intercalado com sonicação em banho de ultrassom três vezes por 50 s cada para romper os aglomerados bacterianos e obter uma suspensão homogênea. As suspensões bacterianas foram diluídas em série em PBS 1X e semeadas em ágar Middlebrook 7H10 suplementado com 10% de OADC. Após 21 dias, o número de colônias bacterianas foi contabilizado e o número de colônias foi expresso em CFU/mL.

4.4.1. Relação estrutura-atividade e estudos *in silico* de ADMET

As estruturas químicas 3D dos derivados de tioureia foram construídas e os cálculos de modelagem molecular foram realizados usando o programa SPARTAN'10 (Wavefunction Inc, CA, 2000). Os derivados em seus estados neutros foram submetidos a uma busca sistemática por meio de cálculo por mecânica molecular (MMFF), para obtenção das conformações do estado mínimo de energia. Posteriormente, a otimização da geometria desses derivados foi realizada no vácuo, utilizando o método semi-empírico RM1. Para a obtenção dos descritores moleculares, todos os derivados de tioureia foram submetidos ao cálculo de um único ponto utilizando o método DFT e um funcional B3LYP com conjunto de base 6-311G*. Algumas propriedades foram obtidas para esses derivados, tais como valores de energia HOMO (Orbital molecular de maior energia ocupado por elétrons) e LUMO (Orbital molecular de menor energia não ocupado por elétrons), é coeficiente orbital e densidade, mapas de potencial eletrostático molecular (MEPs), momento de dipolo e

cargas atômicas parciais. As isosuperfícies tridimensionais dos MEPs na superfície de contato de van der Waals representam potenciais eletrostáticos sobrepostos a uma superfície de densidade eletrônica constante ($0,002 \text{ e} / \text{au}^3$) e foram gerados em uma faixa de -170 a $+220 \text{ KJ/mol}$. Esses valores de superfície codificados por cores fornecem uma indicação do tamanho molecular geral e da localização dos potenciais eletrostáticos negativos (vermelho) ou positivos (azul). Por fim, as estruturas químicas 2D de derivados de tiourea promissores e rifampicina foram submetidas a análises *in silico* de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicologia (ADMET) usando o programa ADMET Predictor™ (Simulation Plus Inc., Lancaster, CA, EUA). Os metabólitos foram gerados a partir da probabilidade de reações de oxidação para diferentes isoformas de Citocromo P450 (CYP). Parâmetros de toxicidade específicos foram previstos, como hepatotoxicidade, mutagenicidade e toxicidade reprodutiva. A elevação de biomarcadores relevantes como fosfatase alcalina (ALP), aspartato transaminase (AST), alanina transaminase sérica (ALT), gama-glutamyltransferase (GGT) e lactato desidrogenase (LDH) foi investigada. Além disso, a mutagenicidade foi predita com base no Teste de Ames (MODI et L., 2012).

4.5. Infecção experimental de camundongos C57Bl/6 com cepa Mtb de hipervirulência

Camundongos da linhagem C57Bl/6, livres de patógenos específicos (SPF), machos, com idade entre 6 e 8 semanas, foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Os animais foram infectados e mantidos em micro-isoladores, distribuídos organizadamente em estantes ventiladas no biotério de Biossegurança nível III do Laboratório de Biologia do Reconhecer (CBB/ UENF) sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Elena Lassounskaia. O modelo de infecção dos camundongos foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança da UENF (C-CIBio-18/03, 2017) e pela Comissão de Ética em Uso Animal, CEUA, da UENF (protocolo nº 350-2017). Antes do procedimento de infecção experimental foi efetuada a preparação do inóculo. A cepa de Mtb M299 foi previamente cultivada e a densidade óptica mensurada de acordo com o **item 4.3.1** Esta cepa foi escolhida para infecção dos animais por desenvolver no animal infectado severa patologia pulmonar, com alta carga bacteriana e extensivo dano tecidual (AMARAL et al., 2014). A dose de infecção de 100 bacilos (baixa dose) num volume de $50 \mu\text{L}$ foi realizada para cada animal e

confirmada por contagem de CFU em placas de ágar 7H10 inoculadas com o mesmo volume de inóculo instilado na traqueia de cada animal. No procedimento de infecção experimental, os animais foram inicialmente anestesiados por via intraperitoneal (i.p.), pela aplicação de uma alíquota de 90-120 μL da mistura de Anazedan (xilazina, 15 mg/kg, VeTbrands) e Dopalen (ketamina, 110 mg/kg, VeTbrands) diluídos em PBS estéril. Para certificação da eficácia da analgesia nos animais, estes foram submetidos a testes de padrão de reflexo de acordo com as normas de bioética de experimentação animal.

O procedimento cirúrgico foi iniciado com uma incisão transversal de 0,5 cm na pele da região do pescoço do animal para exposição da traqueia, onde foi injetado o volume de 50 μL ($\sim 10^2$ bacilos) entre os anéis cartilagosos mais proeminentes, com auxílio de uma seringa hipodérmica 0,3 mL (Terumo, SP, Brasil). Os animais controles receberam 50 μL de PBS 1X estéril. Logo após a infecção intratraqueal (i.t.), a incisão foi suturada. Os animais infectados foram separados em grupos com seis animais em cada microisolador e supervisionados diariamente quanto aos sinais vitais e eutanasiados (inalação de CO_2), se requerido, seguindo o protocolo de bioética animal, quando observado perda de peso, ausência de mobilidade e dificuldade de respiração a fim de minimizar o sofrimento.

4.5.1. Tratamentos e grupos experimentais

Priorizando o estabelecimento da infecção pelo bacilo e desenvolvimento da resposta imune, o tratamento dos animais foi iniciado após 15 dias do procedimento de infecção, por via intraperitoneal (20 μL /animal), alternando o lado de aplicação no abdômen, diariamente durante 15 e 30 dias de tratamento. Os animais infectados foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos de 6 animais cada. Grupos experimentais de acordo com o protocolo a que foram submetidos:

Grupo 1 - Animais não infectados.

Grupo 2 - Animais somente infectados por Mtb e não tratados.

Grupo 3 - Animais não infectados que receberam aplicação intraperitoneal diária do derivado **28** (20 mg/Kg).

Grupo 4 - Animais não infectados que receberam aplicação intraperitoneal diária do derivado **29** (20 mg/Kg).

Grupo 5 - Animais infectados por Mtb que receberam aplicação intraperitoneal diária do derivado **28** (20 mg/Kg).

Grupo 6 - Animais infectados por Mtb que receberam aplicação intraperitoneal diária do derivado **29** (20 mg/Kg).

Grupo 7 - Animais infectados por Mtb que receberam aplicação intraperitoneal diária de **rifampicina** (10 mg/Kg).

Após o período de 15 e 30 dias de tratamento os animais foram eutanasiados por exposição em câmara de CO₂ e os seguintes parâmetros averiguados: carga bacilar (CFU) no pulmão, alterações teciduais e celulares no pulmão (macropatologia e histopatologia/ morfometria), relação entre o peso dos pulmões e o número de células contabilizados, produção de citocinas *ex vivo* a partir das células pulmonares e análise fenotípica do infiltrado celular nos pulmões por citometria de fluxo.

4.5.2. Obtenção de células pulmonares e dos bacilos e análises de mediadores inflamatórios produzidos por estas células *ex vivo*

Para a obtenção das células pulmonares foram coletado os lóbulos inferior esquerdo e os lóbulos superior, médio e inferior direito dos pulmões dos camundongos infectados ou não, os quais foram pesados e adicionados à placa de petri (JProlab, 21 cm²) com 3 mL de meio de cultura RPMI (Gibco/Invitrogen, NY, USA). Com o auxílio de pinças curvas, o órgão foi fragmentado e mantido acondicionado no gelo. A seguir foi adicionado 1mL de solução de digestão tecidual (1 µg/mL de liberase Blendzyme 2 e 0,1 µg/mL de DNase de pâncreas bovino - Sigma Aldrich) incubando-se a 37°C e 5% de CO₂, por 40 minutos sob agitação. Após este período, os órgãos imersos na solução de digestão foram dissociados utilizando seringas de 10mL por 10 ciclos de homogeneização e os homogenatos obtidos filtrados em *cell strainer* com poro de 40 µm (BD Bioscience, CA, USA).

O homogenato isento de matriz tecidual foi destinado à quantificação micobacteriana através da diluição decimal seriada e semeadura em placa de ágar 7H10 suplementado com OADC. As placas foram lacradas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 21 dias para posterior contagem das unidades formadoras de colônias.

O restante do homogenato foi processado para obtenção de células. As hemácias foram removidas através de tratamento com tampão de lise ACK (0,144 M

NH₄Cl, 0,0169 M Tris base, pH 7.4) e as suspensões celulares foram lavadas com 10 mL de PBS1x estéril com 10% SFB e ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 0,05 mg/mL de gentamicina sendo mantidas no gelo. Uma alíquota desta suspensão foi adicionada de azul de Trypan 0,2% solubilizado em paraformaldeído 1% por 1 minuto para contagem celular. Após a quantificação e ajuste da concentração celular (5×10^5 células/mL), as células foram plaqueadas e cultivadas *ex vivo* por 48 h para posterior coleta de sobrenadante e quantificação da produção espontânea de mediadores inflamatórios.

A produção das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 foram quantificados separadamente utilizando kits comerciais de ELISA (ensaio de imunoadsorção ligado à enzima) tipo sanduíche (R&D Systems, MN, USA) e a execução experimental ocorreu segundo o protocolo do fabricante.

O mediador Inflamatório NO foi quantificado através do método de Griess, de acordo com o **item 4.2.1**.

4.5.3. Análise macroscópica e histopatológica do pulmão

A avaliação da macro e micropatologia foram realizadas para o pulmão, nos 30 e 45 dias após a infecção. O lóbulo superior esquerdo do pulmão de cada animal foi selecionado para a análise histológica sendo fixado por no mínimo 96 h em formol 10% tamponado. A macropatologia foi avaliada através da pesagem dos pulmões dos animais, comparando o peso dos órgãos entre os animais somente infectados e os animais infectados e distintamente tratados. Após a fixação, o lóbulo direito do pulmão de cada animal foi fotografado com escala em centímetros para a avaliação macroscópica das mudanças morfológicas do órgão. A massa relativa foi calculada pela razão entre o peso do pulmão de cada animal infectado (tratado ou não) e a média do peso do pulmão dos animais controle. Os estudos histopatológicos para avaliar a micropatologia foram realizados nos cortes dos tecidos a partir da coloração com hematoxilina-eosina (H&E) para a visualização das alterações teciduais e pelo método de Ziehl-Neelsen para detecção da presença de bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR).

4.5.4. Método de coloração com Hematoxilina-Eosina (H&E)

A técnica de coloração foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, Patologista Clínico do Laboratório de Sanidade Animal, do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

O lóbulo superior do pulmão esquerdo dos camundongos infectados ou não foi retirado para análises histopatológicas 30 e 45 dias após a infecção. Após a fixação de no mínimo 24 horas em formol tamponado, os lóbulos foram lavados com água destilada por 30 minutos, seguido de banhos crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 100%) por 1 h em cada concentração e, então, submetidos a dois banhos contendo xilol por 1 h cada, estando estes, preparados para a inclusão na parafina, por 30 minutos. Após o procedimento do Histotec (fixação e clarificação), as peças foram emblocadas em parafina e levadas ao gelo. Os blocos rígidos foram seccionados no micrótomo (Leica) com espessura de 4-5 µm, colocado em banho-maria e posicionados em lâmina. As lâminas contendo os cortes foram embebidas em duas sequências de xilol por 3 minutos cada, e logo imersas em álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por 1 minuto em cada concentração para então serem corados com hematoxilina por 3 minutos e eosina por 50 segundos. Novamente, foram repetidos os banhos em álcool (70%, 80%, 90% e 100%) por 1 minuto em cada concentração e em xilol por 3 minutos. Os cortes então sofreram fixação permanente com Permout entre lamina e laminuna.

4.5.5. Método de Ziehl-Neelsen

Os órgãos foram fixados, clivados e emblocados como descrito no item 4.4.4. A lâmina contendo o corte do tecido foi imersa em solução aquecida de carboxifuccina por 30 min. Logo após, a mesma foi lavada em água corrente e tratada com álcool-ácido 1% até atingir a tonalidade rósea. Os tecidos foram lavados novamente em água corrente por 8 min, com posterior imersão em 10 mL da solução de azul de metileno (4mM de azul de metileno em álcool etílico 95%) acrescido de 90 mL de água destilada. Os cortes foram submetidos à fixação permanente com Permout e analisados por microscopia óptica (microscópio Zeiss-Axiplan).

4.5.6. Análise morfométrica do tecido pulmonar

Os cortes corados com H&E foram analisados por microscopia óptica (microscópio Axioplan2, Carl Zeiss, Inc.) e as imagens dos cortes capturadas através do dispositivo Axiocam MCR-5 (Zeiss). Para a análise morfométrica, as imagens foram

obtidas numa ampliação de 100X e avaliadas pelo programa ImageJ (NIH, Bethesda, MD) em relação à área de inflamação (área de pneumonia) presente em cada imagem. As imagens coloridas foram convertidas em escala de preto e branco para permitir a identificação de áreas aeradas, como os alvéolos (em preto) e áreas de tecido inflamado e não inflamado, em branco. Para quantificar a porcentagem de área não aerada (área branca), a média das porcentagens de área de 10 fotos da secção pulmonar dos camundongos foi calculada e para quantificar a porcentagem de área inflamada (área de pneumonia), a média do percentual da área de tecido do pulmão controle foi subtraída do percentual da área de tecido pulmonar de cada grupo infectado.

4.6. Análise fenotípica do infiltrado celular pulmonar

A partir do homogenato celular obtido conforme descrito no **item 4.5.2**. Foi quantificado e ajustado para a concentração celular de $2,5 \times 10^5$ células/mL para cada amostra a ser analisada. As células foram centrifugadas (300 g, 5 min, 4°C) e ressuspensas em solução de Fc-Block diluído em tampão de citometria (PBS 1x suplementado com 1% de SFB) por 5 min. Após as células foram lavadas em tampão de citometria e foi adicionado uma combinação de anticorpos monoclonais conjugados a compostos fluorescentes, por 30 minutos: CD11b-PE, Ly6G-PerCP, CD11c-APC, Ly6C-FITC (BD Pharmingen, USA). Após este período, as células foram lavadas com tampão de citometria por três vezes e fixadas com 2% de paraformaldeído por 24 h para posterior análise por citometria de fluxo (BD FACS Calibur, software CellQuest Pro). Foram efetuadas a aquisição de 20.000 eventos utilizando-se uma janela de análise (gate) a partir dos parâmetros FSC (volume celular) e SSC (granulosidade celular).

4.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPadPrism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) e as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os efeitos simultâneos de dois fatores foram analisados por ANOVA e pelo teste de Bonferroni. One-way ANOVA e o teste de Tukey foram utilizados para avaliar os efeitos de um único parâmetro. Os valores de IC_{50} , CC_{50} e MIC foram calculadas por análise de regressão não linear do log

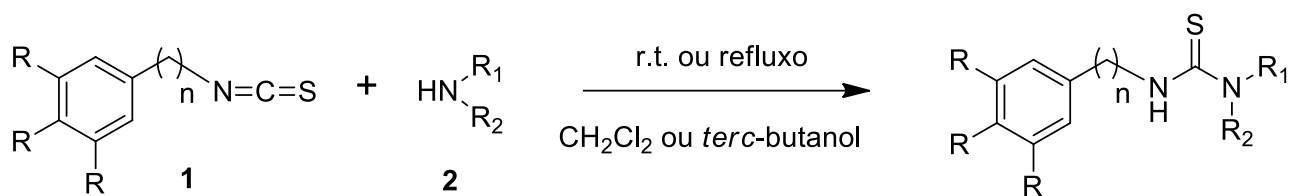
[concentração] / curvas de inibição de três experimentos diferentes usando o GraphPadPrism 4. O índice de seletividade foi calculado como a razão do CC_{50} em relação ao MIC contra *M. tuberculosis* (CC_{50}/MIC_{50}).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese de tioureias

Dentre as diferentes metodologias de obtenção de derivados de tioureia, a principal delas é a reação de isotiocianatos com aminas, devido aos seus elevados rendimentos e à possibilidade de se obter uma grande diversidade estrutural de derivados de tioureia (KHAN et al., 2020; STEPPELER et al., 2020). Desta forma, dois conjuntos de derivados de tioureia foram obtidos conforme resumido nos **Esquemas 1** e **2**. Os derivados de tioureia **1-21**, **23-29** foram preparados através da reação de isotiocianato de fenil (**1a**), isotiocianato de benzila (**1b**), isotiocianato de fenetil (**1c**) ou 3,4,5-trimetoxifenil isotiocianato (**1d**) e a amina **2** apropriada, em uma solução de diclorometano ou terc-butanol (**Esquema 1; Tabela 1**). A reação entre aminas aromáticas e isotiocianatos exigiu um período de refluxo devido à menor reatividade do sistema, utilizando terc-butanol como solvente polar e não nucleofílico (VIANA et al., 2017). Além disso, as tioureias piperazina (**22**, **30-46**) foram sintetizadas através da reação do isotiocianato **1a-d** e um excesso de piperazina 3 N-monossubstituída, em uma solução de diclorometano à temperatura ambiente (**Esquema 2; Tabela 2**). Todos os derivados foram obtidos com bom rendimento (superior a 70%) e não necessitaram de qualquer purificação adicional após o isolamento a partir da mistura de reação inicial, demonstrando boa viabilidade da estratégia de síntese empregada. Além disso, esta abordagem de síntese proporcionou quinze derivados de tioureia (**3**, **10**, **28**, **31**, **32**, **34-37**, **39**, **40**, **43-46**) ainda não descritos na literatura.

Todos os derivados de tioureia sintetizados foram completamente caracterizados por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, FT-IR e HR-MS. É possível observar a formação de tioureias nos espectros de RMN de ^1H por meio da presença dos sinais referentes a ligação dos átomos de hidrogênio aos átomos de nitrogênio condizentes com o grupamento orgânico da tioureia, com deslocamentos químicos geralmente entre 5,50 e 6,50 ppm, e 7,50 e 8,50 ppm. Também é possível observar nos espectros de RMN de ^{13}C os deslocamentos químicos relacionados ao tiocarbonil (C=S) na faixa entre 178 e 184 ppm (AGUIAR et al., 2011; LOURENÇO et al., 2015; VIANA et al., 2017).



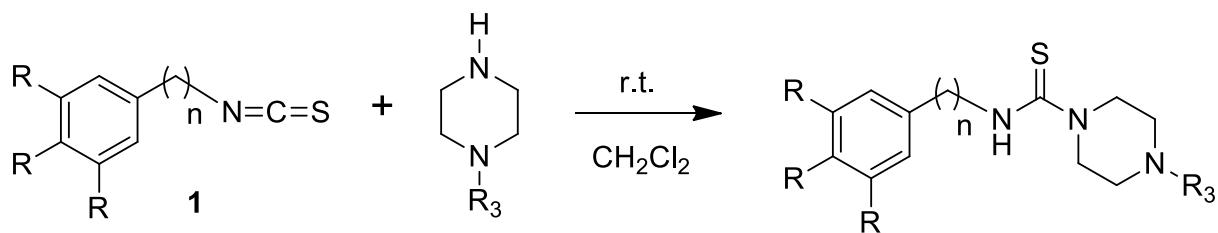
1a (n=0; R=H)

1b (n=1; R=H)

1c (n=2; R=H)

1d (n=0; R=OCH₃)

Esquema 1 - Estratégia de síntese das tioureas 1-21, 23-29.



1a (n=0; R=H)

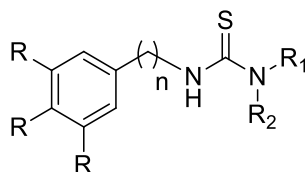
1b (n=1; R=H)

1c (n=2; R=H)

1d (n=0; R=OCH₃)

Esquema 2 - Estratégia de síntese das tioureas 22, 30-46.

Tabela 1 - Condições de reação e rendimentos para tioureias 1-21, 23-29.



Tioureas ^a	Método ^b	Tempo (h)	Rendimento (%) ^c	R	R ₁	R ₂	n
1	B1	4.0	97	H	Fe	H	0
2	A1	7.0	91	H	CH ₂ CH ₂ OH	H	0
3	A2	4.0	92	H	(S,R,R,R)- CH ₂ [CH(OH)] ₄ CH ₂ OH	Me	1
4	B1	8.0	82	H	3,4,5-OMe-Fe	H	0
5	B1	10.0	85	H	3,4-Metilenodioxi -Fe	H	1
6	B1	6.0	82	OMe	3,4,5-OMe-Fe	H	0
7	B2	20.0	92	H	Piridina-2-il	H	0
8	A1	2.0	70	H	4-Morfolinil	-	2
9	A1	2.0	99	H	Bu	H	1
10	B1	3.0	99	H	3,4,5-OMe-Fe	H	2
11	A1	4.0	80	OMe	Cy	H	0
12	A1	3.0	93	H	<i>i</i> Pr	H	1
13	A2	6.0	70	H	NHCOFe	H	1
14	B2	8.0	99	H	Piridin-2-il	H	1
15	B1	8.0	75	H	3-OH,4-COOH-Fe	H	1
16	A2	6.0	85	H	NHCO-Piridin-4-il	H	1
17	A1	7.0	78	H	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	0
18	A1	4.0	87	H	Et	Et	2
19	A1	5.5	88	H	Ci	H	2
20	A1	5.0	90	H	<i>i</i> Pr	H	2
21	B1	10.0	70	H	Fe	Fe	1
23	B2	4.0	96	H	4-OMe-Fe	H	0
24	A1	6.0	95	H	Et	Et	1
25	B2	3.0	97	H	4-OMe-Fe	H	1
26	B2	3.0	99	H	3-OH-Fe	H	1
27	B2	2.0	96	H	4-Br-Fe	H	0
28	B1	2.0	90	H	3,4-Etilendioxi-Fe	H	1
29	B1	2.0	93	H	4- <i>i</i> Pr-Fe	H	1

^aOs produtos foram caracterizados por métodos físicos e espectroscópicos.

^bMétodo A1: isotiocianato (1,0 mmol), amina (1,2 mmol), diclorometano, r.t.

^bMétodo A2: isotiocianato (1,2 mmol), amina (1,0 mmol), diclorometano, r.t.

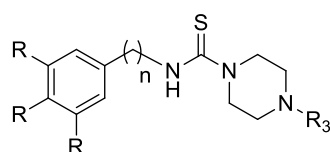
^bMétodo B1: isotiocianato (1,0 mmol), amina (1,2 mmol), *tert*-butanol, refluxo.

^bMétodo B2: isotiocianato (1,2 mmol), amina (1,0 mmol), *tert*-butanol, refluxo.

^cRendimento isolado.

Abreviatura: Fe: Fenil; Bu: Butil; Ci: Cianato; *i*Pr: Isopropil; Et: Etil; Br: Bromo.

Tabela 2 - Condições de reação e rendimentos para tioureias 22, 30-46



Tioureias ^a	Rendimento (%) ^b	R	R ₃	n
22	95	H	Fe	1
30	88	H	Piridina-2-il	0
31	99	H	Piridina-2-il	2
32	85	H	Benzoimidazol-2-il	2
33	99	H	Pirimidina-2-il	0
34	99	H	Pirimidina-2-il	2
35	99	H	Pirimidina-2-il	1
36	99	H	4-OH-Fe	1
37	90	H	Tetrahidrofuran-2-carbonil	1
38	72	H	Tetrahidrofuran-2-carbonil	0
39	97	H	Bu	1
40	93	H	Bu	0
41	99	H	3,4-Metilenodioxil-benzil	1
42	99	H	3,4-Metilenodioxil-benzil	0
43	99	H	2-Cl-Fe	0
44	92	H	2,3,4-OMe-Benzil	1
45	93	H	2,3,4-OMe-Benzil	0
46	99	OMe	4-OH-Fe	0

Método: Isotiocianato (1,1 mmol), piperazina (1,0 mmol), diclorometano, r.t., 1,0 h.

^aOs produtos foram caracterizados por métodos físicos e espectroscópicos.

^b Rendimento do isolado.

Abreviatura: Fe: Fenil; Bu: Butil; Cl: Cloro.

5.2. Efeito dos derivados de tioureia no crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv em cultura bacteriana, na produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS e avaliação da citotoxicidade

Como parte da estratégia de triagem inicial, avaliamos quarenta e seis derivados de tioureia 1-46 (Tabela 1) quanto à sua atividade antimicobacteriana em cultura de *M. tuberculosis* H37Rv, uma cepa Mtb laboratorial padrão, comumente utilizada para

triagem de substâncias quanto ao potencial antimicobacteriano (NGUTA et al., 2015). A capacidade de inibição do crescimento do Mtb H37Rv cultivado na presença de derivados de tioureia foi quantificada e os resultados mostraram que dezenove tioureias (**7, 10, 14-16, 18, 23, 25, 28-32, 35, 37, 38, 41, 42 e 45**) exibiram efeito inibitório no crescimento do Mtb com valores de MIC₅₀ inferior a 25 µM (**Tabela 3**). O potencial antimicobacteriano relevante para substâncias puras é definido pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (IPCL) como MIC <25 µM (NGUTA et al., 2015). Os derivados mais ativos contra a cepa Mtb H37Rv foram as tioureias **16, 28 e 29** (MIC₅₀ 1,3 ± 1,1; 2,0 ± 1,4 e 2,3 ± 1,6 µM, respectivamente), com potencial inibitório semelhante à rifampicina (p > 0,05). Esses derivados se diferenciam apenas pela presença de diferentes substituintes na posição R1, o que não interferiu na capacidade inibitória (valor de MIC) contra Mtb H37Rv, sendo similar entre si (p > 0,05).

A síntese de novos protótipos a fármacos que contêm farmacóforos de tioureia e incluem um arcabouço estrutural heterocíclico tem um papel proeminente no desenvolvimento de agentes antituberculose promissores (BUU-HOI et al., 1955; TATAR et al., 2016). Estudos anteriores descreveram derivados de tioureia obtidos a partir da síntese com diferentes substituintes químicos que mostraram atividade contra *M. tuberculosis* H37Rv (KARAKUS E ROLLAS, 2002; TATAR et al., 2016; ERŞEN et al., 2017; SUDHAMANI et al., 2017). Nossos resultados mostraram que dezenove tioureias exibiram efeito inibitório no crescimento de Mtb com valores de MIC₅₀ inferior a 25 µM, sendo este potencial descrito pela primeira vez para estes derivados.

A produção de óxido nítrico por macrófagos inflamatórios decorrente da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é um dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, como o Mtb (JAMAATI et al., 2017). Pacientes com TB ativa apresentam regulação positiva da expressão de iNOS e da produção de NO nos monócitos do sangue periférico (SHARMA et al., 2004), nos macrófagos obtidos do lavado bronco alveolar (NICHOLSON et al., 1996) e na zona inflamatória dos granulomas (CHOI et al., 2002). Embora a produção de NO durante a fase inicial da infecção contribua para o controle e eliminação de Mtb, a produção excessiva e contínua deste radical livre pode resultar em dano tecidual pulmonar no hospedeiro mediado por NO na fase tardia ou crônica da TB (HERNANDEZ-PANDO et al., 2001; QUALLS E MURRAY, 2016). O estresse oxidativo tem sido implicado na patogênese da fibrose e disfunção pulmonar em pacientes com TB, mesmo após terapia com antibióticos (PALANISAMY et al., 2011).

Assim, avaliamos os derivados de tioureia quanto à sua capacidade de inibir a produção de NO em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimuladas por LPS, a fim de identificar substâncias com propriedades imunomoduladoras. Uma curva de concentração-resposta foi obtida para cada derivado e os valores de IC₅₀ foram descritos na **Tabela 3**. Treze derivados de tioureia (**4, 5, 10, 11, 15, 16, 19, 20, 22, 24, 27, 28 e 29**) exibiram atividade inibitória pronunciada da produção de NO com valores de IC₅₀ abaixo de 25 µM. Os derivados de tioureia **10, 11, 22, 27 e 29** (IC₅₀ de 4,1 ± 1,3; 3,9 ± 0,6; 4,1 ± 0,1; 1,9 ± 0,3; e 2,4 ± 0,4 µM, respectivamente) se destacaram particularmente (p > 0,05). Deve-se notar que os treze derivados de tioureia mais ativos foram pelo menos vinte vezes mais potentes do que L-NMMA, que é um inibidor não seletivo de NOS usado como um controle positivo (IC₅₀ de 78,3 ± 6,5 µM). Esta é a primeira vez que a atividade inibitória da produção de NO está sendo descrita para as treze tioureias ativas, com exceção do derivado **5**, que teve sua capacidade de inibir a produção de NO demonstrada anteriormente em modelo de macrófagos estimulados por LPS e IFN-γ (VIANA et al., 2017).

A presença de efeitos tóxicos representa um obstáculo para o sucesso e adesão contínua do paciente ao tratamento anti-TB padrão atual (TWEED et al., 2018), incluindo efeitos adversos relacionados a interações medicamentosas observadas para rifampicina (NGUTA et al., 2015; GROBBELAAR et al., 2019). Assim, os derivados também foram investigados por seu efeito na viabilidade celular por meio da capacidade das células metabolicamente viáveis tratadas com tioureia em reduzir o sal de tetrazólio (MTT). Como pode ser visto na **Tabela 3**, os derivados mostraram diferenças no potencial citotóxico apresentado entre si, com CC₅₀ que variou de 17,3 a ≥ 200 µM. É importante ressaltar que os derivados de tioureia com atividade antimicrobacteriana mais potentes (**7, 10, 14, 15, 16, 25, 28, 29, 30 e 41**) exibiram baixa citotoxicidade e excelentes índices de seletividade (SI), acima de 11,3. De acordo com os critérios do IPCL, substâncias que apresentem valores de SI ≥ 10 são consideradas com perfil toxicológico seguro (NGUTA et al., 2015).

Tabela 3 - Efeitos inibitórios dos derivados de tioureia no crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv em cultura bacteriana, na produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS e avaliação da citotoxicidade.

Tioureas	MIC ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)	SI	IC ₅₀ (µM)
	MTb H37Rv	Citotoxicidade	(CC ₅₀ /MIC ₅₀)	NO
1	55,3±0,2	51,4±0,2	0,9	≥ 200
2	53,3±0,2	105,3±0,2	1,9	≥ 200
3	134±0,2	103,7±0,2	0,8	≥ 200
4	28,9±0,1	153,6±0,2	5,3	15,2±0,1
5	131,9±0,2	≥ 200	≥ 1,5	24,8±1,4
6	64,2±0,2	60,6±0,2	0,9	31,8±0,2
7	16,4±0,1	≥ 200	≥ 12,2	181,8±0,2
8	≥ 200	≥ 200	≥ 1,0	≥ 200
9	159,6±1,8	177,1±2,2	1,1	142,6±2,2
10	8,6 ±1,4	≥ 200	≥ 24,3	4,1±1,3
11	184,5±2,2	≥ 200	≥ 1,1	3,9±0,6
12	57,8±1,7	≥ 200	≥ 3,5	≥ 200
13	33,7±0,2	42,1±0,2	1,3	≥ 200
14	17,7±0,1	≥ 200	≥ 11,3	≥ 200
15	5,9±1,1	196,7±0,2	33,3	8,1±1,1
16	1,3±1,1	93,2±2,1	71,7	7,4±1,1
17	≥ 200	≥ 200	≥ 1,0	50,7±1,7
18	17,6±0,1	87,3±0,2	4,9	≥ 200
19	33,3 ± 1,5	65,9±1,8	1,9	10,1±1,0
20	107,9 ± 2,0	≥ 200	≥ 1,9	20,6±1,3
21	≥ 200	67,6±1,8	0,3	≥ 200
22	27,9±0,1	54,3±0,2	1,9	4,1±0,1
23	16,2±0,2	43,3±0,2	2,7	≥ 200
24	40,2±1,6	≥ 200	≥ 4,9	15,7±1,2
25	7,9±0,1	104,7±0,2	13,3	≥ 200
26	77,2±1,9	≥ 200	≥ 2,6	199,7±1,4
27	28,9±1,4	27,1±1,4	0,9	1,9±0,3
28	2,0±1,1	≥ 200	≥ 100	13,7±0,9
29	2,3±1,0	120,8±1,0	52,5	2,4±0,4
30	9,5±0,9	≥ 200	≥ 21,1	≥ 200
31	12,6±0,1	40,6±0,1	3,2	≥ 200
32	20,0±0,1	33,7±0,1	1,7	≥ 200
33	127,3±0,2	≥ 200	≥ 1,6	≥ 200
34	34,9±0,2	40,6±0,1	1,2	≥ 200
35	17,8±0,1	50,9±0,1	2,9	≥ 200
36	155,1±0,2	186,1±0,2	1,2	155,4±0,2
37	24,9±0,1	≥ 200	≥ 8,0	≥ 200
38	23,3±0,1	≥ 200	≥ 8,6	187±0,2
39	156,6±0,2	≥ 200	≥ 1,3	≥ 200
40	31,5±0,1	≥ 200	≥ 6,4	≥ 200
41	8,5±0,9	135,6±0,2	15,9	110,1±0,2
42	23,9±0,1	≥ 200	≥ 8,4	115,7±0,2
43	37,3±0,1	30,5±0,1	0,8	≥ 200
44	36,4±0,2	53,5±0,1	1,5	≥ 200
45	16,0±0,1	34,9±0,1	2,2	≥ 200
46	80,9±0,2	17,3±0,1	0,2	≥ 200
L-NMMA ¹	X	X	X	78,3±6,5
Rifampicina ²	0,2 ± 0,1	X	X	X

¹Inibidor de óxido nítrico; ²Fármaco anti-TB padrão; Valor médio ± DP; n = 3; X - não definido.

5.3. Relação estrutura-atividade

O estudo da relação estrutura-atividade foi realizado a fim de obter uma correlação entre a estrutura química dos derivados de tioureia e a atividade antimicobacteriana apresentada (**Tabela 3**). A análise geral dos parâmetros estruturais mostrou que derivados de tioureias com estrutura química flexível, com apenas um carbono espaçador entre a porção tioureia e o anel aromático, apresentaram atividade semelhante ou melhor do que os demais. De fato, os derivados de tioureia **12**, **25** e **41** (n° de carbono espaçadores = 1) são mais potentes do que **20**, **23** e **42** ($n= 0$ ou 2), respectivamente. Além disso, o derivado **35** ($n= 1$) apresenta melhor atividade do que **33** e **34** ($n= 0$ e 2 respectivamente). Em contraste, os derivados de tioureia **10** e **18** são mais flexíveis ($n= 2$) e quase 2 ou 3 vezes mais ativos do que o derivado **4** e o **24**, respectivamente. Assim, embora o parâmetro estrutural pareça ter um papel importante na atividade, esta característica não é a única envolvida na capacidade antimicobacteriana.

Para providenciar uma análise restrita a conformação no esqueleto estrutural da tioureia, os derivados contendo o ligante piperazina também foram investigados. No entanto, os resultados indicaram que apenas esta modificação estrutural não ocasionou aumento significativo da atividade.

Entre os diferentes substituintes utilizados na síntese dos derivados, a análise sugeriu que as substituições na posição *para* do anel aromático em R1 parecem ser importantes para a presença de atividade. A introdução dos grupos metoxila (**23** e **25**), bromo (**27**) ou isopropil (**29**) afetaram o perfil molecular, o que permite sua interação com possíveis alvos de *Mycobacterium*, em decorrência de alterações no volume molecular e lipofilicidade. Esta característica pode contribuir para sua passagem pela estrutura da parede celular de *Mycobacterium*, uma vez que alguns estudos associaram uma alta atividade anti-TB com substâncias mais lipofílicas (PICCARO et al., 2015). Como observado, esses derivados de tioureias são mais potentes do que o derivado não substituído (**1**). Além disso, derivados contendo grupos hidroxila (**2**, **3**, **17**, **26** e **46**) são menos ativos, portanto, essa característica sugere que contatos hidrofóbicos podem estar envolvidos na interação com alvo em *Mycobacterium*.

Conforme mencionado, a introdução de grupos metoxila retém ou aumentam a atividade dos derivados de tioureia. Este perfil pode ser observado nos derivados **4**, **10**, **23** e **25**, que apresentam melhor desempenho do que a tioureia não substituída **1**. Além disso, o derivado **45** foi mais ativo do que o **22**. Em contraste, o derivado de tioureia **6**

foi quase 2 vezes menos ativo do que o **4**, sugerindo que a presença de grupos múltiplos de metoxila é indesejável para o potencial antimicobacteriano.

Além disso, a investigação SAR indicou algumas características importantes que podem ser usadas como referencial para o desenho molecular de novos protótipos de derivados de tioureia com atividade antimicobacteriana aumentada devido a diferentes modificações no esqueleto estrutural da tioureia (**Figura 14**).

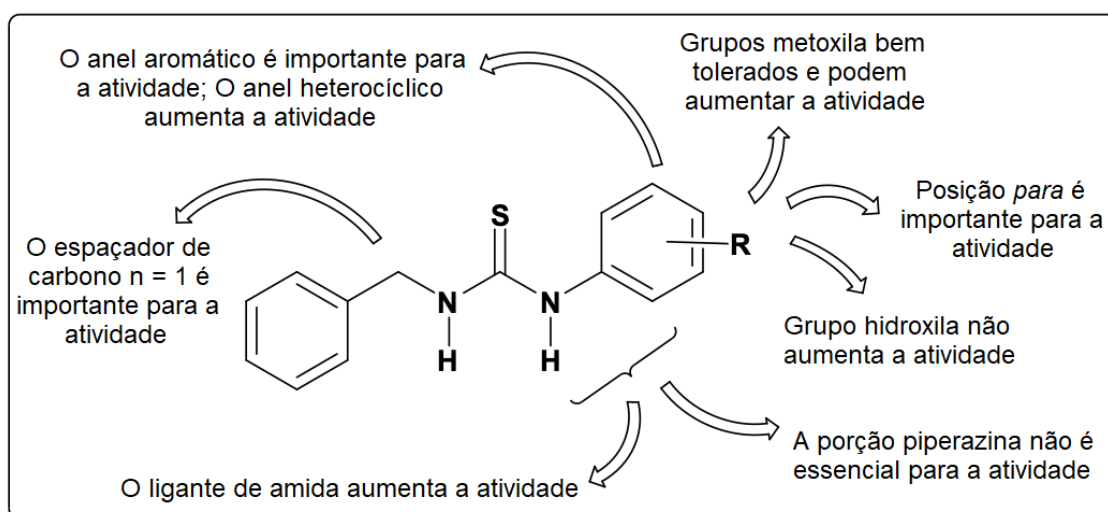


Figura 14 - Análise geral de SAR proposta para os derivados de tioureia de acordo com MIC₅₀ obtido contra Mtb H37Rv em ensaio *in vitro*.

Com base nos dados obtidos por esta triagem, as tioureias **10**, **15**, **16**, **28** e **29** apresentando baixa citotoxicidade (SI ≥ 10), elevada atividade inibitória do crescimento de Mtb H37Rv e da produção de NO, foram selecionadas para aprofundamento dos estudos em relação a ambas as atividades, anti-inflamatória e antimicobacteriana. Os derivados estão sendo descritos pela primeira vez para essas atividades, e as tioureias **10** e **28** possuem estrutura química inédita.

Os cinco promissores derivados de tioureia (**10**, **15**, **16**, **28** e **29**) foram analisados *in silico* por meio de cálculos químicos quânticos. Vários descritores moleculares foram obtidos para esses derivados, tais como valores de energia HOMO (orbital molecular de maior energia ocupado por elétrons) e LUMO (orbital molecular de menor energia não ocupado por elétrons), coeficiente orbital e densidade, mapas de potencial eletrostático molecular (MEPs) e cargas atômicas parciais (**Tabela 4** e **Figura 15**)

Tabela 4 - Atividade antimicrobacteriana contra *M. tuberculosis* H37Rv e M299 (MIC₅₀ em µM), energias HOMO e LUMO (eV) e cargas atômicas parciais obtidas para os promissores derivados de tiourea.

Tiourea	MIC ₅₀ (µM)		E _{HOMO} (eV)	E _{LUMO} (eV)	Cargas atômicas parciais			
	Mtb H37Rv	Mtb M299			N ¹	S	C	N ²
10	8,6 ± 1,4 ^a	24,8 ± 0,1 ^b	-5,50	-0,82	-0,562	-0,297	0,291	-0,655
15	5,9 ± 1,1 ^{a,b}	24,7 ± 0,1 ^b	-5,82	-1,90	-0,562	-0,269	0,301	-0,658
16	1,3 ± 1,1 ^b	6,9 ± 0,8 ^a	-5,88	-1,59	-0,560	-0,256	0,326	-0,435
28	2,0 ± 1,1 ^b	11,3 ± 1,4 ^a	-5,51	-0,80	-0,569	-0,301	0,311	-0,648
29	2,3 ± 1,0 ^b	7,8 ± 0,8 ^a	-5,56	-0,84	-0,570	-0,298	0,31	-0,650

Valores com letras sobrescritas diferentes (a-b) são significativamente diferentes (p < 0,05). Abreviaturas: Valores de energia (eV), número computacional que indica a diferença de energia entre o HOMO e o LUMO.

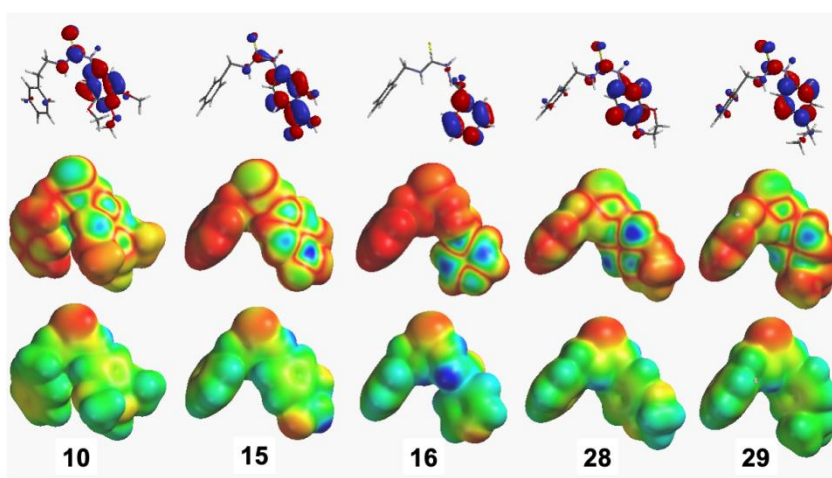


Figura 15 - Distribuição do coeficiente LUMO, densidade e mapa do potencial eletrostático molecular (MEP) das tioureias mais promissoras contra cepas de Mtb. Os MEPs foram gerados na faixa de -170 a +220 KJ / mol. Esses valores de isosuperfície codificados por cores fornecem uma indicação do tamanho molecular geral e a localização dos potenciais eletrostáticos negativos (vermelho) ou positivos (azul).

A análise dos valores de energia HOMO e LUMO dos derivados **10**, **15**, **16**, **28** e **29** não mostraram correlação direta com a atividade antimicrobacteriana observada, no entanto, deve-se destacar o valor HOMO mais negativo de $-5,88$ eV para **16**. Um comportamento diferente entre os derivados pode ser observado em relação a distribuição do coeficiente LUMO e densidade (**Figura 15**). Além disso, a análise mostrou que a maioria dos derivados apresenta um mapa MEP semelhante, exceto o **16**. Esta abordagem de estudo pode ser empregada para investigar a distribuição de carga ao longo da molécula e a ocorrência de possíveis interações com um alvo (LIPINSKI et al., 2001). Os resultados obtidos mostraram que a combinação do anel de piridina e um ligante de amida na molécula contribui para obter cargas atômicas parciais diferentes ao longo da estrutura da tiourea **16** (**Tabela 4**).

5.4. Efeito dos derivados de tioureia no NO liberado a partir do SNP e na expressão da iNOS em macrófagos estimulados por LPS

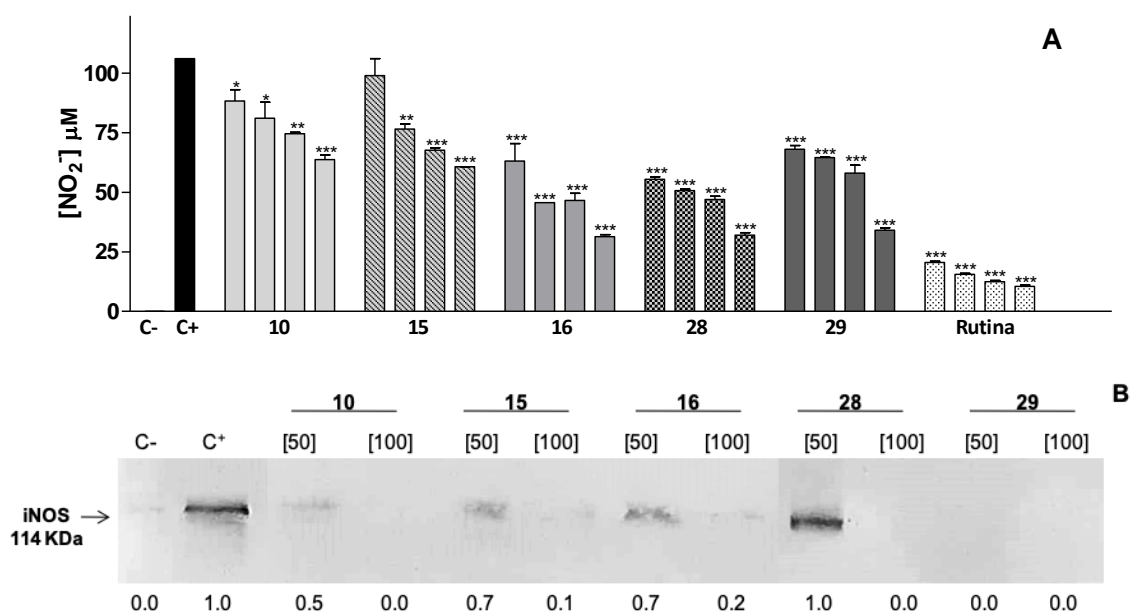
É bem conhecido que um ambiente redox não balanceado durante a resposta inflamatória resulta em dano tecidual e eleva a carga de espécies reativas de NO e seus derivados (MITTAL et al., 2014). As estratégias terapêuticas a fim de reduzir a inflamação excessiva incluem o controle da produção de radicais livres (HWANG et al., 2018). Estudos anteriores descreveram derivados de tioureia por sua capacidade de eliminação de radicais livres, destacando o papel relevante da porção tioureia neste potencial (SUDZHAEV et al., 2011; SHOAIIB et al., 2016; KHAN et al., 2020) e como inibidores da expressão de iNOS (CHAYAH et al., 2015).

A enzima óxido nítrico sintase induzida, iNOS, é responsável pela conversão da L-arginina e oxigênio em L-citrulina e NO tendo como doador de elétrons o NADPH. A exposição a produtos microbianos, como o LPS induzem a expressão enzimática de iNOS em várias células inflamatórias e é responsável pela produção de altos níveis de NO durante períodos prolongados (MOLLACE et al., 2005).

A fim de avaliar se a capacidade de inibição da produção de NO da cultura de macrófagos estimulados e tratadas com tioureia foi devido à capacidade antioxidante destes derivados, o efeito destes diretamente no NO liberado por um doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP) foi investigado. Os derivados de tioureia exibiram capacidade de seqüestro do radical NO que variou entre 30 a 55% de forma concentração-dependente (**Figura 16A**). Deve-se observar que os derivados **16**, **28** e **29** foram mais ativos na redução do nitrito acumulado (IC_{50} $64,8 \pm 1,0$; $64,3 \pm 1,0$ e $71,7 \pm 1,1$ μ M, respectivamente) do que os derivados **10** e **15** ($IC_{50} > 200$ e $184,2 \pm 1,0$ μ M) que apresentaram baixo potencial de seqüestro do radical NO mesmo nas maiores concentrações testadas. Em relação a rutina, um flavonoide conhecido por sua atividade antioxidante, todos os derivados de tioureia foram aproximadamente 9 a 25 vezes menos potentes, apresentando capacidade moderada ou baixa de seqüestro de NO. Quando comparado a capacidade inibitória dos derivados na produção de NO em cultura de macrófagos (**Tabela 3**) e o potencial destes no seqüestro do radical NO (**Figura 16A**) pode-se observar que a capacidade de seqüestro não responde de forma substancial ao mecanismo de inibição dos derivados na produção de NO em macrófagos, sendo de 4,7 a 48,8 vezes menor que esse.

Os resultados acima conduziram a investigação do mecanismo de inibição da produção de NO exercida pelos derivados de tioureias ocorrer por meio da modulação

da expressão de iNOS nos macrófagos estimulados por LPS. A enzima óxido nítrico sintase induzida, iNOS, converte a L-arginina e oxigênio em L-citrulina e NO. Uma variedade de estímulos extracelulares e citocinas, como TNF- α , INF- γ , IL-1 β ativam a expressão da iNOS, e a produção de altos níveis de NO pode ocorrer durante períodos prolongados (LANDES et al., 2015). Como mostrado na **Figura 16B**, todos os derivados inibiram quase completamente a expressão de iNOS, a 100 μ M. O derivado **29** manteve significativa supressão da expressão de iNOS mesmo na menor concentração testada. Esses resultados indicaram que os derivados de tioureia mais promissores inibiram a produção de NO principalmente pela supressão da expressão de iNOS em macrófagos estimulados.



5.5. Efeito inibitório dos derivados de tioureia na produção de TNF- α e IL-1 β em macrófagos estimulados por LPS

O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina 1- β (IL-1 β) são citocinas pró-inflamatórias produzidas principalmente por macrófagos ativados e embora exerçam efeitos protetores na TB pulmonar quando produzidos em quantidades adequadas (DORHOI et al., 2011), níveis séricos elevados de TNF- α são observados em pacientes com TB grave e relacionados a uma inflamação pulmonar excessiva com desenvolvimento de patologia necrótica e caquexia (KART et al., 2003; SHAMEEM et al., 2015). Semelhante ao TNF- α , estudos anteriores em humanos e em modelos de camundongo de TB mostraram que o aumento da secreção de IL-1 β devido à ativação prolongada do inflamassoma de NLRP3 por sinais de alerta como ATP proveniente da liberação do conteúdo celular a partir da morte necrótica de células infectadas tem papel prejudicial para o hospedeiro e se correlaciona com pneumonia necrosante extensa e aumento da gravidade da TB (AMARAI et al., 2014 ; ALMEIDA et al., 2017; MISHRA et al., 2017; ÖLMEZ E WASEER, 2020). Abordagens terapêuticas que diminuem ou controlam a produção de citocinas inflamatórias, como uso de anti-inflamatórios, bloqueadores de TNF- α (Etanercept) e anticorpos anti-TNF- α (Infliximabe), têm sido associadas a restrição da imunopatologia e melhora da função e integridade pulmonar na TB severa (KRUG et al., 2021). Deve-se considerar, no entanto que o uso de antagonistas de TNF- α tem custo elevado com uso por via parenteral e pode agravar a TB se administrado sem terapia anti-TB adequada (KRUG et al., 2021).

Nesse contexto, avaliamos a capacidade dos derivados de tioureia em inibir a produção de TNF- α e IL-1 β em macrófagos estimulados por LPS. Os resultados apresentados na **Figura 17** mostraram que todos os derivados de tioureia selecionados inibiram significativamente a produção de TNF- α mesmo na concentração de 12,5 μ M (**Figura 17A**), enquanto apenas os derivados de tioureia **15**, **28** e **29** foram inibidores potentes de IL-1 β (**Figura 17B**). O derivado **29** foi notavelmente o inibidor mais potente da produção de TNF- α , exibindo o menor valor de IC₅₀ ($p < 0,001$), enquanto o derivado **28** foi o mais ativo contra IL-1 β , mostrando IC₅₀ de $33,2 \pm 1,0 \mu$ M (**Tabela 5**). Nossos dados mostraram que os derivados de tioureia foram inibidores mais potentes da produção de TNF- α do que de IL-1 β . Com exceção da tioureia **29**, que demonstrou potencial semelhante ($p > 0,05$) contra TNF- α e NO (**Tabela 5**), os demais derivados foram menos potentes na inibição do TNF- α e IL-1 β do que no NO (**Tabela 5**).

Ressalta-se que o derivado **29** apresentou potencial semelhante ao ibuprofeno (AINE usado como controle positivo de inibição) frente à produção de TNF- α , embora este tenha sido mais ativo que os derivados na inibição da produção de IL-1 β . Embora o fármaco ibuprofeno seja conhecido pela inibição de ciclo-oxigenases, foi demonstrado que a inibição da expressão de COX reduz a inflamação sistêmica induzida por LPS, e além disso o ibuprofeno pode se ligar diretamente ao receptor PPAR- γ levando a uma resposta anti-inflamatória independente de COX (TEELING et al., 2010).

Na literatura, diferentes séries de tioureias com distintos substituintes mostraram ação inibitória da produção de TNF- α . Zia e colaboradores (2020) descreveram uma série de derivados de tioureia com potencial inibitório contra TNF- α em modelo de monócitos THP-1 diferenciados e estimulados por LPS, no qual o derivado mais potente da série, o {2-fluoro-5-[(3-[hidroxi(oxo)amnio]fenil)carbamotiouril)amino]fenil}(hidroxi)oxoamônio, foi 1,6 vezes menos potente que o derivado **29** estudado neste trabalho.

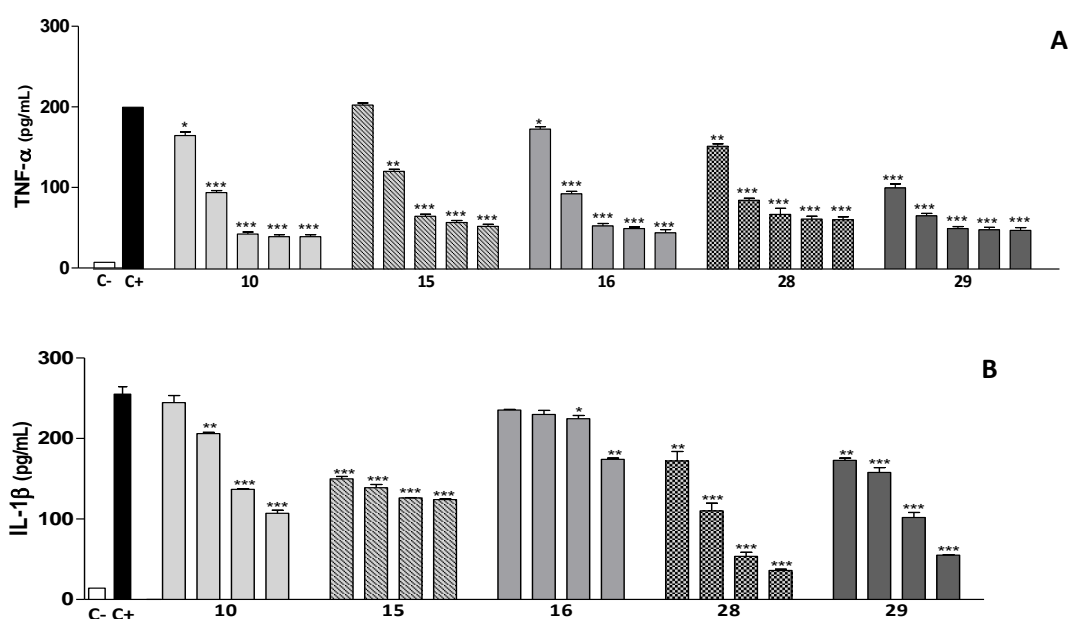


Figura 17 - Efeito inibitório de derivados de tioureia na produção de TNF- α e IL-1 β em macrófagos estimulados por LPS. Macrófagos RAW 264.7 (A) e macrófagos J774A.1 (B) foram tratados com LPS na presença ou ausência de tioureias, 6,25, 12,5, 50, 100 e 200 μ M (para quantificação da produção de TNF- α) ou 25, 50, 100 e 200 μ M (para quantificação da produção de IL-1 β) ou ibuprofeno. A quantificação dos mediadores inflamatórios nos sobrenadantes de cultura foi realizado por de ELISA sanduíche. As barras para cada derivado referem-se às concentrações testadas em ordem crescente. Macrófagos estimulados por LPS foram usados como controle positivo (C+) e macrófagos não tratados como controle negativo (C-). Os valores foram apresentados como média \pm desvio padrão e as diferenças estatísticas entre cada grupo e C + foram indicadas de acordo com $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*).

Tabela 5 - Concentração inibitória 50% (IC₅₀) dos derivados tioureias na produção de TNF- α e IL-1 β em macrófagos estimulados por LPS.

	IC ₅₀ (μ M)					
	10	15	16	28	29	Ibuprobeno ¹
TNF-α	15,3 \pm 1,1 ^a	28.4 \pm 1.1 ^a	18.7 \pm 1.1 ^{a,b}	20.7 \pm 1.0 ^b	4.0 \pm 1.2	2.1 \pm 0.8 ^a
IL-1β	80,2 \pm 1,0	47.9 \pm 1.0	\geq 200	33.2 \pm 1.0	55.2 \pm 1.0	14.4 \pm 1.2

Os valores na mesma linha com letras sobrescritas diferentes (a–b) são significativamente diferentes ($p < 0,001$).
¹Fármaco anti-inflamatório padrão.

5.6. Efeito dos derivados de tioureias no crescimento da cepa hipervirulenta *M. tuberculosis* M299 em cultura bacteriana

Micobactérias de alta virulência demonstram replicação acelerada em macrófagos induzindo morte necrótica das células promovendo liberação do bacilo ou agregados destes que favorece a disseminação da bactéria (PARK et al., 2006). Foi demonstrado que o isolado clínico de Mtb M299, pertencente à sub-linhagem moderna Mtb Beijing possui maior taxa de crescimento intracelular bacteriano do que a cepa Mtb H37Rv e induzem morte celular necrótica de macrófagos infectados (RIBEIRO et al., 2014). As cepas virulentas são mais facilmente transmitidas do que cepas menos virulentas, o que favorece o aumento na prevalência destas cepas (CABRAL et al., 2010) e incentiva a busca de fármacos mais potentes. A fim de fornecer mais informações sobre o potencial antimicobacteriano dos derivados de tioureia, estes foram avaliados contra o isolado clínico de *M. tuberculosis* de alta virulência (Mtb M299) em cultura bacteriana.

Como pode ser visto na **Tabela 6**, todas as tioureias selecionadas foram ativas contra a cepa Mtb hipervirulenta e apresentaram bom índice de seletividade (SI). Derivados de tioureia **16**, **28** e **29** mostraram-se mais eficazes contra a cepa hipervirulenta e com melhor SI. Como esperado, deve-se observar que a cepa Mtb M299 foi mais resistente à ação antimicobacteriana dos derivados da tioureia e da rifampicina. O potencial da rifampicina para suprimir o crescimento da cepa hipervirulenta foi seis vezes menor em comparação ao obtido para a cepa H37Rv, embora tenha sido mais ativa que os derivados de tioureia.

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima de derivados de tioureia contra o crescimento de *M. tuberculosis* M299 em cultura bacteriana.

Tioureas	MIC ₅₀ (µM)	SI
	Mtb M299	(CC ₅₀ /MIC ₅₀)
10	24,8±0,1 ^b	≥ 8,1
15	24,7±0,1 ^b	8
16	6,9±0,8 ^a	13,5
28	11,3±1,4 ^a	≥ 17,7
29	7,8±0,8 ^a	15,5
Rifampicina¹	1,2 ± 0,1	X

¹Fármaco anti-TB padrão; Valor médio ± DP; n=3; X-não definido. Valores com letras sobrescritas diferentes (a – b) são significativamente diferentes (p <0,001).

5.7. Efeito dos derivados de tioureia no crescimento intracelular e na viabilidade de agregados extracelulares de Mtb

A capacidade de substâncias atuarem contra Mtb em diferentes estados fisiológicos durante a infecção é um desafio para o desenvolvimento de novos fármacos anti-TB (NGUTA et al., 2015). Os macrófagos são as primeiras células de defesa do hospedeiro para tentar eliminar e/ou conter o bacilo (WEISS E SCHAIBLE, 2015). O modelo *in vitro* de infecção mimetiza a fase intracelular da infecção por TB e possibilita verificar a capacidade da substância adentrar o ambiente intracelular e exercer o efeito desejado, a seletividade da substância testada em atuar especificamente sobre o bacilo e na sua capacidade de alterar a resposta imune induzida na célula hospedeira infectada, além de ampliar a investigação sobre a atividade imunomodulatória de candidatos a estudos *in vivo* (MARRAPU et al., 2011).

Assim, avaliamos se os derivados de tioureia poderiam ter efeitos inibitórios sobre o crescimento intracelular de Mtb em macrófagos infectados. Os resultados apresentados na **Figura 18A** demonstraram que os cinco derivados de tioureia selecionados suprimiram drasticamente o crescimento intracelular de Mtb H37Rv, reduzindo 60 a 85% o número de unidades formadoras de colônias (CFU), mesmo na menor concentração utilizada. Os derivados **16**, **28** e **29** apresentaram os valores MIC₅₀ mais baixos (**Figura 18A**). Os derivados de tioureia foram capazes de reduzir o crescimento de Mtb em macrófagos exibindo seletividade contra Mtb. O índice de seletividade dos derivados variou de 18 a 71,1 (CC₅₀ apresentado na **Tabela 3**). Comparado a capacidade inibitória destes derivados diretamente no crescimento da cultura bacteriana (**Tabela 2**), foi possível observar que os derivados **10**, **16** e **29**

apresentaram similar ($p > 0,05$) potencial de inibição do bacilo quando em suspensão bacteriana (MIC_{50} $8,6 \pm 1,4$; $1,3 \pm 1,1$ e $2,3 \pm 1,0$, respectivamente) quanto no crescimento intracelular em macrófagos (**Figura 18 A**). Enquanto os derivados **15** e **28** foram mais potentes na redução do crescimento bacilar em macrófagos, o que pode sugerir uma modulação dos mecanismos de defesa do macrófago.

Está bem documentado que bacilos virulentos exibem crescimento intracelular acelerado (RIBEIRO et al., 2014), que excedem a capacidade bactericida dos macrófagos desencadeando a morte necrótica dessas células (BRAMBILLA et al., 2016; MAHAMED et al., 2017). A maior parte dos bacilos liberados pode formar uma comunidade semelhante a um biofilme em meio à necrose residual o que fornece um nicho para a sobrevivência e persistência de Mtb no meio extracelular (ORME, 2014; BUSSI e GUTIERREZ, 2019). A formação de uma matriz extracelular rica em ácidos micólicos livres ao redor dos agregados extracelulares micobacterianos é um dos fatores relacionados à resistência ou tolerância aos fármacos observada no tratamento contra cepas virulentas ou resistentes de Mtb (MAHAMED et al., 2017).

Para avaliar o potencial dos derivados de tioureia contra agregados extracelulares de Mtb foi utilizado macrófagos RAW 264.7 infectados por cepa Mtb altamente virulenta em taxa de infecção de 10:1 (bactérias/macrófago). A partir da morte necrótica induzida em macrófagos infectados por Mtb M299, os agregados extracelulares de Mtb formados foram tratados com as tioureias (**Figura 18B**). A atividade do derivado de tioureia **29** contra aglomerados bacterianos foi particularmente notável apresentando MIC_{50} de $5,6 \pm 1,2 \mu M$ quando comparado com os demais derivados, especialmente na concentração de $25 \mu M$ ($p < 0,001$). Interessantemente, o derivado de tioureia **29** assim como observado para o derivado **15**, mantiveram o potencial antimicobacteriano contra a cepa Mtb hipervirulenta (**Tabela 6**), mesmo quando em agregados (**Figura 18B**), enquanto os derivados **16** e **28** foram mais ativos em inibir o crescimento de Mtb M299 em cultura bacteriana do que quando em agregados extracelulares.

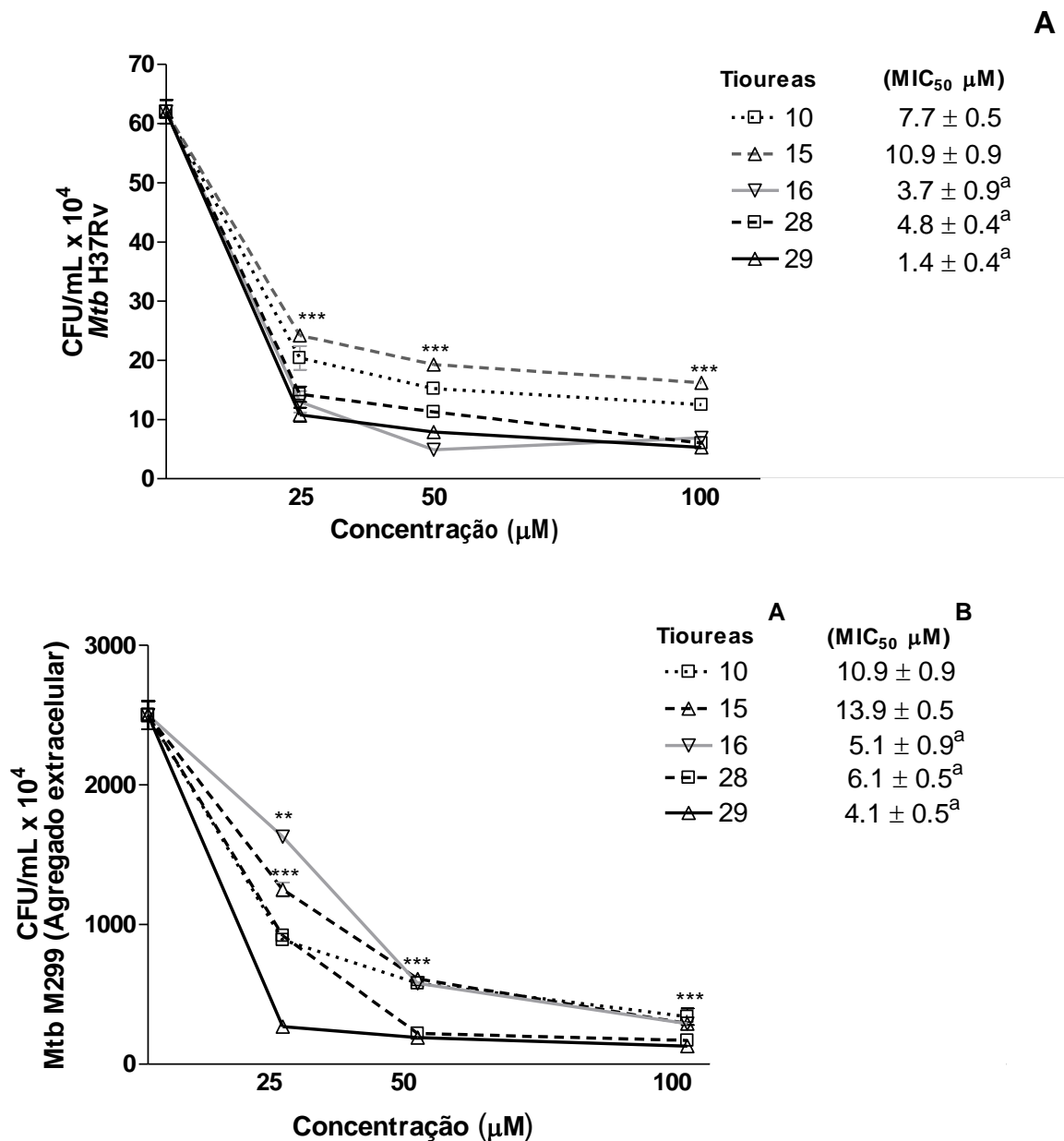


Figura 18 - Efeito dos derivados de tioureia no crescimento intracelular de *M. tuberculosis* H37Rv em macrófagos (A) e na viabilidade de agregados extracelulares de *M. tuberculosis* M299 (B). (A) Macrófagos RAW 264.7 infectados por *Mtb* H37Rv em MOI de 1:1 (bactéria/macrófago) e tratados com as amostras (25, 50 e 100 µM) por 4 dias. Após 21 dias, o número de CFU foi contabilizado e os valores foram apresentados como média ± desvio padrão. O valor médio de cada grupo foi comparado ao valor médio do controle positivo de crescimento (Macrófagos infectados não tratados, 62,0 ± 1,0 CFU/mL x 10⁴). (B) Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com cepa hipervirulenta *Mtb* M299 em MOI de 10: 1 e mantidos sob cultivo por 12 dias. Os agregados extracelulares de *Mtb* liberados no meio de cultura foram tratados com as amostras (25, 50 e 100 µM) por 4 dias. As suspensões bacterianas recuperadas no dia 4 foram agitadas vigorosamente e sonicadas para semeadura em agar Middlebrook 7H10. Após 21 dias, o número de CFU foi contado. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. O valor médio de cada grupo foi comparado ao valor médio do controle positivo (Agregados extracelulares de *Mtb* não tratados, 25,0 ± 1,0 CFU/mL x 10⁶) foram indicados por asteriscos de acordo com p <0,001 (***) , p <0,01 (**) e p <0,05 (*). (n=3). A concentração inibitória mínima das tioureias em ambos os ensaios foi inserida ao lado do gráfico. Valores com letras sobrescritas diferentes (^a) foram significativamente diferentes (p <0,001).

5.8. Estudos farmacocinéticos e toxicológicos *in silico*

A análise do perfil farmacocinético é essencial para o desenvolvimento de fármacos (NGUTA et al., 2015), tendo em vista que o conhecimento insuficiente das propriedades metabólicas e farmacocinéticas de uma substância candidata a fármaco está relacionada a 39% de insucesso para seu desenvolvimento em fase clínica enquanto a presença de efeitos tóxicos contribui com 60% de insucesso (KUBINYI, 2003). Os estudos farmacocinéticos e toxicológicos *in silico* permitem estimar com bom nível de confiabilidade, algumas propriedades físico-químicas, biológicas e *drug-like* relevantes no planejamento de novos fármacos (CHENG et al., 2013). Assim, os derivados de tioureia promissores (**10**, **15**, **16**, **28** e **29**) foram analisados por parâmetros físico-químicos de acordo com a "regra dos cinco" de Lipinski (LIPINSKI et al., 2001) (**Tabela 7**).

A "regra dos cinco" de Lipinski baseia-se em critérios físico-químicos que as substâncias devem apresentar para serem considerados bons candidatos a fármacos, como: massa molecular, Log de P (lipofilicidade), grupos doadores de ligação de hidrogênio e grupos aceptores de ligação de hidrogênio. Uma vez que as substâncias não violem os parâmetros de lipinski, maior possibilidade de poderem ser administradas por via oral. A predição *in silico* de acordo com Lipinski é de que as propriedades físico-químicas de um candidato a fármaco devem seguir um peso molecular ≤ 500 g/mol, o valor do Log de P ≤ 5 , até 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio e no máximo 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (LIPINSKI et al., 2001).

Também avaliamos por meio de abordagem toxicológica *in silico* o potencial de hepatotoxicidade, mutagenicidade e toxicidade reprodutiva desses derivados. Os resultados indicaram ausência de risco de mutagenicidade para esses derivados com base no teste de Ames. Os derivados de tioureia **16** e **28** foram indicados como tendo risco de hepatotoxicidade e todas as tioureias com exceção do derivado **15** têm risco reprodutivo potencial. Em geral, os resultados indicaram riscos toxicológicos menores para os derivados de tioureia em comparação a rifampicina, uma vez que está associada a mutagenicidade e toxicidade reprodutiva quando co-administrado com outros fármacos (BALTZ, 2014) e efeito hepatotóxico (RAMAPPA e AITHAL, 2013).

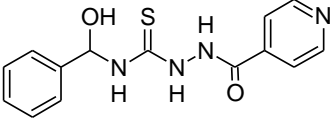
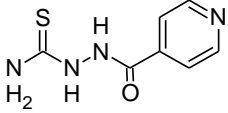
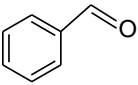
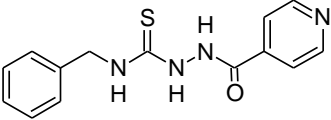
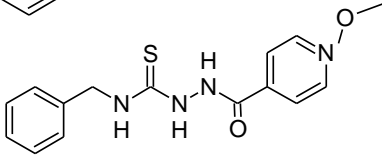
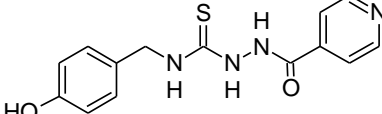
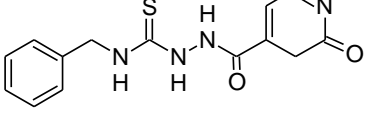
Tabela 7 - Parâmetros analisados pela regra dos cinco de Lipinski e propriedades farmacocinéticas moleculares calculadas usando ADMET Predictor™ para os derivados de tioureia promissores. A rifampicina, fármacoanti-TB padrão, foi utilizado como controle.

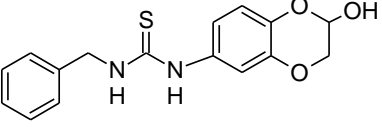
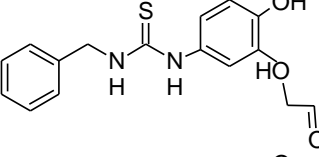
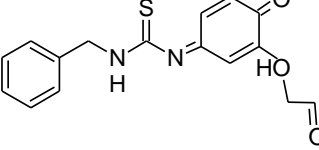
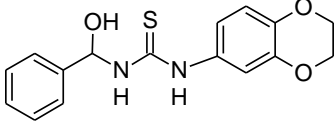
Tioureas	MW	HBD	HBA	LogP	HEPAT	MUTAGEN	REPR
10	346,44	2	5	3,26	NÃO	NÃO	SIM
15	302,35	4	5	3,14	NÃO	NÃO	NÃO
16	286,36	3	5	1,35	SIM	NÃO	SIM
28	300,38	2	4	2,82	SIM	NÃO	SIM
29	284,43	2	2	3,64	NÃO	NÃO	SIM
Rifampicina	822,96	6	16	2,53	SIM	SIM	SIM

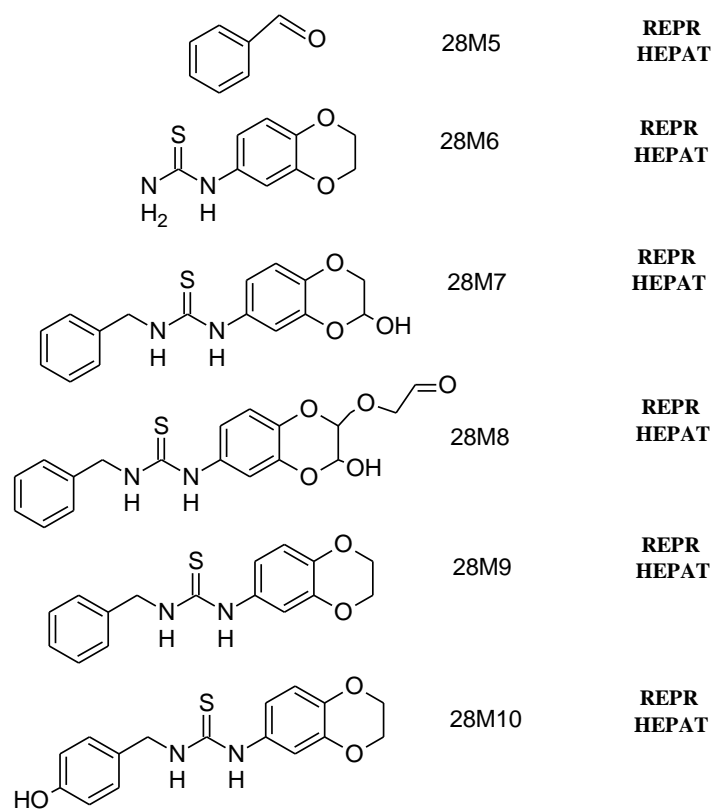
Abreviaturas: Peso molecular (MW, g/mol), Lipofilicidade (LogP), número de grupos doadores de ligações de hidrogênio (HBD) e aceptores (HBA), Risco ADMET e análise toxicológica *in silico* (hepatotoxicidade (HEPAT), mutagenicidade (MUTAGEN) e toxicidade reprodutiva (REPR).

Considerando que o metabolismo de um fármaco tem um papel importante no processo farmacocinético (PHETSUKSIRI et al., 2003), os derivados de tioureia com melhor potencial nos ensaios realizados **16**, **28** e **29** tiveram a predição *in silico* dos seus metabólitos realizada a partir da probabilidade de reação por diferentes isoformas de Citocromo P450 (CYP). Os metabólitos preditos foram avaliados quanto à toxicidade *in silico* (**Tabela 8**) e os resultados sugerem baixa probabilidade de toxicidade para os metabólitos da tioureia **29**, no qual a maioria apresentou um e até mesmo nenhum risco predito.

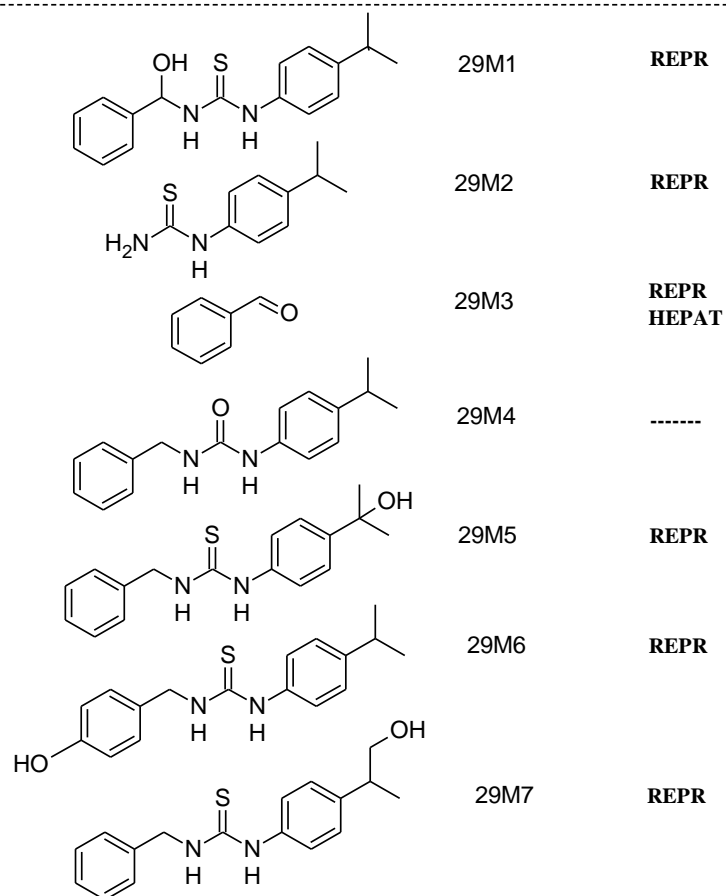
Tabela 8 - Metabólitos e parâmetros de toxicidade *in silico* investigados usando ADMET PredictorTM

Tioureas	Metabólitos		Toxicologia <i>in silico</i>
		16M1	REPR
		16M2	REPR HEPAT
		16M3	REPR HEPAT
16		16M4	REPR MUT
		16M5	REPR MUT
		16M6	REPR
		16M7	REPR

		28M1	HEPAT
		28M2	REPR HEPAT
		28M3	REPR HEPAT MUT
28		28M4	REPR HEPAT



29



5.9. Avaliação do potencial inibitório dos derivados de tioureias no crescimento de cepas *M. kansasii*

Dentre as MNT potencialmente patogênicas, Mkan é a segunda mais comum em infecções em humanos (MORIMOTO et al., 2014). Além disso, existe uma dificuldade de obtenção do diagnóstico diferencial da TB, onde Mkan causa doença pulmonar crônica similar a TB resultando em cavitação em mais de 70% dos pacientes acometidos (DESTEFANO et al., 2018). O tratamento para MNT possui maior desafio devido ao período de tempo mais prologando, sendo de pelo menos doze meses, utilizando combinações de diferentes antibióticos (COWMAN et al., 2012; RYU et al., 2016), e menor adesão dos pacientes ao tratamento, o que ressalta a importância de novas substâncias mais eficazes e com menor efeito adverso para o tratamento.

A atividade inibitória dos 46 derivados de tioureias frente ao crescimento de três cepas de Mkan, com diferentes níveis de virulência foi avaliada diretamente em cultura bacteriana. Foi utilizado a cepa de referência 12478 (ATCC) (virulência intermediária) e as cepas de isolados clínicos 10953 e 8835 (alta virulência) (MUSSI et al., 2021).

Como pode ser observado na **Tabela 9**, oito derivados de tioureias (**2, 3, 10, 17, 35, 36, 40 e 43**) foram potentes em inibir a cepa padrão de Mkan 12478, apresentando MIC₅₀ menor que 25 µM. Destes, o derivado **36** foi o mais ativo contra a cepa de referência 12478 exibindo MIC₅₀ de 4,9±0,2 µM, respectivamente e excelente índice de seletividade contra o patógeno, no valor de 38. Os derivados **35** e **43**, embora com valor de MIC dentro do critério estabelecido pela CSLI (MIC₅₀ ≤ 25 µM) apresentaram baixa seletividade (SI ≤ 3). Os demais derivados ativos exibiram SI entre 6-12,7 (**Tabela 9**).

Em continuação, os derivados mais ativos contra a cepa de referência foram avaliados contra as cepas Mkan de alta virulência. As cepas 10953 e 8835 demonstraram *in vitro* elevada capacidade de crescimento intracelular em macrófagos RAW 264.7 assim como alto índice de indução de morte necrótica destas células. Em modelo animal de camundongos C57BL/6 infectados intratraquealmente com dose de 5 x10⁴ CFU, estas cepas Mkan induziram doença pulmonar progressiva nos animais, com formação de grandes granulomas caseosos, incluindo para a cepa Mkan 8835 a indução da morte prematura dos animais infectados, associada a extensa pneumonia extensa e maior produção de mediadores inflamatórios no pulmão (MUSSI et al., 2021). Dos sete derivados ativos, três (**2, 10 e 17**) exibiram atividade inibitória no crescimento

das cepas Mkan 10953 e 8835. Destaca-se que estes derivados mantiveram seu potencial inibitório frente a cepa Mkan 10953 enquanto apenas o derivado **2** continuou com perfil de atividade similar em relação a cepa Mkan 8835 (**Tabela 9**), embora todos os três derivados tenham mostrado excelente seletividade (valor de SI de pelo menos 6).

O número de derivados de tioureias ativos contra a cepa de referência de *M. kansasii* foi quase três vezes menor quando comparado ao número de tioureias ativas contra a cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Rv (**Tabela 3**). Além disso, dos cinco derivados (**10, 15, 16, 28 e 29**) que mais se destacaram em inibir o crescimento da cepa Mtb de hipervirulência (**Tabela 6**) somente o derivado **10** apresentou maior capacidade inibitória frente a cepas de referência Mkan 12478 e 10953, e perfil similar inibitório contra cepa Mkan 8835 (**Tabela 9**). Os demais apresentaram baixo ou nenhum potencial inibitório ($MIC_{50} \geq 55,6 \mu M$). Isto sugere que os derivados de tioureia, por apresentarem em geral maior dificuldade de inibição do crescimento de cepas *M. kansasii*, interagem com alvos micobacterianos distintos ou de maneira conformacional diferente entre ambas as cepas.

A cepa Mkan 8835 também mostrou maior resistência a rifampicina, assim como Mkan 12478, 8835 e 10953 frente a isoniazida. O potencial inibitório da rifampicina foi menor contra cepa Mkan 8835 quando comparado à cepa Mtb de hipervirulência ($p < 0,01$) (**Tabela 6 e 9**). O tratamento para MNTs apresenta frequentemente maior resistência a antibióticos de primeira linha e os testes de susceptibilidade *in vitro* podem ter baixa correlação com a eficácia clínica (CRILLY et al., 2021). Em geral, o resultado do tratamento de infecções pulmonares por MNT é altamente variável e determinado por fatores genéticos do paciente e do bacilo (GOPALASWAMY et al., 2020).

Até o momento, não há descrição na literatura de atividade inibitória de derivados de tioureias contra *M. kansasii*. Embora tenham relatos de derivados de tioureias com potencial atividade frente a outras MNTs, como a *M. avium* (GREENSTEIN et al., 2010).

Tabela 9 - Concentração inibitória mínima (50%) apresentada pelos derivados de tioureias na inibição do crescimento micobacteriano de cepas de *M. kansasii*.

Tioureas	MIC ₅₀ (µM)	SI	MIC ₅₀ (µM)	SI	MIC ₅₀ (µM)	SI
	Mkan 12478	(CC ₅₀ /MIC ₅₀)	Mkan 10953	(CC ₅₀ /MIC ₅₀)	Mkan 8835	(CC ₅₀ /MIC ₅₀)
1	57,0±0,9	1,1	X	X	X	X
2	18,3±0,1	6	7,2±0,7 ^a	14,6	9,7±0,8	10,8
3	14,6±0,7	7,1	133,5±0,1	0,7	≥200	≥ 1,0
4	46,4±0,7	3,3	X	X	X	X
5	≥200	≥ 1,0	X	X	X	X
6	40,4±0,8	1,5	X	X	X	X
7	181,0±0,1	≥ 1,1	X	X	X	X
8	55,6±0,7	≥ 3,2	X	X	X	X
9	28,5±0,1	≥ 6,2	7,3±0,8 ^a	≥ 24,3	27,6±0,1 ^a	6,4
10	15,9±0,5	≥ 12,6	7,1±0,1 ^a	≥ 28,2	30,8±0,1 ^a	6,5
11	≥200	≥ 1,0	X	X	X	X
12	112,0±0,8	≥ 1,7	X	X	X	X
13	36,9±0,6	1,1	X	X	X	X
14	74,6±0,8	2,7	X	X	X	X
15	72,9±0,1	2,7	X	X	X	X
16	55,6±0,1	1,7	X	X	X	X
17	24,2±0,1	≥ 8,3	9,1±0,4 ^a	≥ 21,9	32,4±0,6 ^a	6,2
18	104,9±0,7	≥ 1,0	X	X	X	X
19	≥200	≥ 1,0	X	X	X	X
20	≥200	1	X	X	X	X
21	≥200	≥ 1,0	X	X	X	X
22	149,3±0,1	≥ 1,0	X	X	X	X
23	≥200	≥ 1,0	X	X	X	X
24	≥200	1	X	X	X	X
25	≥200	≥ 1,0	X	X	X	X
26	≥200	≥ 1,0	X	X	X	X
27	≥200	≥ 1,0	X	X	X	X
28	113,4±0,1	1,7	X	X	X	X
29	151,5±0,8	1	X	X	X	X
30	47,6±0,1	4,2	X	X	X	X
31	76,5±0,1	1,1	X	X	X	X
32	144,5±0,1	1	X	X	X	X
33	51,9±0,1	3,8	X	X	X	X
34	52,4±0,6	1,1	X	X	X	X
35	17,8±0,5	2,3	≥200	≥ 1,0	≥200	≥ 1,0
36	4,9±0,2	38	≥200	≥ 1,0	≥200	≥ 1,0
37	43,0±0,9	≥ 1,0	X	X	X	X
38	39,1±0,1	≥ 1,0	X	X	X	X
39	48,2±0,1	≥ 1,0	X	X	X	X
40	15,8±0,9	≥ 12,7	≥200	≥ 1,0	≥200	≥ 1,0
41	43,7±0,7	3,1	X	X	X	X
42	27,9±0,5	7,2	≥200	≥ 1,0	≥200	≥ 1,0
43	9,9±0,6	3,1	170,1±0,7 ^b	≥ 1,0	≥200	≥ 1,0
44	29,4±0,7	1,8	X	X	X	X
45	27,5±0,4	1,3	160,9±0,5 ^b	0,2	≥200	≥ 1,0
46	32,2±0,5	≥ 1,0	X	X	X	X
Rifampicina	0,05±0,01	X	0,7±0,1	X	4,5±1,0	X
Isoniazida	2,7±1,1	X	4,1±0,1	X	6,6±0,7	X

Os valores de MIC₅₀ e MIC₉₀ de cada amostra foram exibidos como média ± DP. (n=3) Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas (a-b) são significativamente diferentes (p< 0,05 ou p< 0,001; determinado pelo teste de Tukey).

A partir dos resultados obtidos *in vitro*, os dados *in silico*, e disponibilidade da tioureia sintetizada, aprofundamos o estudo dos derivados **28** e **29** em modelo murino C57Bl/6 infectado por cepa Mtb hipervirulenta, a fim de obter novas substâncias candidatas eficientes e seguras para o tratamento adjuvante da TB pulmonar severa. Estudos anteriores demonstraram que duas tioureias com ação anti-TB, tiocarlida (usada na década de 1960 para tratar a TB) e tioacetazona (atualmente utilizada em associação com outros agentes antimicobacterianos como fármaco de segunda linha), inibem a síntese de ácidos micólicos, sugerindo que este mecanismo de ação pode ser um bom ponto de partida para investigação (KUMAR E SURAPANENI, 2001; GRZEGORZEWICZ et al., 2012).

5.10. Avaliação do efeito dos derivados de tioureias no crescimento bacteriano nos pulmões dos camundongos infectados

Os derivados **28** e **29** foram avaliados quanto a seu efeito terapêutico em modelo murino de TB pulmonar severa, estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa, através da infecção intratraqueal de camundongos C57Bl/6 com baixa dose de infecção (aproximadamente 100 bacilos) da cepa Mtb hipervirulenta M299, pertencente à sublinhagem moderna Beijing (ALMEIDA et al., 2017). Em estudos epidemiológicos e clínicos, esta linhagem foi associada a surtos de TB em populações humanas, com a progressão da TB ativa, resistência e falhas no tratamento (TRAM et al., 2018), e mostraram elevada virulência *in vitro* e *in vivo* comparado a outras linhagens (LASUNSKAIA et al., 2010; ANDRADE et al., 2012; RIBEIRO et al., 2014).

A investigação do efeito terapêutico dos derivados de tioureia **28** e **29** no tratamento da TB pulmonar severa foi comparado ao tratamento com o antibiótico padrão rifampicina utilizado no tratamento de primeira-linha da TB. Inicialmente, avaliamos o efeito terapêutico antimicobacteriano dos derivados **28** e **29** em reduzir o crescimento bacilar de *M. tuberculosis* nos pulmões dos camundongos infectados. Após quinze dias da infecção intratraqueal, os camundongos foram separados e parte dos grupos de animais foram submetidos separadamente a dose diária por via intraperitoneal dos derivados de tioureia **28**, **29** (20 mg/kg) ou rifampicina (10 mg/kg) durante um período de quinze e trinta dias de tratamento.

Os camundongos C57BL/6 não infectados foram tratados por via intraperitoneal por 15 dias com os derivados de tioureias **28** e **29**, na dose de 20 mg/kg, para avaliação de efeitos tóxicos. Ambos os derivados não apresentaram efeitos adversos ou alterações histopatológicas nos órgãos analisados (dados não mostrados).

Como pode ser observado na **Figura 19**, todos os grupos de animais tratados durante 15 dias de tratamento, independente da substância ou fármaco utilizado, diferiram significativamente dos animais somente infectados ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) em relação à redução da carga bacilar quantificado através da contagem de CFU nos pulmões dos animais. Em 30 dias de tratamento, o potencial de redução da carga bacilar pulmonar em todos os grupos tratados foi ainda maior comparado aos animais infectados e não tratados ($p < 0,001$). O estudo da cinética da replicação bacteriana nos pulmões dos animais C57Bl/6 infectados com baixa dose da cepa Mtb hipervirulenta mostrou que a carga bacilar aumenta até 28 dias, onde Mtb M299 apresentou número de CFU $2,5 \text{ Log}_{10}$ maior do que a cepa H37Rv, e posteriormente foi contida pelo efeito inibitório da imunidade adquirida estabelecida de 3 a 4 semanas p.i. (RIBEIRO et al., 2014; ALMEIDA et al., 2017).

Os animais tratados com os derivados de tioureias **28** e **29** durante 15 dias reduziram 1,1 e 1,3 respectivamente em Log_{10} do CFU apresentado pelos animais somente infectados. Enquanto, o tratamento com rifampicina no mesmo período apresentou maior capacidade de redução da carga bacilar pulmonar, de $2,2 \text{ Log}_{10}$, diferindo significativamente do potencial exibido pelo tratamento com ambas as tioureias, em menor significância em relação ao derivado **29** ($p < 0,05$). Após 30 dias de tratamento, a maior capacidade de reduzir o crescimento bacilar foi observado para ambos os derivados de tioureia, sendo uma diminuição de 1,6 e 1,8 em Log_{10} do CFU para o tratamento com o derivado **28** e **29** respectivamente comparado a carga bacilar quantificada no pulmão dos animais somente infectados (**Figura 19**).

A capacidade de ambos os derivados em inibir o crescimento de Mtb *in vitro* pode ser constatada também no modelo animal de TB pulmonar severa. Trabalhos anteriores enfatizam a importância da avaliação em modelo animal adequado de TB para substâncias potencialmente ativas contra *Mycobacterium*, utilizando para infecção cepas de Mtb emergentes e resistentes ao tratamento, e não somente cepas laboratoriais, para de fato se obter substâncias de eficácia clínica relevante (ORME, 2011; NGUTA et al., 2015). O tratamento com o derivado **29** mostrou maior tendência de redução do crescimento de Mtb hipervirulenta no pulmão dos animais tratados em relação ao derivado **28**, o que também foi observado nos ensaios *in vitro* diretamente

na cultura bacteriana da cepa de Mtb M299 (**Tabela 6**), no crescimento intracelular de Mtb H37Rv e de agregados extracelulares de Mtb M299 (**Figura 18**).

Com a maior duração do tratamento, os efeitos inibitórios induzidos pelo tratamento com rifampicina e por ambas os derivados de tioureia foram similares ($p > 0,05$). Embora a dose de rifampicina utilizada tenha sido metade do utilizado para ambas as tioureias, efeitos adversos, como diarreia foram observados de forma expressiva durante o tratamento com rifampicina. O tratamento com rifampicina em humanos é realizado na dose de 10 mg/kg (com um máximo de 600 mg uma vez ao dia), principalmente devido ao custo e toxicidade e esta dosagem tem sido utilizada em modelos murinos para TB (BRYK et al., 2020). Embora estudos da literatura sugiram otimização do tratamento da TB em altas doses de rifampicina (> 10 mg/kg) ainda não incluso nas diretrizes internacionais de tratamento da TB preconizadas pela OMS (SEIJGER et al., 2019).

É importante notar que para todos os tratamentos empregados houve dificuldade de drástica redução na carga bacilar, o que está relacionado com o fato de cepas hipervirulentas apresentarem maior taxa de crescimento em 28 dias de infecção em modelo murino, cerca de 2,5 Log_{10} maior, em comparação com cepas menos virulentas (ANDRADE et al., 2012; AMARAL et al., 2014; ALMEIDA et al., 2017).

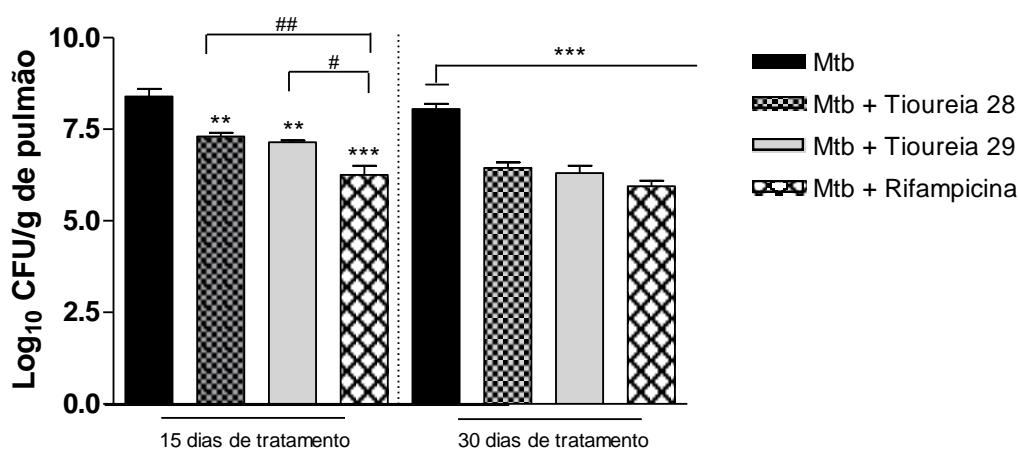


Figura 19 - Efeito do tratamento com os derivados de tioureias 28 e 29 ou rifampicina no crescimento micobacteriano nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados. Após 15 dias de infecção i.t. dos camundongos C57Bl/6 com 100 bacilos da cepa de Mtb M299 iniciou-se o tratamento diário em grupos separados ($n=6$) por 15 e 30 dias (via i.p.) com as tioureias 28 (20 mg/kg), tioureias 29 (20 mg/kg) ou rifampicina (10 mg/kg). O crescimento micobacteriano nos pulmões foi avaliado através da contagem de CFU. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão dos valores obtidos em dois experimentos independentes. $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*), comparando cada grupo tratado com o grupo apenas infectado. $p < 0,01$ (##) e $p < 0,05$ (#), comparando os grupos de animais submetidos aos tratamentos com a rifampicina com o grupo tratado com as tioureias.

5.10.1. Avaliação do efeito dos derivados de tioureias na patologia dos pulmões de camundongos infectados

Para avaliar o efeito do tratamento com os derivados de tioureias **28** e **29** na progressão da TB pulmonar severa, foi realizada a análise da patologia pulmonar dos animais infectados em comparação aos grupos de animais infectados e tratados com os derivados e com o fármaco rifampicina.

Os pulmões dos animais de cada grupo foram coletados após 15 e 30 dias de tratamento (30 e 45 dias após a infecção). O lóbulo superior do pulmão esquerdo de cada animal foi fixado com formol e fotografado para comparação da macropatologia induzida (**Figura 20A**). A massa pulmonar relativa foi obtida em relação ao peso em gramas do pulmão do grupo controle, não infectado (**Figura 20B**). O peso do pulmão total foi verificado e apresentado em gramas como média \pm desvio padrão de cada grupo (**Figura 20C**).

Como observado na **Figura 20A**, os pulmões dos animais infectados foram maiores do que o dos animais não infectados e dos animais infectados e tratados, independente do tratamento efetuado e do tempo de duração deste. Macroscopicamente, os pulmões dos animais infectados apresentavam grandes lesões inflamatórias, com nódulos difusos de coloração esbranquiçada de tamanhos diferentes, o que se associa com o aumento do peso (**Figura 20C**) e da massa relativa pulmonar, que foi 2,4 vezes maior que dos animais de controle (**Figura 20B**). Após 45 dias de infecção, a aparência macroscópica dos pulmões dos animais infectados permaneceu apresentando maior número e extensão das lesões inflamatórias (**Figura 20A**) e o peso e a massa relativa pulmonar deste grupo de animais não diferiu significativamente ($p > 0,05$) (**Fig. 20B e C**).

Em 15 dias de tratamento, os animais tratados com as tioureias **28** e **29** exibiram menor número e tamanho das lesões inflamatórias, o que condiz com a redução do peso pulmonar, em cerca de 20% e 36%, respectivamente, comparado ao peso dos pulmões dos animais infectados (**Figura 20C**). A massa relativa dos pulmões reduziu em torno de 29% e 40%, para o tratamento com os derivados **28** e **29**, respectivamente, comparado ao exibido pelos animais infectados e não tratados (**Figura 20B**). Após 30 dias de tratamento, a capacidade de redução foi mais acentuada, onde o tratamento com o derivado **28** reduziu cerca de 34% enquanto o tratamento com derivado **29** desse destacou com potencial de redução de 44% do peso pulmonar, comparado ao peso dos pulmões dos animais infectados e não tratados. (**Figura 20C**). A massa relativa dos pulmões dos animais tratados com o derivado **28** e

29 reduziu em torno de 48% e 52%, respectivamente, comparados ao exibido pelos animais infectados e não tratados (**Figura 20B**).

O tratamento com o derivado **29** apresentou maior potencial de reduzir o peso pulmonar e a massa relativa que o apresentado pelo derivado de tioureia **28**, apresentando significativa diferença no potencial de redução do peso pulmonar em 15 e 30 dias pós infecção. ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) (**Figura 20**). Isto pode sugerir que a substituição do radical 3,4-etilenodioxifenil presente no derivado **28** pelo substituinte 4-isopropilfenil no derivado **29** favoreceu melhor potencial sob este aspecto.

Comparado ao tratamento com os derivados de tioureia, os pulmões dos animais tratados com o fármaco padrão, rifampicina, durante 15 e 30 dias apresentaram maior número e tamanho das lesões inflamatórias correspondente ao maior percentual de peso e massa relativa pulmonar do que os animais tratados com ambas as tioureias (**Figura 20**). Diversos trabalhos mostraram que a presença da lesão pulmonar permanente na TB é frequente e substancial, onde até metade dos pacientes curados (após o tratamento com antibióticos) podem ter comprometimento permanente da função pulmonar de forma moderada ou grave (RACHOW et al., 2019; YOUNG et al., 2020; KILINÇ et al., 2021) e considerável redução da expectativa de vida (RALPH et al., 2013).

Os derivados de tioureia mostraram que além de atuarem no controle da proliferação micobacteriana de Mtb também foram capazes de diminuir o número e o tamanho das lesões inflamatórias, em especial o derivado **29**.

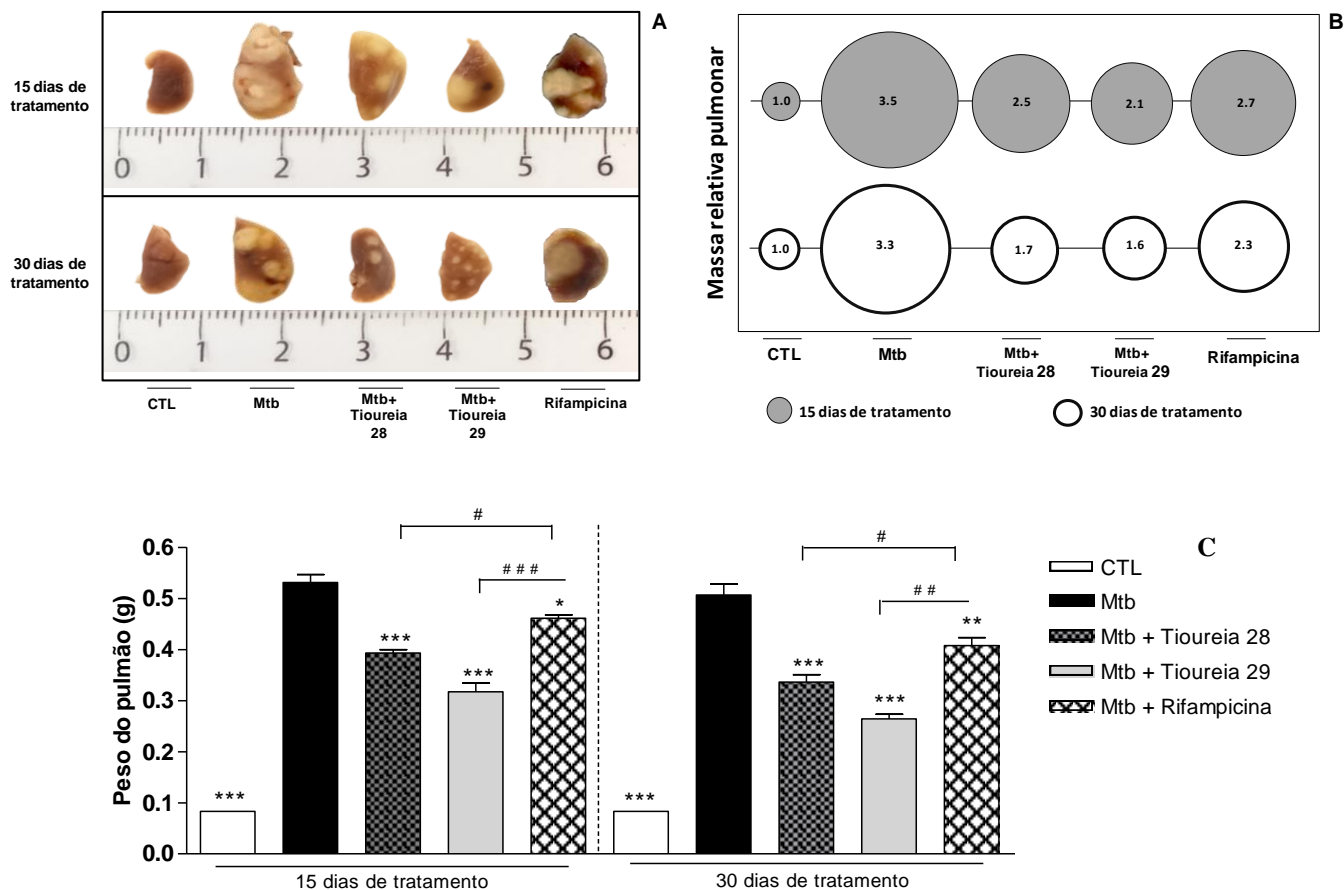


Figura 20 - Efeito do tratamento com os derivados de tioureias 28 e 29 ou rifampicina na macropatologia pulmonar induzida nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa de Mtb hipervirulenta. Após 15 dias de infecção dos camundongos C57Bl/6 com 100 bacilos da cepa de Mtb M299, os animais (6/grupo) foram tratados diariamente em grupos separados por 15 ou 30 dias (via i.p.) com as tioureias **28** ou **29** (20 mg/kg) ou rifampicina (10 mg/kg) e posteriormente eutanasiados. A macropatologia pulmonar foi avaliada qualitativamente através da imagem do lóbulo superior do pulmão esquerdo fotografado para um animal representativo de cada grupo experimental (**A**) e pelo peso pulmonar aferido em balança de precisão expresso em gramas (**C**). A massa relativa pulmonar foi determinada através da razão entre a média do peso pulmonar dos animais de cada grupo em separado pela média do peso pulmonar dos animais controles (**B**). Os resultados apresentados são média \pm desvio padrão e $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*), comparando cada grupo tratado com o grupo apenas infectado com a cepa de Mtb M299. $p < 0,001$ (###), $p < 0,01$ (##) e $p < 0,05$ (#), comparando cada grupo tratado com o grupo tratado com o fármaco rifampicina.

Em adição ao estudo da macropatologia pulmonar, a histopatologia do órgão foi verificada através do estudo das secções do pulmão corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (H&E) e Ziehl-Nielsen (ZN). A análise histopatológica dos pulmões dos animais infectados pela cepa hipervirulenta mostrou que estes animais desenvolveram patologia de TB pulmonar severa, como descrito em trabalhos anteriores do grupo utilizando este modelo murino (AMARAL et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014; ALMEIDA et al., 2017).

Em 30 dias de infecção, os pulmões dos animais infectados exibiram ampla área de pneumonia tuberculosa, cerca de 86% da área total dos cortes pulmonares, incluindo extensas áreas de necrose como resultado da fusão de lesões primárias. A

área central destes nódulos evidenciou necrose caseosa (estrela preta) com grande quantidade de BAAR extracelular (**Figura 21B**). A área periférica as lesões necróticas foram compostas por áreas de alveolite (seta preta) através da infiltração dos alvéolos com o espessamento das paredes alveolares e os alvéolos e brônquios se apresentaram cheios de células inflamatórias como macrófagos, linfócitos e predominantemente neutrófilos (**Figura 21A**). Nas regiões de alveolite, além de exsudatos celulares intra-alveolares compostos predominantemente por debris de neutrófilos foi observado uma numerosa quantidade de BAAR (**Figura 21B**). Também foi observado presença de debris celulares nas vias aéreas (seta verde). As regiões adjacentes aos nódulos granulomatosos apresentavam grande quantidade de exsudato seroso (estrela amarela).

Em 45 dias pós-infecção, os pulmões exibiram uma tendência a redução nas áreas de alveolite apresentando 80% de área de pneumonia (**Figura 22 A**), e associado ao controle de infecção pelo sistema imune atingida ao final da fase aguda da doença.

Os pulmões dos animais infectados e tratados com os derivados de tioureias **28** e **29** durante 15 dias apresentaram maior prevenção do desenvolvimento da patologia necrótica quando comparados aos animais somente infectados. Os pulmões apresentaram menor número de lesões granulomatosas e prevenção no desenvolvimento de áreas de necrose, que foram de menor extensão. Além disso, a área de alveolite ao redor da lesão necrótica e o volume de exsudato seroso nas regiões adjacentes a estas foi observado em menor quantidade (**Figura 21 C-F**).

Os pulmões dos animais tratados com o derivado **29** exibiram maior quantidade de áreas pulmonares livres e também menor quantidade de BAAR extracelular em área de necrose e de alveolite (**Figura 21 E e F**) comparado ao observado nos pulmões dos animais tratados com o derivado **28** no mesmo período de tratamento (**Figura 21 C e D**). A menor quantidade de BAAR observada nas secções pulmonares coradas por Ziehl Neelsen dos animais tratados com o derivado **29** foi confirmada através da quantificação do número de CFU/g de pulmão (**Figura 19**). O tratamento com o derivado **29** foi mais eficiente ($p < 0,01$) em diminuir a área de pneumonia em torno de 56% em 15 dias de tratamento comparado ao derivado **28** que reduziu 35% da mesma (**Figura 23**). Em 30 dias de tratamento, a redução da área de patologia pulmonar foi mais acentuada nos pulmões dos animais tratados com ambos os derivados de tioureia, incluindo menores granulomas, com ausência de alveolite e exsudato seroso, além de menor quantidade de BAAR (**Figura 22 C-F**). Novamente em 30 dias de

tratamento, o derivado **29** mostrou melhor efeito terapêutico em relação ao derivado **28** ($p < 0,05$) apresentando redução de 65% e 42% respectivamente em comparação aos animais não tratados (**Figura 23**).

Comparado aos animais tratados com a rifampicina, ambos os derivados apresentaram melhor efeito terapêutico na prevenção do desenvolvimento da patologia pulmonar necrótica, uma vez que a área de pneumonia nos pulmões dos animais tratados com rifampicina correspondeu a cerca de 70%. Em 15 dias de tratamento, os pulmões exibiram regiões com acúmulo de exsudato seroso e maior extensão das áreas de alveolite, além de extenso desenvolvimento de áreas necróticas, onde foi possível observar a presença de bacilos extracelulares (**Figura 21 G e H**). A maior duração do tratamento com rifampicina apresentou baixo potencial terapêutico em diminuir a área de pneumonia nos pulmões dos animais, que correspondeu a 60% do tecido pulmonar (**Figura 23**). Embora o tratamento com a rifampicina tenha reduzido a carga bacilar de forma mais efetiva do que os derivados de tioureia (**Figura 19**), o mesmo não propiciou redução significativa da inflamação excessiva pulmonar.

O modelo de camundongos C57Bl/6 infectados com baixa dose da cepa de *Mtb* hipervirulenta M299 reproduz diversas manifestações patológicas da TB humana severa, incluindo indução de pneumonia tuberculosa com áreas de necrose irreversível como resultado de excessiva resposta inflamatória (AMARAL et al., 2011; RIBEIRO et al., 2014; ALMEIDA et al., 2017). Sob este prisma, a utilização deste modelo murino de TB pulmonar severa aplicado em nossos estudos possibilitou a avaliação do efeito terapêutico adjuvante dos derivados de tioureia, mostrando que estes não somente possuem a capacidade de eliminar ou controlar a multiplicação micobacteriana como também na prevenção ou redução da patologia pulmonar necrótica. O emprego deste modelo animal para avaliação terapêutica de novas substâncias com potencial anti-inflamatório e anti-*Mtb* foi descrito pelo nosso grupo de pesquisa anteriormente para substâncias promissoras com ação *dual* pertencentes a diferentes classes químicas tais como a 3,4-metilenedioxi-chalcona e o macrolídeo lasiodiplodina isolado do fungo endofítico *Sordaria tamaensis* (VENTURA, 2015; CALIXTO et al., 2021).

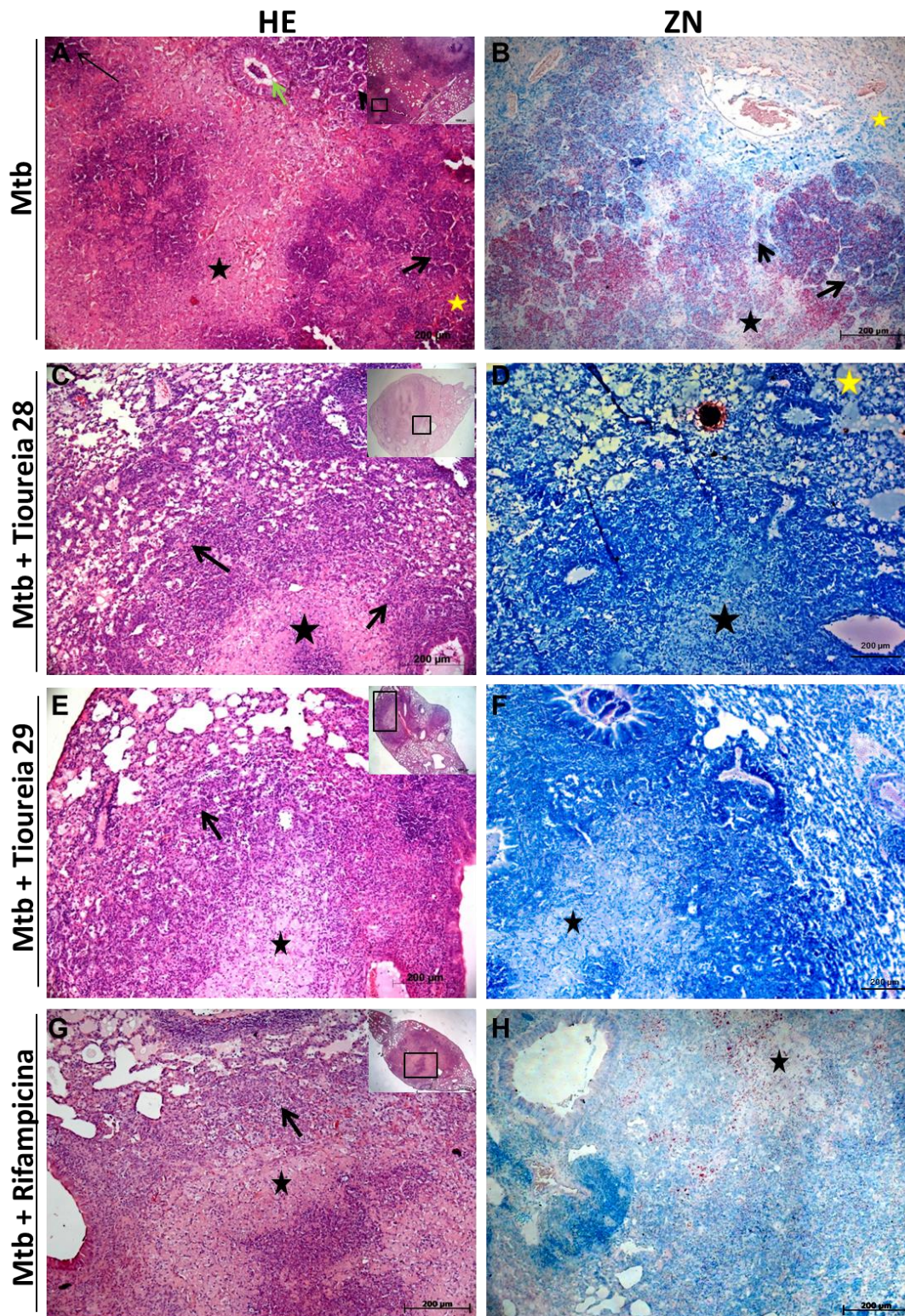


Figura 21 - Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados (30 dias de infecção) sem tratamento ou sob tratamento por 15 dias com os derivados de tioureas 28 e 29 ou rifampicina. O lóbulo superior esquerdo do pulmão foi fixado em formol e processado para a obtenção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina (H&E) e método de Ziehl Neelsen (ZN). As microfotografias foram obtidas com aumento de 100X. No canto superior direito de cada lâmina corada com H&E, encontra-se a secção do tecido total fotografada no aumento de 25X. Setas pretas indicam áreas de alveolite, a estrela preta indica área necrótica, estrela amarela corresponde a região de exsudato e seta verde presença de debris celulares nas vias aéreas. Os BAAR estão coradas em vermelho (ZN).

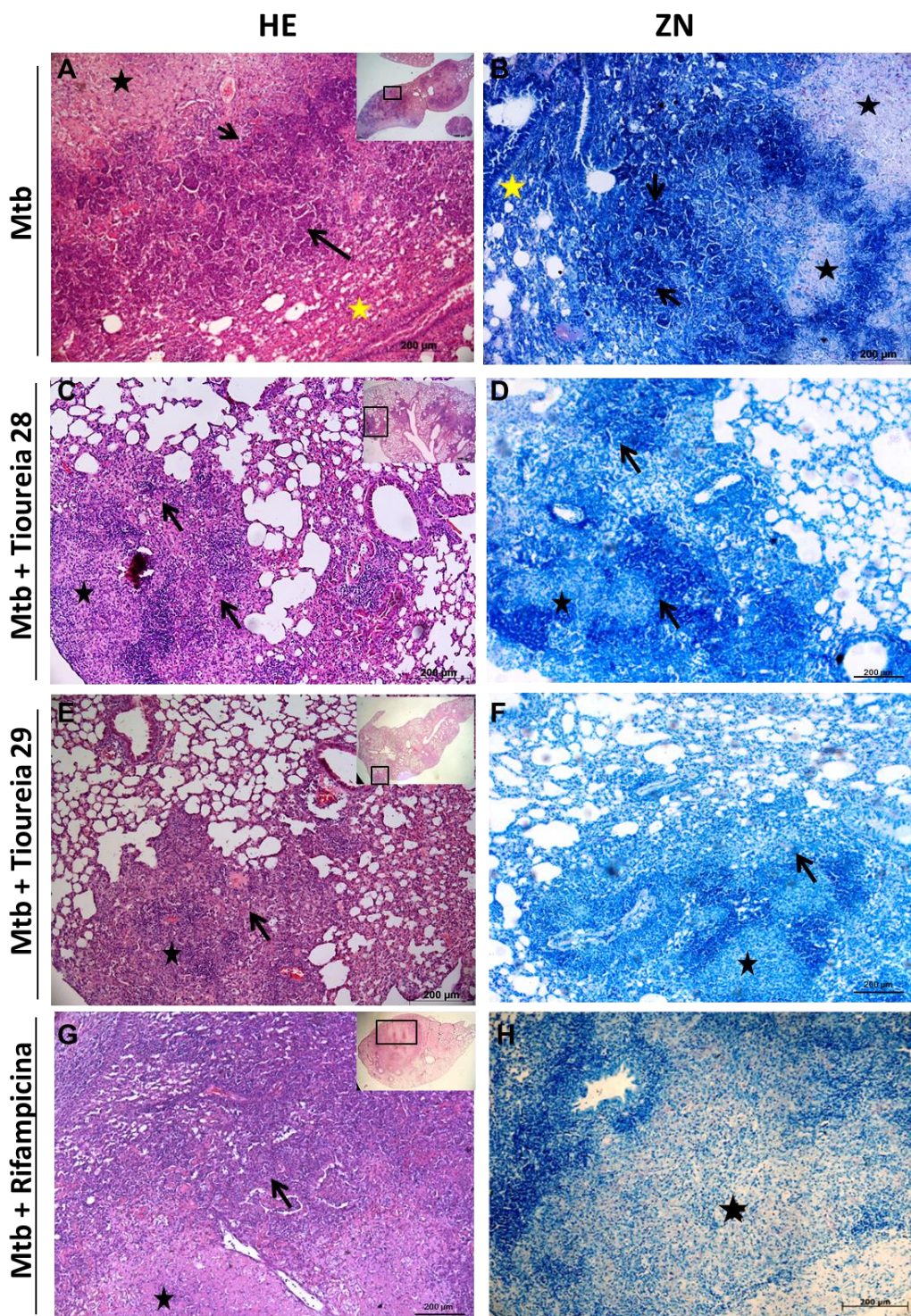


Figura 22 - Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados (45 dias de infecção) sem tratamento ou sob tratamento por 30 dias com os derivados de tioureias 28 e 29 ou rifampicina. O lóbulo superior esquerdo do pulmão foi fixado em formol e processado para a obtenção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina (H&E) e método de Ziehl Neelsen (ZN). As microfotografias foram obtidas com aumento de 100X. No canto superior direito de cada lâmina corada com H&E, encontra-se a secção do tecido total fotografada no aumento de 25X. Setas pretas indicam áreas de alveolite, estrela preta indica área necrótica e estrela amarela indica região de exsudato. Os BAAR estão coradas em vermelho (ZN).

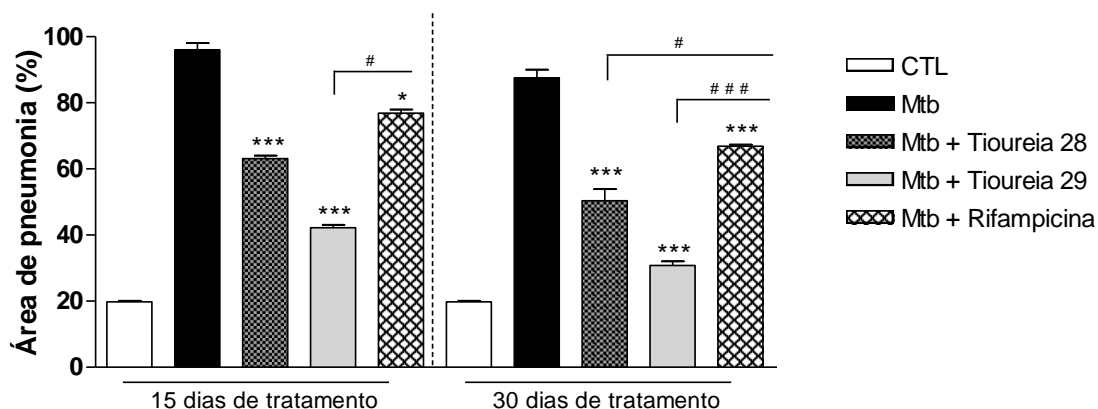


Figura 23 - Análise morfométrica da área de pneumonia nos pulmões dos animais infectados sobre efeito do tratamento com os derivados de tioureias 28 e 29 ou rifampicina. Imagens de dez seções dos pulmões de cada grupo de animais foram capturadas pela câmera Axiocam MCR-5 Zeiss, no aumento de 10X, e analisadas com o uso do programa Image J para a determinação morfométrica da área de inflamação no pulmão (área de pneumonia). Para quantificar a área de pneumonia, foi calculada a porcentagem da área pulmonar não aerada em relação a área pulmonar total (100%) de cada grupo infectado, subtraindo da média percentual da área não aerada nos pulmões de controle (tecido pulmonar). Os resultados obtidos em dois experimentos independentes foram apresentados como média \pm desvio padrão (n=4). $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*), comparando cada grupo tratado com o grupo apenas infectado com a cepa Mtb M299. $p < 0,001$ (###), $p < 0,01$ (##) e $p < 0,05$ (#), comparando cada grupo tratado com o grupo apenas com o grupo tratado com o fármaco rifampicina.

5.10.2. Análise fenotípica das células inflamatórias nos pulmões dos camundongos infectados e tratados com os derivados de tioureias 28 e 29

Para entender o mecanismo pelo qual os derivados de tioureias **28** e **29** exercem o efeito terapêutico na redução da patologia pulmonar, avaliamos o influxo de leucócitos inflamatórios para os pulmões dos animais infectados através da avaliação fenotípica das principais subpopulações de células mieloides que foram recrutadas para os pulmões destes animais.

As células mieloides foram identificadas como positivas para expressão de CD11b, uma integrina expressa na superfície de células mieloides. A partir da seleção das células CD11b⁺, foi realizado análise para marcadores adicionais relacionados ao número de células positivas para expressão de Ly6G (células CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C⁺), uma proteína expressa majoritariamente por neutrófilos. As células mieloides CD11b⁺ Ly6G⁻ também foram avaliadas quanto a expressão de CD11c, uma integrina expressa predominantemente na superfície de células dendríticas e em macrófagos alveolares, e quanto a expressão de Ly6C, um marcador das populações de monócitos e macrófagos ativados. (**Figura 24**). Deste modo, monócitos/macrófagos inflamatórios foram identificados como células CD11b⁺Ly6C^{hi}CD11c⁻Ly6G⁻, células dendríticas como

células CD11b⁺CD11c⁺Ly6C⁻Ly6G⁻ ou células dendríticas derivadas de monócitos como células CD11b⁺CD11c⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻ e neutrófilos CD11b⁺Ly6G⁺.

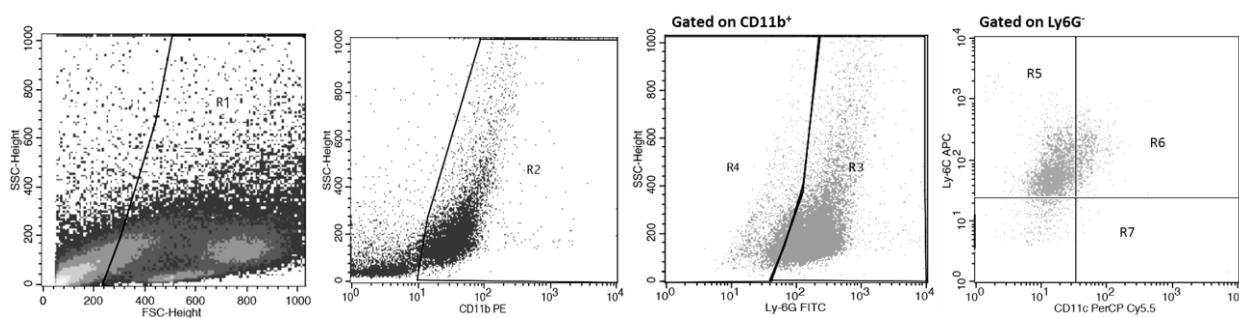


Figura 24 - *Dot plots* representativos da definição das regiões selecionadas para imunofenotipagem das células mieloides obtidas do pulmão do animal infectado através da citometria de fluxo. A partir da população de células pulmonares viáveis (R1) foi selecionado as células mieloides CD11b⁺ (R2) e então foi avaliado dentro desta população a expressão positiva e negativa de Ly6G (R3 - células Ly6G⁺, R4 - Ly6G⁻). Posteriormente as células mieloides CD11b⁺ Ly6G⁻ foram avaliadas quanto a expressão de Ly6C e CD11c (R5, R6 e R7). As áreas delimitadas representam o selecionamento da população pretendida para avaliação.

Em consonância com a presença de grande aglomerado de leucócitos nos pulmões dos animais infectados, principalmente de macrófagos e neutrófilos, observados através das análises microscópicas (**Figuras 21 e 22**), as análises de citometria de fluxo das células pulmonares obtidas destes animais apresentaram elevado percentual de células CD11b⁺, população celular mielóide, nos pulmões dos animais após 30 de infecção, representando cerca de 70% da população celular analisada. Em 45 dias pós infecção, o número de células mieloides nos pulmões dos animais infectados apresentou diminuição ($p < 0,05$) (**Figura 25A**),

Trabalhos anteriores demonstraram o recrutamento acelerado de células CD11b⁺ para o pulmão de animais C57Bl/6 infectados via aerossol com baixa dose de Mtb H37Rv em 30 dias de infecção (OBRÉGON-HENAO et al., 2013). O número de células CD11b⁺ nos pulmões dos animais infectados intratraquealmente com cepa Mtb hipervirulenta após 21 dias foi descrito sendo pelo menos dez vezes maior comparado a cepa padrão H37Rv (ALMEIDA et al., 2017) e após 45 dias de infecção, o número destas células começa a diminuir em virtude da contenção da proliferação bacteriana pela resposta imune adquirida, o que corrobora com o observado para os animais infectados pela cepa Mtb M299 e a reprodutibilidade do modelo *in vivo*.

O número das células CD11b⁺ nos pulmões dos animais tratados com ambos os derivados de tioureia **28** e **29** durante 15 dias foi significativamente reduzido em 47,6% e 66,3% respectivamente ($p < 0,001$) em relação aos animais somente infectados. Este efeito foi mais acentuado em 30 dias de tratamento, com a redução de 57,6% e 78,8%

no número de células CD11b⁺ para o derivado **28** e **29**. O efeito inibitório do derivado **29** sobre esta população celular em 15 e 30 dias de tratamento foi maior comparado ao observado para o derivado **28** ($p < 0,05$) (**Figura 25A**), o que coincide com o menor potencial desta em reduzir o peso e a massa relativa dos pulmões dos animais tratados (**Figura 20B**).

Em comparação ao tratamento com o antibiótico padrão rifampicina, ambos os derivados de tioureias **28** e **29**, independente do período de tratamento apresentaram maior capacidade de redução do número de células mieloides CD11b⁺, sendo a diferença mais significativa em relação ao derivado **29** ($p < 0,001$).

Comparado aos animais infectados, o tratamento com rifampicina também ocasionou redução significativa do recrutamento de células CD11b⁺, embora com menor potencial, de 28-33% até 30 dias de tratamento, condizente com menor potencial de reduzir a imunopatologia observada nos animais tratados (**Figura 21**), embora apresente maior potencial de redução da carga bacilar em 15 dias de tratamento (**Figura 19**).

A população de neutrófilos (células Ly6G⁺) foi predominante nos pulmões dos animais infectados pela cepa Mtb M299 em 30 dias de infecção, representando de 55-60% do número de células mieloides (**Figura 25B**), enquanto as populações de fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos inflamatórios e células dendríticas) se apresentaram em proporção pelo menos 2 vezes menor (**Figura 25 D-E**). Em 45 dias pós infecção, o número de neutrófilos nos pulmões dos animais iniciou uma diminuição (**Figura 25B**), contudo a relação de proporção para com o número de fagócitos mononucleares se manteve, onde o número de células dendríticas continuou a aumentar (**Figura 25 D-E**). Esta cinética populacional no número de neutrófilos e fagócitos mononucleares no período de 28 e 45 dias pós infecção está em concordância com a caracterização da dinâmica das lesões pulmonares em modelo murino de TB severa infectado pela cepa de Mtb hipervirulenta descrita por Almeida e colaboradores (2017) e observado nos trabalhos do nosso grupo avaliando o efeito terapêutico de diferentes substâncias no modelo murino em questão (VENTURA, 2015; CALIXTO et al., 2021).

Ambos os tratamentos com o derivado **28** e **29** apresentaram capacidade de reduzir as principais subpopulações mieloides avaliadas, especialmente em 30 dias de tratamento. A maior capacidade de redução foi observada no número de neutrófilos, sendo de 51,4% e 74,1% respectivamente em 15 dias de tratamento, e de 64,5% e 81% em 30 dias de tratamento. A redução da população de neutrófilos pela rifampicina

foi significativamente menor, em torno de 30 e 35% durante o mesmo período de tratamento (**Figura 25B**). O tratamento com o derivado **29** foi mais potente na redução da população de neutrófilos em 15 dias de tratamento comparado ao efeito exibido pelo derivado **28** ($p < 0,05$) e pela rifampicina em ambos os períodos de tratamento ($p < 0,001$) (**Figura 25B**).

A subpopulação de monócitos\macrófagos inflamatórios também foi reduzida após tratamento com ambos os derivados de tioureia (**Figura 25C**). O derivado **29** destacou-se novamente em reduzir o número desta subpopulação tanto em 15 dias quanto em 30 dias ($p < 0,05$), pelo menos em 67%, comparado ao derivado **28** (redução de 45%), o que condiz com o maior potencial inibitório observado para o derivado **29** frente ao número de células mieloides CD11b⁺ (**Figura 25A**) e indica que a alteração estrutural neste derivado propiciou melhor efeito sobre as populações mieloides recrutadas. O tratamento com rifampicina exibiu menor efeito sobre a população de macrófagos e monócitos inflamatórios, de 25% a 30% comparado a redução da população de neutrófilos (**Figura 25C**). Em relação às subpopulações de células dendríticas, um maior efeito na redução da mesma foi observado para ambos os derivados de tioureia em 30 dias de tratamento comparado ao observado para os animais infectados e para o grupo de animais tratados com rifampicina (**Figura 25D e E**), que em geral não apresentou diferença significativa em relação ao animais somente infectados.

A capacidade dos derivados **28** e **29** em diminuir o acúmulo excessivo de infiltrado celular inflamatório no pulmão é fundamental para prevenir a imunopatologia da TB severa dirigida pelo recrutamento acelerado de células mieloides para o pulmão, uma vez que o acúmulo celular comprime as estruturas alveolares e endoteliais levando-as ao colapso, contribuindo para a necrose tecidual (ORME, 2011; TORRADO et al., 2010; MARZO et al., 2014). A capacidade de redução do influxo de neutrófilos apresentada pelos derivados de tioureia correlaciona com a diminuição da severidade da TB no modelo murino. O influxo celular especialmente de neutrófilos tem sido abordado por diversos autores por ter papel fundamental no processo de necrose, sendo uma das primeiras células a adentrar nas lesões inflamatórias e permissíveis a infecção por Mtb que induz novos ciclos de replicação bacteriana favorecendo sua disseminação (AMARAL et al., 2014). Além disso, os neutrófilos secretam produtos microbicidas e citotóxicos durante sua morte celular que possui maior efeito prejudicial a integridade da vasculatura local e do tecido circundante. Os debris celulares neutrofílicos contribuem coalescendo para formar a necrose central característica do

granuloma caseoso (OBRÉGON-HENAO et al., 2013; ALEMIDA et al., 2017; MOREIRA-TEIXEIRA et al., 2020). Na TB humana, a população neutrofílica é predominante encontrada nas vias aéreas e marcadores associados a neutrófilos predominam em análise transcricional do sangue de pacientes com TB (DE MELO et al., 2019).

Comparado ao tratamento com a rifampicina, os derivados de tioureia **28** e **29** apresentaram além de boa tolerabilidade, maior efeito terapêutico em termos de patologia pulmonar, tendo em vista que o tratamento com a rifampicina apresentou menor capacidade em diminuir o influxo de células inflamatórias e inflamação no pulmão condizente com o fato de não exibir redução significativa da área de pneumonia ou de áreas necróticas. Estes resultados sustentam a importância da abordagem de tratamento adjuvante, anti-inflamatória e antimicobacteriana, incentivada pela OMS nos casos de TB severa associada com a resposta inflamatória exacerbada (RACHOW et al., 2019; YOUNG et al., 2020; KRUG et al., 2021).

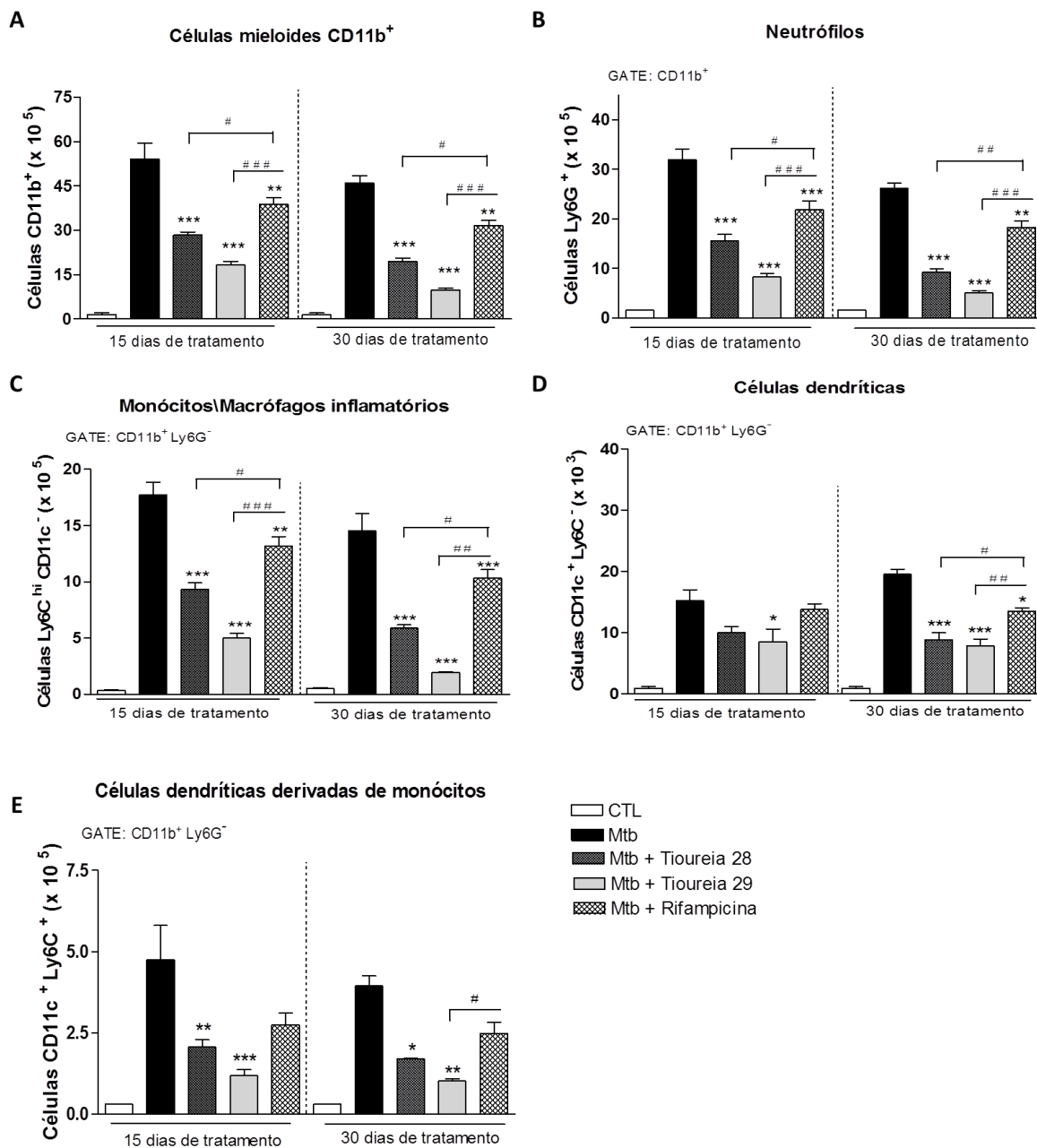


Figura 25 - Análise fenotípica do infiltrado celular pulmonar dos animais infectados pela cepa de Mtb hipervirulenta M299 sobre efeito do tratamento com os derivados de tioureias 28 e 29 ou rifampicina. O lóbulo inferior esquerdo e os lóbulos superior, médio e inferior direito dos pulmões dos camundongos infectados de cada grupo foram utilizados para obtenção de células. As células pulmonares de cada animal foram tratadas com uma combinação de anticorpos (anti-CD11b-PE, Ly6G-FITC, CD11c-PercP-Cy5.5, Ly6C-APC). Posteriormente ao tratamento, as células foram fixadas e analisadas em citômetro de fluxo para identificação das subpopulações de células (A) mieloides, (B) neutrófilos, (C) macrófagos e monócitos inflamatórios, (D) células dendríticas e (E) dendríticas derivadas de monócitos. $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*), comparando cada grupo tratado com o grupo apenas infectado com a cepa Mtb de M299. $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (#), comparando cada grupo tratado com o grupo tratado com o fármaco rifampicina.

5.10.3. Análise do perfil de mediadores inflamatórios produzidos *ex vivo* pelas células dos pulmões dos camundongos infectados tratados com os derivados de tioureias 28 e 29

Tendo em vista que os perfis de mediadores inflamatórios produzidos pelas células pulmonares dos animais infectados são decorrentes dos diferentes níveis de ativação celular para cada subpopulação no foco inflamatório granulomatoso (WILSON et al., 2019), verificamos nos sobrenadantes da cultura *ex vivo* das células pulmonares a produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 por ELISA tipo sanduíche e de óxido nítrico (NO) através do método de Griess (**Figura 26**).

As células obtidas dos pulmões dos animais infectados secretaram elevados níveis dos mediadores pró-inflamatórios NO, TNF- α e IL-1 β (**Figura 26A-C**) e menor produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (**Figura 26D**) comparado aos demais mediadores, o que condiz com o desenvolvimento de extensa área de pneumonia com presença de elevado número de células inflamatórias no pulmão (**Figura 23**). Em 45 dias pós-infecção foi observada uma tendência a regulação negativa da produção de TNF- α e NO pelas células isoladas dos animais infectados ($p > 0,05$), e diminuição significativa da produção de IL-1 β ($p < 0,01$), o que coincidiu com diminuição da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 ($p < 0,001$), relativo a transição da doença para a fase crônica inicial, caracterizada pelo controle da infecção e inflamação (ALEMIDA et al., 2017). É bem descrito que a interação entre a rede de citocinas inatas tem papel central no desfecho clínico da infecção da TB (MOREIRA-TEIXEIRA et al., 2020),

Em pacientes com TB grave, níveis elevados de citocinas inflamatórias foram observados e associados a inflamação e dano pulmonar. Níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias do soro de pacientes, como IFN γ , TNF- α , IL-17, IL-1 β e MCP-1. Os níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β estão correlacionados com a gravidade da doença (BONI et al., 2022), sustentando a importância da investigação de novos candidatos ao tratamento adjuvante da TB severa quanto a capacidade de modulação de citocinas estratégicas. O tratamento com os derivados de tioureias 28 e 29 reduziram significativamente a produção dos mediadores pró-inflamatórios (NO, TNF- α e IL-1 β) avaliados, em ambos os períodos de tratamento (**Figura 26A-C**). O potencial inibitório da produção dos mediadores pró-inflamatórios apresentado pelo derivado 29 destacou-se comparado ao observado para o derivado 28 e diferiu significativamente no período de 15 dias de tratamento, especialmente em relação à produção de IL-1 β ,

alcançando a redução de 75-80% do nível desta citocina em 30 dias de tratamento comparado aos animais infectados (**Figura 26C**). Ressalta-se que o tratamento com o derivado **29** aumentou significativamente os níveis de produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em relação aos animais infectados (de 25-30%), demonstrando a capacidade de equilibrar a resposta imune induzida nos pulmões dos animais por Mtb, entre elementos pró e anti-inflamatórios, a fim de conter a resposta inflamatória inadequada.

A presença da capacidade inibitória apresentada por ambos os derivados de tioureia no modelo de macrófagos estimulados *in vitro* (**Figura 17 e Tabela 3**) frente aos mediadores pró-inflamatórios avaliados foi sustentada também no modelo murino de TB severa, indicando a importância do *screening* inicial em ambos os contextos, anti-TB e anti-inflamatório, para seleção de substâncias candidatas ao tratamento adjuvante da TB severa e as possíveis vantagens de ação *dual* para uma mesma substância na redução do período de tratamento, no número de fármacos administrados e simplificação da terapia.

O tratamento com rifampicina apresentou baixo potencial em reduzir a produção das citocinas TNF- α e IL-1 β pelas células isoladas dos pulmões dos animais tratados, enquanto os níveis de NO e IL-10 não diferiram significativamente do induzido pela infecção por Mtb nas células isoladas dos animais somente infectados. Estes dados corroboram com o fato de que apenas o tratamento com antibiótico em casos severos de TB com resposta hiperinflamatória não previne ou diminuiu o influxo celular para o pulmão, não sendo capaz de modular a produção de citocinas pelas células recrutadas, culminando no desenvolvimento de extensa patologia necrótica que requer nestes casos intervenção focada na resposta imune do indivíduo.

Os níveis diminuídos de produção dos mediadores pró-inflamatórios (NO, TNF- α e IL-1 β) foram associados à redução do acúmulo de células mielóides nos pulmões dos animais infectados e do desenvolvimento de patologia necrótica associada à infecção por cepas de Mtb hipervirulentas M299. A capacidade de modular a produção da citocina pró-inflamatória IL-10 pode sugerir uma modulação da produção local de citocinas pelas células do pulmão. O potencial de modulação da produção de mediadores inflamatórios pelos derivados de tioureia é fundamental para o efeito terapêutico observado considerando que o estudo de Almeida e colaboradores (2017) descreveu que o desenvolvimento da necrose coincide com o pico de infiltração de células inflamatórias e com a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.

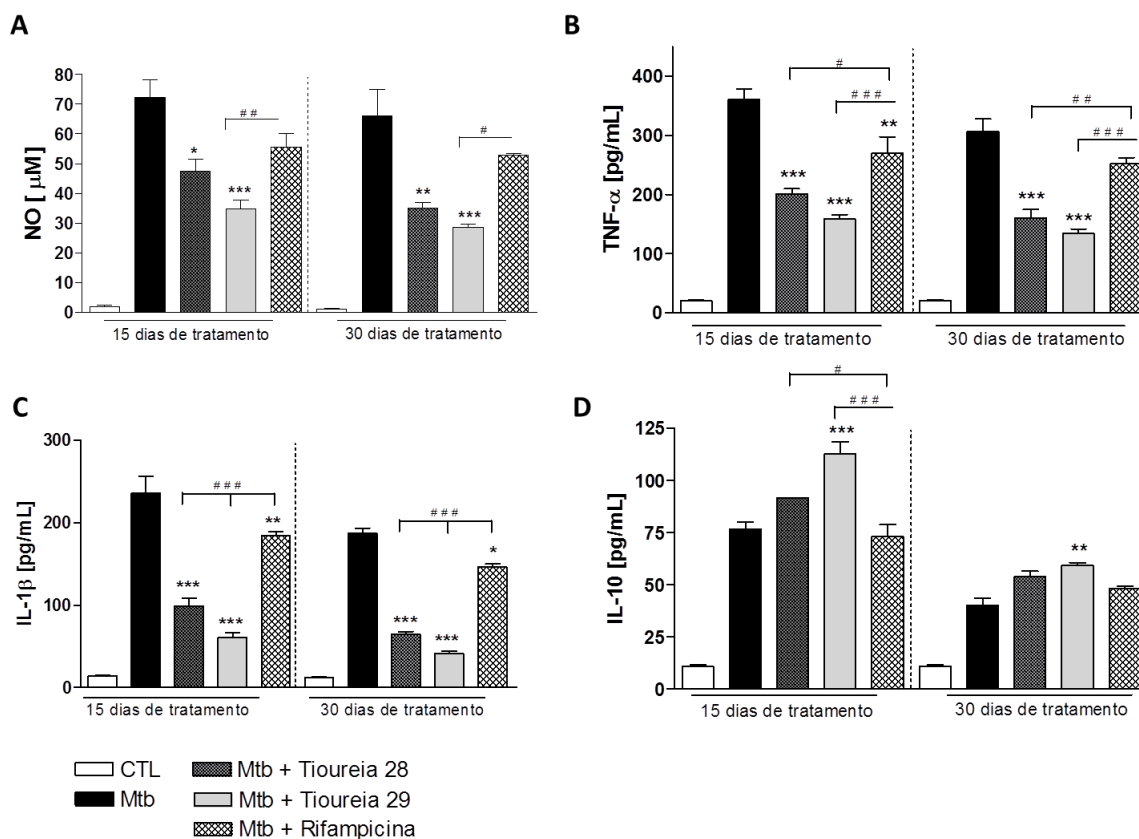


Figura 26 – Análise da produção de citocinas e de óxido nítrico pelas células pulmonares dos animais infectados com a cepa de Mtb hipervirulenta M299 e tratados com a tiourea 28 e 29 e rifampicina. Os gráficos representam os resultados obtidos para as citocinas: NO (A), TNF- α (B), IL-1 β (C) e IL-10(D). Os resultados foram obtidos em dois experimentos independentes e foram apresentados como média \pm desvio padrão (n=4). p < 0,01 (***), p < 0,01 (**), p < 0,05 (*) comparando cada grupo com o grupo apenas infectado com a cepa Mtb M299. p < 0,001 (###), p < 0,01 (##) e p < 0,05 (#), comparando cada grupo tratado com o grupo apenas com o grupo tratado com o fármaco rifampicina.

Vale ressaltar que o modelo murino de camundongos C57Bl/6 é relativamente resistente a infecção por Mtb e que após 3 a 4 semanas de infecção, o sistema imune é capaz de controlar a progressão da doença na maioria dos animais o que correlaciona com a regulação negativa da inflamação pulmonar na fase crônica (RIBEIRO et al., 2014). O efeito de substâncias com atividade *dual* assim como de fármacos anti-inflamatórios, incluindo ibuprofeno estudados para complementação adjuvante do tratamento para TB durante a fase crônica da doença com baixo nível de inflamação deve ser melhor estudado, a fim de analisar o grau de severidade da doença e principalmente o período de intervenção de modo que a mesma não afete a resposta anti-TB destinada à eliminação do agente patogênico (LECHARTIER et al., 2014).

No âmbito da classe das tioureias, esta é a primeira descrição de atividade *dual*, antimicobacterina e anti-inflamatória em modelo murino de TB grave, destacando o potencial dos derivados **28** e **29** como substâncias promissoras para estudos

prospectivos que visam a geração de novos fármacos anti-TB para o tratamento adjuvante dos casos graves da TB associada a inflamação exacerbada.

7. CONCLUSÕES

- Quarenta e seis derivados de tioureias foram sintetizados e dentre eles, quinze (**3**, **10**, **28**, **31**, **32**, **34-37**, **39**, **40** e **43-46**) possuem estrutura química inédita;
- Dezenove derivados de tioureia (**7**, **10**, **14-16**, **18**, **23**, **25**, **28-32**, **35**, **37**, **38**, **41**, **42** e **45**) foram ativos contra a cepa Mtb H37Rv, atuando seletivamente contra o bacilo, destacando-se os derivados **16**, **28** e **29**;
- Treze derivados da tioureia (**4**, **5**, **10**, **11**, **15**, **16**, **19**, **20**, **22**, **24**, **27**, **28** e **29**) foram capazes de inibir a produção de NO, com destaque para os derivados **10**, **11**, **22**, **27** e **29**, *in vitro*;
- O estudo de SAR mostrou que diferentes parâmetros na estrutura química das tioureias influenciaram na presença ou ausência de atividade contra Mtb H37Rv. Os estudos farmacocinéticos mostraram menores riscos toxicológicos para os derivados de tioureia **10**, **15**, **16**, **28** e **29** em comparação a rifampicina;
- Os cinco promissores derivados de tioureia (**10**, **15**, **16**, **28** e **29**) foram capazes de inibir a produção de TNF- α e IL-1 β *in vitro*, destacando-se **28** para IL-1 β , e a **29** para TNF- α ;
- Os derivados **10**, **15**, **16**, **28** e **29** apresentaram de baixo a moderada capacidade de sequestro do radical NO, contudo o mecanismo de inibição da produção de NO em macrófagos foi substancialmente justificado pela inibição da expressão enzimática da iNOS;
- Os derivados de tioureia **10**, **15**, **16**, **28** e **29** foram capazes de suprimir o crescimento intracelular bacteriano em macrófagos infectados por Mtb H37Rv e de agregados bacterianos extracelulares de Mtb hipervirulenta;
- Os derivados de tioureia **16**, **28** e **29** apresentaram efeito *dual*, antimicobacteriano e anti-inflamatório, alta seletividade contra Mtb, interessantes propriedades físico-químicas que podem estar relacionadas à atividade antimicobacteriana e um bom perfil farmacocinético *in silico*;

- Sete derivados de tioureia (**2**, **3**, **10**, **35**, **36**, **40** e **43**) foram potentes contra cepa *M. kansasii* de referência 12478, sendo os derivados **2**, **10** e **17** mais ativos contra cepas *M. kansasii* de elevada virulência;
- Em camundongos, o tratamento com os derivados de tioureia **28** e **29** inibiram o crescimento bacteriano nos pulmões e reduziu em número e tamanho as lesões inflamatórias e a área de pneumonia tuberculosa;
- A diminuição da patologia no pulmão foi relacionada à capacidade dos derivados de tioureia **28** e **29** em diminuir o influxo de células inflamatórias no pulmão, principalmente neutrófilos, propiciando a redução da necrose nestas áreas e por conseguinte também reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 pelas células dos pulmões;
- Os dados obtidos neste trabalho demonstraram pela primeira vez para a classe das tioureias, que os derivados de tioureia **28** e em especial o derivado **29** exibem ação anti-inflamatória e antimicobacteriana, apresentando melhor efeito terapêutico do que o tratamento com rifampicina no modelo de TB pulmonar severa induzido por cepa hipervirulenta e são promissores para estudos prospectivos que visam à geração de novos fármacos anti-TB para o tratamento dos casos graves da TB associados com a inflamação exacerbada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **AGUIAR**, L. C. S.; VIANA, G. M.; ROMUALDO, M. V. S.; COSTA, M. V.; BONATO, B. S. A. (2011) Simple and Green Procedure for the Synthesis of N-Benzylthioureas. *Letters in Organic Chemistry*. 8:540-544.
2. **AHAMED**, D.; BOULLE, M.; GANGA, Y.; MC-ARTHUR, C.; SKROCH, S.; OOM, L.; CATINAS, O.; PILLAY, K.; NAICKER, M.; RAMPERSAD, S.; MATHONSI, C.; HUNTER, J.; WONG, E. B.; SULEMAN, M.; SREEJIT, G.; PYM, A. S.; LUSTIG, G.; SIGAL, A. (2017) Intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* after macrophage cell death leads to serial killing of host cells. *Elife*, v. 28, p. 22028.
3. **AKRAM**, SAMI M.; RAWLA, PRASHANTH. *Mycobacterium kansasii*. (2021) IN: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
4. **ALMEIDA**, F. M.; VENTURA, T. L. B.; AMARAL, E. P.; RIBEIRO, S. C. M.; CALIXTO, S. D.; MANHÃES, M. R.; REZENDE, A. L.; SOUZA, G. S.; CARVALHO, I. S.; SILVA, E. C.; SILVA, J. A.; CARVALHO, E. C. Q.; KRITSKI, A. L.; LASSOUNSKAIA, E. (2017) Correction: Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain triggers necrotic lung pathology associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice. *PLoS One*, v. 12, n. 4, p. E0175652.
5. **AMARAL**, E. P.; LASUNSKAIA, E. B.; D'IMPÉRIO-LIMA, M. R. (2015) Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. *Microbes and Infection*, v. 18, n. 1, p. 11-20.
6. **AMARAL**, E. P.; RIBEIRO, S. C. M.; LANES, V. R.; ALMEIDA, F. M.; ANDRADE, M. R. M.; BOMFIM, C. C. B.; SALLES, E. M.; BORTOLUCI, K. R.; COUTINHO-SILVA, R.; HIRATA, M. H.; ALVAREZ, J. M.; LASUNSKAIA, E. B.; D'IMPÉRIO-LIMA, M. R. (2014) Pulmonary infection with hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *Plos Pathogens*, v. 10, n. 7, p. e1004188.
7. **ANDRADE**, M. R. M.; AMARAL, E. P.; RIBEIRO, S. C. M.; ALMEIDA, F. M.; PERES, T. V.; LANES, V. R.; D'IMPÉRIO-LIMA, M. R.; LASUNSKAIA, E. B. (2012) PATHOGENIC *Mycobacterium bovis* strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. *BMC Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 166.
8. **ANGALA**, S. K.; PALČEKOVÁ, Z.; BELARDINELLI, J. M.; JACKSON, M. (2018) Covalent modifications of polysaccharides in mycobacteria. *Nat Chem Biol*. V.14(3). P. 193-198.

- 9. ANGYAL, A.; DEMJÉN, A.; WÖLFING, J.; PUSKÁS, L.G.; KANIZSAI, I.** 2017. A green, isocyanide-based three-component reaction approach for the synthesis of multi substituted ureas and thioureas. *Tetrahedron Lett*, v. 59 (1) p. 54-57.
- 10. ARRANZ-TRULLÉN, J., LU, L.; PULIDO, D.; BHAKTA, S.; BOIX, E.** (2017) Host Antimicrobial Peptides: the promise of new treatment strategies against Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1499.
- 11. BALTZ, R. H.** (2014) Spontaneous and induced mutations to rifampicin, streptomycin and spectinomycin in resistances in actinomycetes: mutagenic mechanisms and applications for strain improvement. *The Journal of Antibiotics*. v. 67, p. 619–624.
- 12. BARANOWSKI, Catherine; REGO, E. Hesper; RUBIN, Eric J.** The Dream of a Mycobacterium. *Gram- Positive Pathogens*, v. 1, p. 1096-1106.
- 13. BARBERIS, I.; BRAGAZZI, N. L.; GALLUZZO, L.; MARTINI, M.** (2017) The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of Preventive Medicine Hygiene*, v. 58, p. E9-E12.
- 14. BASARABA, RANDALL J.; OJHA, ANIL K.** Mycobacterial biofilms: revisiting tuberculosis bacilli in extracellular necrotizing lesions. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, v.1, p.533-539.
- 15. BATEY, R. A.; POWELL, D. A.** (2000). A General Synthetic Method for the Formation of Substituted 5-Aminotetrazoles from Thioureas: A Strategy for Diversity Amplification. *Organic Letter.*, v. 2 p. 20.
- 16. BEHAR, S. M.; BOOTY, M. G.; NISHIMURA, T.; ZHAO, X.; GAN, H-X.; DIVANGAHI, M.; REMOLD, H. G.** (2011) Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunology*, v. 4, p. 279-287.
- 17. BIELENICA, A.; SANNA, G.; MADEDDU, S.; GILIBERTI, G.; STEFAŃSKA, J.; KOZIOL, A. E.; SAVCHENKO, O.; STRZYGA-ŁACH, P.; CHRZANOWSKA, A.; KUBIAK-TOMASZEWSKA, G.; STRUGA, M.** (2018). Disubstituted 4-Chloro-3-nitrophenylthiourea Derivatives: Antimicrobial and Cytotoxic Studies. *Molecules*, v.21, p 2428.
- 18. BONI, F. G.; HAMDY, I.; KOUNDI, L.M.; SHRESTHA, K.; XIE, J.** (2022). Tempestade de citocinas na tuberculose e envolvimento il-6. *Infecção, Genética e Evolução*, v. 97, p. 105166.
- 19. BRAMBILLA, C.; LORENS-FONS, M.; JULIÁN, E.; NOGUERA-ORTEGA, E.; TOMÀS-MARTÍNEZ, C.; PÉREZ-TRUJILLO, M.; BYRD, T. F.; ALCAIDE, F.; LUQUIN, M.** (2016) Mycobacteria Clumping Increase Their Capacity to Damage Macrophages. *Frontiers Microbiology*, v. 4, p.1562.

- 20. BRYK, R.; MUNDHRA, S.; JIANG, X.; WOOD, M.; PFAU, D.; WEBER, E.; NATHAN, C. (2020).** Potentiation of rifampin activity in a mouse model of tuberculosis by activation of host transcription factor EB. *PLoS pathogens*, v. 16, p. e1008567.
- 21. BUHLER, V. B.; POLLAK, A. 1953.** Human infection with atypical acid-fast organisms; report of two cases with pathologic findings. *American Journal Clinical Pathology*, v. 23, p. 363-74.
- 22. BUONSENSO, D.; SERRANTI, D.; VALENTINI P. (2010)** Management of central nervous system tuberculosis in children: light and shade. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 14, n. 10, p. 845-853.
- 23. BUSSI, C.; GUTIERREZ, M. G. (2019)** Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. *FEMS microbiology reviews*, v.43, p. 341-361.
- 24. BUU-HOI, P.; XUONG, D.; NAM, H. (1995)** N,N'-Diarylthioureas and related compounds of potential biological interest. *Journal of Chemical Society*, v.1, p. 1573-1581.
- 25. CALIXTO, S. D.; SIMÃO, T. L. B. V.; DE ALMEIDA, F. M.; ANTUNES, S. S.; ROMEIRO, N. C.; DE SOUZA BORGES, W.; MUZITANO, M. F. (2022).** (R)-(+)-Lasiodiplodin isolated from the endophytic fungus *Sordaria tamaensis* exhibits potent antimycobacterial and anti-inflammatory activities in vitro and in vivo: a dual approach for the treatment of severe pulmonary tuberculosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 74, p. 446-457.
- 26. CAMPOS, R.; PIANTA, C. (2001)** Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunológica, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul - Brasil. *Boletim da Saúde*, v. 15, p. 61-71.
- 27. CANSIZ, A.; KOPARIR, M.; KAZAZ, C.; CETIN, A. 2006.** The synthesis and spectral investigations of new derivatives of 1,3,4-oxadiazole, 1,3,4-thiadiazole, and 1,2,4-triazole. *Organic Chemistry: An Indian Journal*, v.2, p. 140-149
- 28. CASSIDY, P. Maureen et al.** Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, p. e124-e129, 2009.
- 29. CASTELLANI, A. (1939)** Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 42, p. 65-72.
- 30. CAVIEDES, L.; DELGADO, J. AND GILMAN, R.H. (2002)** Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 1873-1874.

- 31. CHAI**, QIYAO; ZHANG, YONG; LIU, CUI HUA. (2018) Mycobacterium tuberculosis: na adaptable pathogen associated with multiple human diseases. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 8, p. 158.
- 32. CHANDRASEKARAN**, P.; SARAVANAN, N.; BETHUNAICKAN, R.; TRIPATHY, S. (2017) Malnutrition: Modulator of Immune Responses in Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1316.
- 33. CHAYAH**, M.; CARRIÓN, M. D.; GALLO, M. A.; JIMÉNEZ, R.; DUARTE, J.; CAMACHO, M. E. (2015) Development of Urea and Thiourea Kynurenamine Derivatives: Synthesis, Molecular Modeling, and Biological Evaluation as Nitric Oxide Synthase Inhibitors. *ChemMedChem*, v.10, p.874-82.
- 34. CHEN**, L. W.; CHENG, M. J.; PENG, C. F.; SHENG, I. (2010). Secondary Metabolites and Antimycobacterial Activities from the Roots of *Ficus nervosa*. *Chemistry & Biodiversity*, v. 7, p. 1814-1821.
- 35. CHEN**, P.; SHI, M.; FENG, G.; LIU, J.; WANG, B.; SHI, X.; MA, L.; LIU, X.; YANG, Y.; DAI, W.; LIU, T.; HE, Y.; LI, J.; HAO, X.; ZHAO, G. (2012) A highly efficient ziehl-neelsen stain: identifying de novo intracellular Mycobacterium tuberculosis and improving detection of extracellular M. tuberculosis in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, p. 1166-1170.
- 36. CHENG**, F.; LI, W.; LIU, G.; TANG, Y. (2013). Na previsão do Silico ADMET: avanços recentes, desafios atuais e tendências futuras. *Atuais tópicos em química medicinal*, v.13, p.1273-1289.
- 37. CHOI**, H. S.; RAI, P. R.; CHU, H. W.; COOL, C.; CHAN, E. D. (2002) Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 166, p.178-86.
- 38. COLANGELI**, R., GUPTA, A., VINHAS, S. A., CHIPPADA VENKATA, U. D., KIM, S., GRADY, C. (2020). Mycobacterium tuberculosis progresses through two phases of latent infection in humans. *Nature Communication*, v. 11, p. 4870.
- 39. COOPER**, A. M. (2009) Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 393-422.
- 40. CORTI**, M. Severe Lung Disease due to Mycobacterium kansasii: Report of a Case and Review of the Literature. *Mycobact Dis*, v. 7, p. 2161-1068.
- 41. COUTINHO**, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. (2009) Flavonóides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v. 1, p. 241-256.

- 42. COWMAN, S.; WILSON, R.; LOEBINGER, M. R. (2012)** Opportunistic mycobacterial diseases. *Medicine*, v. 40, p. 346-348.
- 43. CRILLY, NATHAN P.; AYEH, SAMUEL K.; KARAKOUSIS, PETROS C. (2021)** The new frontier of host-directed therapies for *Mycobacterium avium* complex. *Frontiers in immunology*, v. 11, p. 3666.
- 44. DA SILVA, M. E. N. (2018)** General aspects of tuberculosis: a update on the etiologic agent and treatment. *RBAC*, v. 50, p. 228-32.
- 45. DALEY, C. L. (2020).** Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. *Clinical Infectious Diseases*, v. 71, p. e1-e36.
- 46. DASHTI, Y.; GRKOVIC, T. (2014)** Quinn RJ. Predicting natural product value, an exploration of anti-TB drug space. *Natural Product Reports*, v. 31, p. 990–998.
- 47. DE MELO, M. G. M.; MESQUITA, E. D. D.; OLIVEIRA, M. M.; SILVA-MONTEIRO, C. D.; SILVEIRA, A. K.; MALAQUIAS, T. S.; GRUPO DE ESTUDOS REDE-TB. (2019).** NET and alpha-1-antitrypsin imbalance in tuberculosis patients is related to hyperinflation and severe lung tissue damage. *Frontiers in Immunology*, 9, 3147.
- 48. DEPRez-POULAIN, R. F.; CHARTON, J.; LEROUX, V.; DEPRez, B. P. 2007.** Convenient synthesis of 4H-1,2,4-triazole-3-thiols using di-2-pyridylthionocarbonate. *Tetrahedron Letter*, v. 48, p. 8157-8162.
- 49. DESTEFANO, M. S.; SHOEN, C. M.; CYNAMON, M. H. (2018).** Therapy for *Mycobacterium kansasii* infection: beyond. *Frontiers in Microbiology*, v.1, p. 2271.
- 50. DHANYA, N.; PADMAVATHY, S. (2014)** Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 1-11.
- 51. DI GRANDI, M. J.; CURRAN, K. J.; FEIGELSON, G.; PRASHAD, A.; ROSS, A. A.; VISALLI, R.; FAIRHURST, J.; FELD, B.; BLOOM, J. D. 2004.** Thiourea inhibitors of herpesviruses. Part 3: Inhibitors of varicella zoster virus. *Bioorganic Medicine Chemistry Letter*, v. 1, p.4157-60.
- 52. DÍAZ ACOSTA, C. C.; RUSSOMANDO, G.; CANDIA, N.; RITA, C. C. O. V.; VASCONCELLOS, S. E. G.; DE BERRÊDO PINHO MOREIRA M.; DE ROMERO, N. J.; MORCILLO, N.; DE WAARD, J. H.; GOMES, H. M.; SUFFYS, P. N. 2019.** Exploring the "Latin American Mediterranean" family and the RD lineage in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Paraguay, Argentina and Venezuela. *BMC Microbiology*, v.13, p. 131.
- 53. DONALD, P. R.; WARREN, R. M. (2019)** Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 74, p. 103937.

- 54. DORHOI, A.; REECE, S.T.; KAUFMANN, S. H. (2011)** For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. *Immunological Reviews*, v. 240, p. 235-251.
- 55. DULBERGER, C. L.; RUBIN, E. J.; BOUTTE, C. C. (2020)** The mycobacterial cell envelope a moving target. *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, p. 47-59.
- 56. EKOUE-KOVI, K.; YEARICK, K.; IWANIUK, D. P.; NATARAJAN, J. K.; ALUMASA, J.; DE DIOS, A. C.; ROEPE, P. D.; WOLF, C. (2009).** Synthesis and antimalarial activity of new 4-amino-7-chloroquinolyl amides, sulfonamides, ureas and thioureas. *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, v. 1, p. 270-83.
- 57. ERŞEN, D.; ÜLGER, M.; MANGELINCKX, S.; GEMILI, M.; SAHIN, E.; NURAL, Y. (2017)** Synthesis and anti(myco)bacterial activity of novel 5,5-diphenylpyrrolidine N-aryloxythiourea derivatives and a functionalized hexahydro-1H-pyrrolo[1,2-c]imidazole. *Medicinal Chemistry Research*, v. 26, p. 2152–2160.
- 58. EWEIS, M.; ELKHOLY, S.S.; ELSABEE, M. Z. (2006).** Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 28, p.1-8.
- 59. GARLANDA, C.; DI LIBERTO, D.; ANNUNCIATA, V.; LA MANNA, M. P.; BURACCHI, C.; CACCAMO, N.; SALERNO, A.; DIELI, F.; MANTOVAN, A. (2007)** Damping excessive inflammation and tissue damage in *Mycobacterium tuberculosis* infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling. *The Journal of Immunology*, v. 179, p. 3119-3125.
- 60. GHORAB, M.M.; EL-GABY, M.S.A.; SOLIMAN, A.M.; ALSAID, M.S.; ABDEL-AZIZ, M.M.; ELAASSER, M.M. 2016.** Synthesis, docking study and biological evaluation of some new thiourea derivatives bearing benzene sulfonamide moiety. *Chemistry Central Journal*, v. 11, p. 42.
- 61. GOPALASWAMY, R.; SHANMUGAM, S.; MONDAL, R.; SUBBIAN, S. (2020)** Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections—a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of biomedical science*, v. 27, p. 1-17.
- 62. GREENSTEIN, R. J., SU, L., & BROWN, S. T. (2010).** The thioamides methimazole and thiourea inhibit growth of *M. avium* subspecies *paratuberculosis* in culture. *PLoS One*, v. 5, p. e11099.
- 63. GRIESS, J. P. (1864)** *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 154: 679. / A.C. Bratton, E.K.Marshall Jr., *Journal of Biology and Chemical*, v.128, p. 537.

- 64. GRIFFITH, DAVID E.** (2007) An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 175, p. 367-416.
- 65. GROBBELAAR, M.; LOUW, G. E.; SAMPSON, S. L.; VAN-HELDEN, P. D.;**
- 66. GROENEWALD, W.; BAIRD, M. S.; VERSCHOOR, J. A.; MINNIKIN, D. E.; CROFT, A. K.** (2013) Differential spontaneous folding of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Phys. Lipids*, v. 180, p. 15-22.
- 67. GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O.** (2011) Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Molecular Medicine*, v.17, p.293-307.
- 68. GRZEGORZEWICZ, A. E.; KORDULÁKOVÁ, J.; JONES, V.; BORN, S. E. M.; BELARDINELLI, J. M.; VAQUIÉ, A.; GUNDI, V. A. K. B.; MADACKI, J.; SLAMA, N.; LAVAL, F.; VAUBOURGEIX, J.; CREW, R. M.; GICQUEL, B.; DAFFÉ, M.; MORBIDONI, H. R.; BRENNAN, P. J.; QUÉMARD, A.; MCNEIL, M, R.; JACKSON, M.** (2012) A common mechanism of inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid biosynthetic pathway by isoxyl and thiacetazone, *Journal Biological Chemistry*, v.12, p. 38434–38441.
- 69. GUERRA-DE-BLAS, P. D. C.; TORRES-GONZÁLEZ, P.; BOBADILLA-DEL-VALLE, M.; SADA-OVALLE, I.; PONCE-DE-LEÓN-GARDUÑO, A.; SIFUENTES-OSORNIO, J.** (2018) Potential Effect of Statins on *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Journal of Immunology Research*, v.15, p. 7617023.
- 70. HERNANDEZ-PANDO, R.; SCHÖN, T.; OROZCO, E. H.; SERAFIN, J.; ESTRADA-GARCÍA, I.** (2001) Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Experimental and Toxicology Pathology*, v.4, p. 257-65.
- 71. HMAMA, Z.; PEÑA-DÍAZ, S.; JOSEPH, S.; AV-GAY, Y.** (2015) Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology Review*, v. 1, p. 220-32.
- 72. HOAGLAND, D. T.; LIU, J.; LEE, R. B.; LEE, R. E** (2016). New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Advanced drug delivery reviews*, v. 102, p. 55-72.
- 73. HOEFSLOOT, W.; VAN INGEN, J.; MAGIS-ESCURRA, C.; REIJERS, M. H.; VAN SOOLINGEN, D.; DEKHUIJZEN, R. P.; BOEREE, M. J.** (2013) Prevalence of nontuberculous mycobacteria in COPD patients with exacerbations. *Journal of Infection*, v. 6, p. 542-5.

- 74. HWANG, J. H.; MA, J. N.; PARK, J. H.; JUNG, H. W.; PARK, Y. K. (2019)** Anti-inflammatory and antioxidant effects of MOK, a polyherbal extract, on lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 macrophages. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 1, p. 26-36.
- 75. JAGIELSKI, T.; BORÓWKA, P.; BAKUŁA, Z.; LACH, J.; MARCINIAK, B.; BRZOSTEK, A. (2020)** Genomic insights into the *Mycobacterium kansasii* complex: an update. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 2918, 2020.
- 76. JAMAATI, H.; MORTAZ, E.; PAJOUHI, Z.; FOLKERTS, G.; MOVASSAGHI, M.; MOLOUDIZARGARI, M.; ADCOCK, I. M.; GARSSEN, J. (2017)** Nitric Oxide in the Pathogenesis and Treatment of Tuberculosis. *Frontiers Microbiology*, v. 8, p. 2008.
- 77. JAYACHANDRAN, R.; SUNDARAMURTHY, V.; COMBALUZIER, B.; MUELLER, P.; KORF, H.; HUYGEN, K.; MIYAZAKI, T.; ALBRECHT, I.; MASSNER, J.; PIETERS, J. (2007)** Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin dependent activation of calcineurin. *Cell*, v.130, 37-50.
- 78. JUHN, S. K., JUNG, M. K., HOFFMAN, M. D., DREW, B. R., PRECIADO, D. A., SAUSEN, N. J., ... HUANG, T. (2008).** The Role of Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Otitis Media and Sequelae. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*, v. 1, p. 117–138.
- 79. KARAKOUSIS, P. C.; BISHAI, W. R.; DORMAN, S. E. (2004)** *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cellular Microbiology*, v. 6, p. 105–116.
- 80. KARAKUS, S.; ROLLAS, S. (2002)** Synthesis and antituberculosis activity of new N-phenyl-N'- [4-(5-alkyl/arylamino-1,3,4-thiadiazol-2-yl)phenyl]thioureas. *Farmacology*. 57;577-581. [https://doi.10.1016/s0014-827x\(02\)01252-1](https://doi.10.1016/s0014-827x(02)01252-1).
- 81. KART, L.; BUYUKOGLAN, H.; TEKIN, I. O.; ALTIN, R.; SENTURK, Z.; GULMEZ, I.; DEMIR, R.; OZESMI, M. (2003)** Correlation of serum tumor necrosis factor-alpha, interleukin-4 and soluble interleukin-2 receptor levels with radiologic and clinical manifestations in active pulmonary tuberculosis. *Mediators Inflammation*, v. 12, p. 9-14.
- 82. KAUFMANN, S. H. E.; LANGE, C.; RAO, M.; BALAJI, K. N.; LOTZE, M.; SCHITO, M.; ZUMLA, A. I.; MAEURER, M. (2014)** Progress in tuberculosis vaccine development and host-directed therapies- a state of the art review. *Lancet Respir. Med*, v. 2, p. 301-320.
- 83. KECHE, A. P.; KAMBLE. V.M. (2019)** Synthesis and anti-inflammatory and antimicrobial activities of some novel 2-methylquinazolin-4(3H)-one derivatives bearing

urea, thiourea and sulphonamide functionalities. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 12, p. 1522-1531.

84. KHAN, E.; KHAN, S.; GUL, Z.; MUHAMMAD, M. (2020) Medicinal Importance, Coordination Chemistry with Selected Metals (Cu, Ag, Au) and Chemosensing of Thiourea Derivatives: Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v.3, p. 1-23.

85. KILINÇ, Gül et al. Host-directed therapy to combat mycobacterial infections. *Immunological Reviews*, v. 301, p. 62-83, 2021

86. KIM, Y. K.; OH, S. Y.; JEON, S. G.; PARK, H. W.; LEE, S. Y.; CHUN, E. Y.; BANG, B.; LEE, H. S.; OH, M. H.; KIM, Y. S.; KIM, J. H.; GHO, Y. S.; CHO, S. H.; MIN, KU.; KIM, Y. Y.; ZHU, Z. (2007) Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *Journal of Immunology*, v.178, p.5375 – 5382

87. KOLLOLI, A.; SUBBIAN, S. (2017) Host-directed therapeutic strategies for tuberculosis. *Frontiers in medicine*, v. 4, p. 171.

88. KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNIS, N.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES, K. (2011) The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*, v. 469, n. 7331, p. 483-490.

89. KRUG, S.; PARVEEN, S.; BISHAI, W. R. (2021) Host-Directed Therapies: Modulating Inflammation to Treat Tuberculosis. *Front Immunol*, v. 19, p. 12:660916.

90. KRUTZIK, S. R.; MODLIN, R. L. (2004) The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Seminars in immunology*, v. 16, p. 35-41.

91. KUBINYI, H. (2003) Drug research: myths, hype and reality. *Nat Rev Drug*, v. 2, p. 665-8.

92. KUMAR, A.; FARHANA, A.; GUIDRY, L.; SAINI, V.; HONDALUS, M.; STEYN, A. J. C. (2011) Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control? *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 13, p. 1-25.

93. KUMAR, G. N.; SURAPANENI, S. (2001) Role of drug metabolism in drug discovery and development. *Medicinal researchs review*, v. 21, p.397-411.

94. KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. (2012) Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*, v. 19, p. 792-798.

95. LANDES, M. B., RAJARAM, M. V., NGUYEN, H., & SCHLESINGER, L. S. (2015). Role for NOD2 in Mycobacterium tuberculosis-induced iNOS expression and NO production in human macrophages. *Journal of leukocyte biology*, v.6, p. 111-1119.

96. LASUNSKAIA, E.; RIBEIRO, S. C.; MANICHEVA, O.; GOMES, L. L.; SUFFYS, P. N.; MOKROUSOV, I.; NARVSKAYA, O. (2010). Emerging multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype circulating in Russia

express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes and Infection*, v. 12, p. 467-475.

97. LAZZARINI, L. C. O.; HUARD, R. C.; BOECHAT, N. L.; GOMES, H. M.; OELEMANN, M. C.; KUREPINA, N.; HO, J. L. (2007) Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical microbiology*, v. 45, p. 3891-3902,

98. LECHARTIER, B.; RYBNIKER, J.; ZUMLA, A.; COLE, S. T. (2014) Tuberculosis drug discovery in the post post-genomic era. *EMBO Molecular Medicine*, v. 6, p. 158-168.

99. LIM, Yun-Ji et al. *Mycobacterium kansasii*-induced death of murine macrophages involves endoplasmic reticulum stress responses mediated by reactive oxygen species generation or calpain activation. *Apoptosis*, v. 18, p. 150-159, 2013

100. LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 46, p. 3–26.

101. LIU, C. H.; LIU, H.; GE, Baoxue. (2017) Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cellular & molecular immunology*, v. 14, p. 963- 975.

102. LOGSDON, M. M.; ALDRIDGE, B. B. (2018). Stable regulation of cell cycle events in *Mycobacteria*: Insights from inherently heterogeneous bacterial populations. *Frontiers Microbiology*, v. 9, p.541.

103. LOPEZ, B.; AGUILAR, D.; OROZCO, H.; BURGER, M.; ESPITIA, C.; RITACCO, V.; BARRERA, I; KREMER, K.; HERNANDEZ-PANDO, R.; HUYGEN, K.; VAN SOOLINGEN, E. D. (2003) A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 133, p. 30-37.

104. LOURENÇO, A. L.; SAITO, M. S.; DORNELES, L. E; G.; VIANA, G. M.; SATHLER, P. C.; AGUIAR, L. C. S.; PÁDULA, M.; DOMINGOS, T. F.; FRAGA, A. G.; RODRIGUES, C. R.; SOUSA, V. P.; CASTRO, H. C.; CABRAL, L. (2015) Synthesis and Antiplatelet Activity of Antithrombotic Thiourea Compounds: Biological and Structure-Activity Relationship Studies. *Molecules*, v. 20, p. 7174–7200.

105. LYADOVA, I. V.; TSIGANOV, E. N.; KAPINA, M. A.; WINSLOW, G. M. (2010) In Mice, Tuberculosis Progression Is Associated with Intensive Inflammatory Response and the Accumulation of Gr-1dim Cells in the Lungs. *Plos one*, v. 5, p. 1-16.

- 106. LYADOVA, I.V.; PANTELEEV, A. V. (2015) Th1 and Th2 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology and Biomarkers. Mediators of Inflammation, v. 2015, p. 1-13.**
- 107. MABHULA, A.; SINGH, E. V. (2019). Resistência às drogas em Mycobacterium tuberculosis: onde estamos. Med. Chem. Commun, v.10, p.1342–1360.**
- 108. MARRAPU, V. K.; CHATURVEDI, V.; SINGH, S.; SINGH, S.; SINHA, S.; BHANDARI, K. (2011) Novel aryloxy azolyl chalcones with potent activity against Mycobacterium tuberculosis H37Rv. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 46, p. 4302-4310.**
- 109. MARZO, E.; VILAPLANA, C.; TAPIA, G.; DIAZ, J.; GARCIA, V.; CARDONA, P-J (2014) Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. Tuberculosis, v. 94, p. 55-64.**
- 110. MATVEYCHUK, A.; FUKS, L.; PRIESS, R.; HAHIM, I.; SHITRIT, D. (2012) CLINICAL AND RADIOLOGICAL FEATURES OF MYCOBACTERIUM KANSASII AND OTHER NTM INFECTIONS. RESPIRATORY MEDICINE, v. 106, p. 1472-1477.**
- 111. MELLO, K. G. C.; MELLO, F. C. Q.; BORGA L.; ROLLA, V.; DUARTE, R. S.; SAMPAIO, E. P.; HOLLAND, S. M.; PREVOTS, D. R.; DALCOLMO, M. P. (2013) Clinical and Therapeutic Features of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Rio de Janeiro, Brazil. Emerging Infectious Disease journal, v. 19, p. 393-399.**
- 112. MINISTÉRIO DA SAÚDE, (2017) Indicadores prioritários para o monitoramento do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública no Brasil.**
- 113. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico especial da tuberculose. 2021**
- 114. MISHRA, B. B.; LOVEWELL, R. R.; OLIVE, A. J.; ZHANG, G.; WANG, W.; EUGENIN, E.; SMITH, C. M.; PHUAH, J. Y.; LONG, J. E.; DUBUKE, M. L.; PALACE, S. G.; GOGUEN, J. D.; BAKER, R. E.; NAMBI, S.; MISHRA, R.; BOOTY, M. G.; BAER, C. E.; SHAFFER, S. A.; DARTOIS, V.; MCCORMICK, B. A.; CHEN, X.; SASSETTI, C. M. (2017) Nitric oxide prevents a pathogen-permissive granulocytic inflammation during tuberculosis. Nature Microbiology, v. 2, p. 17072.**
- 115. MITTAL, M.; SIDDIQUI, M. R.; TRAN, K.; REDDY, S. P.; MALIK, A. B. (2014) Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. Antioxidants & redox signaling, v. 20, p. 1126-1167.**
- 116. MODI, S.; LI, J.; MALCOMBER, S.; MOORE, C.; SCOTT, A.; WHITE, A.; CARMICHAEL, P. (2012) Integrated in silico approaches for the prediction of Ames test mutagenicity. Journal of Computer-Aided Molecular Design, v. 26, p.1017-33.**

- 117. MOLLACE**, V.; MUSCOLI, C.; MASINI, E.; CUZZOCREA, S.; SALVEMINI, D. (2005) Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacological Reviews*, v. 57, p. 217-252.
- 118. MOREIRA-TEIXEIRA**, L.; STIMPSON, P. J.; STAVROPOULOS, E.; HADEBE, S.; CHAKRAVARTY, P.; IOANNOU, M.; O'GARRA, A. (2020). Type I IFN exacerbates disease in tuberculosis-susceptible mice by inducing neutrophil-mediated lung inflammation and NETosis. *Nature communications*, v. 11, p. 1-18.
- 119. MORIMOTO**, K.; IWAI, K.; UCHIMURA, K.; OKUMURA, M.; YOSHIYAMA, T.; YOSHIMORI, K.; OGATA, H.; KURASHIMA, A.; GEMMA, A.; KUDOH, S. (2014) A steady increase in nontuberculous mycobacteriosis mortality and estimated prevalence in Japan. *Annals of the American Thoracic Society*, v. 11, p. 1-8.
- 120. MOSMANN**, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunology Methods*, v. 65, p. 55-63.
- 121. MOULE**, M. G.; CIRILLO, J.; (2020) Mycobacterium tuberculosis Dissemination Plays a Critical Role in Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 2, p. 11472691.
- 122. MURRAY**, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFAÜER, M. A. (2010) Mycobacterium. *Microbiologia Médica*, v. 6, p. 297-310.
- 123. MUSSI**, V. O.; SIMÃO, T. L.; ALMEIDA, F. M.; MACHADO, E.; DE CARVALHO, L. D.; CALIXTO, S. D.; LASUNSKAIA, E. B (2021) Murine Model of Mycobacterium kansasii Infection Reproducing Necrotic Lung Pathology Reveals Considerable Heterogeneity in Virulence of Clinical Isolates. *Frontiers in microbiology*, v. 12.
- 124. NAHID**, P.; MASE, S. R.; MIGLIORI, G. B.; SOTGIU, G.; BOTHAMLEY, G. H.; BROZEK, J. L.; SEAWORTH, B. (2019) Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. An Official ATS/CDC/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 200, p. e93-e142.
- 125. NAIR**, P. C.; SOBHIA, M. E. (2008) Quantitative structure activity relationship studies on thiourea analogues as influenza virus neuraminidase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, p. 293-299.
- 126. NATARAJ**, V.; PANG, P. C.; HASLAM, S. M.; VEERAPEN, N.; MINNIKIN, D. E.; DELL, A. (2015) MKN 27435 is required for the biosynthesis of higher subclasses of lipooligosaccharides in Mycobacterium kansasii. *PloS one*, v. 10, p. e0122804, 2015.

- 127. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. (2007)** Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461-477.
- 128. NGUTA, J. M.; APPIAH-OPONG, R.; NYARKO, A. K.; YEBOAH-MANU, D.; ADDO, P. G. (2015)** Current perspectives in drug Discovery against tuberculosis from natural products. *International Journal Mycobacteriology*, v. 4, p. 165-83.
- 129. NICHOLSON, S.; BONECINI-ALMEIDA, G.; LAPA E SILVA, J. R.; NATHAN, C.; XIE, Q. W.; MUMFORD, R.; WEIDNER, J. R.; CALAYCAY, J.; GENG, J.; BOECHAT, N.; LINHARES, C.; ROM, W.; HO, J. L. (1996)** Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *Journal Experimental Medicine*, v. 183, p. 2293-302.
- 130. NICOLETTI, R.; DE FILIPPIS, A; BUOMMINO, E. (2013)** Antagonistic aptitude and antiproliferative properties on tumor cells of fungal endophytes from the Astroni Nature Reserve, Italy. *African Journal of Microbiology Research*, v. 7, p. 4073-4083.
- 131. NISA, H.; KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, A. (2015)** Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microbial Pathogenesis*, v. 8, p. 50-59.
- 132. NUNES-ALVES, C.; BOOTY, M. G.; CARPENTER, S. M.; JAYARAMAN, P.; ROTHCHILD, A. C.; BEHAR, S. M. (2014)** In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nat. Rev. Microbiol*, v. 12, p. 289-299.
- 133. OBREGÓN-HENAO, A.; HENAO-TAMAYO, M.; ORME, I. M.; & ORDWAY, D. J. (2013).** Gr1intCD11b+ myeloid-derived suppressor cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS one*, v. 8, p. e80669.
- 134. O'GARRA, A.; REDFORD, P. S.; MCNAB, F. W.; BLOOM, C. I.; WILKINSON, R. J.; BERRY, M. P. (2013)** The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, v.31, p.475-527.
- 135. ÖLMEZ, N. A.; WASEER, F. (2020)** New Potential Biologically Active Compounds: Synthesis and Characterization of Urea and Thiourea Derivatives Bearing 1, 2, 4-oxadiazole Ring. *Current organic synthesis*, v. 17, p. 525-534.
- 136. ORGEUR, M.; BROSCH, R. (2017)** Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Current Opinion in Microbiology*, v. 41, p. 68–75.
- 137. ORME, I. (2011)** Development of new vaccines and drugs for TB: limitations and potential strategic errors. *Future Microbiology*, v. 6, p. 161-177.
- 138. ORME, I. (2014)** A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. *Nature Immunology*, v. 94, p. 8-14.
- 139. ORME, I. M.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. (2015)** The balance between

protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nature Immunology*, v. 16, p. 57-63.

140. OTTENHOFF, T. H. M.; KAUFMANN, S. H. E. (2012) Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *Plos Pathogens*, v. 8, p. 1-12.

141. PALANISAMY, G. S.; KIRK, N. M.; ACKART, D. F.; SHANLEY, C. A.; ORME, I. M.; BASARABA, R. J. (2011) Evidence for oxidative stress and defective antioxidant response in guinea pigs with tuberculosis. *PLoS One*, v. 6, p. e26254.

142. PARK, J. S.; TAMAYO, M. H.; GONZALEZ-JUARRERO, M.; ORME, I. M.; ORDWAY, D. J. (2006) Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *J. Leukoc. Biology*, v. 79, p. 80-86.

143. PEZZELLA, A. T. (2019) History of Pulmonary Tuberculosis. *Thoracic Surgery Clinical*, v. 29, p.1-17.

144. PHETSUKSIRI, B.; JACKSON, M.; SCHERMAN, H.; (2003). Unique mechanism of action of the thiourea drug isoxyl on *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 52, p. 53123-53130.

145. PICCARO, G.; POCE, G.; BIAVA, M.; GIANNONI, F.; FATTORINI, L. (2015) Activity of lipophilic and hydrophilic drugs against dormant and replicating *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Antibiotics*, v. 68, p. 711-714.

146. PINGAEW, R.; SINTHUPOOM, N.; MANDI. P. (2017) Synthesis, biological evaluation and in silico study of bis-thiourea derivatives as anticancer, antimalarial and antimicrobial agents. *Medice Chemistry Research*, v. 26, p. 3136-3148.

147. PRASAD, K.; SINGH, M. B. (2008) Corticosteroids for managing tuberculous meningitis. *Cochrane Database Systematic Reviews*, v. 1, p. 1-11.

148. PREVOTS, D. R.; SHAW, P. A.; STRICKLAND, D.; JACKSON, L. A.; RAEBEL, M. A.; BLOSKY, M. A.; DE OCA, R. M.; SHEA, Y. R.; SEITZ, A. E.; HOLLAND, S. M.; OLIVIER, K. N. (2010) Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated health care delivery systems. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 182, p. 970-976.

149. QUALLS, J. E.; MURRAY, P. J. (2016) Immunometabolism with in the tuberculosis granuloma: amino acids, hypoxia, and cellular respiration. *Semin Immunopathology*, v.2, p. 139-52.

150. RACHOW, A.; IVANOVA, O.; WALLIS, R.; CHARALAMBOUS, S.; JANI, I.; BHATT, N.; CHURCHYARD, G. (2019). TB sequel: incidence, pathogenesis and risk factors of long-term medical and social sequelae of pulmonary TB—a study

protocol. BMC pulmonary medicine, v. 19, p. 1-9.

151. RAFFETSEDER, J. (2016). Interplay of human macrophages and Mycobacterium tuberculosis phenotypes (Doctoral dissertation, Linköping University Electronic Press).

152. RAJAMANIKYAM, M.; VADLAPUDI, V.; AMANCHY, R.; UPADHYAYULA, S. M. (2017). ENDOPHYTIC FUNGI AS NOVEL RESOURCES OF NATURAL THERAPEUTICS. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY, v. 60, p.1678-4324

153. RALPH, A. P.; KENANGALEM, E.; WARAMORI, G.; PONTORORING, G. J.; TJITRA, E.; MAGUIRE, G. P.; ANSTEY, N. M. (2013). High morbidity during treatment and residual pulmonary disability in pulmonary tuberculosis: under-recognised phenomena. PloS one, v.8, p. e80302.

154. RAMAPPA, V.; AITHAL, G. P. (2013) Hepatotoxicity related to anti-tuberculosis drugs: mechanisms and management. Journal of clinical and experimental hepatology, v. 3, p.37-49.

155. RATNATUNGA, C. N.; LUTZKY, V. P.; KUPZ, A.; DOOLAN, D. L.; REID, D. W.; FIELD, M. (2020) The rise of non-tuberculosis mycobacterial lung disease. Frontiers in Immunology, v. 11, p. 303.

156. RIBEIRO, S. C. M.; GOMES, L. L.; AMARAL, E. P.; ANDRADE, M. R. M.; ALMEIDA, F. M.; REZENDE, A. L.; LANES, V. R.; CARVALHO, E. C. Q.; SUFFYS, P. N.; MOKROUSOV, I.; LASUNSKAIA, E. B. (2014) Mycobacterium tuberculosis strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. Journal of Clinical Microbiology, v. 52, p. 2615-2624.

157. RICKETTS, W. M.; O'SHAUGHNESSY, T. C.; VANINGEN, J. (2014) Human-to-human transmission of Mycobacterium kansasii or victims of a shared source? European Respiratory Journal, v. 44, p. 1085-1087.

158. ROSTOM, S. A. F. (2006) Synthesis and in vitro antitumor evaluation of some indeno1,2- pyrazol(in)es substituted with sulfonamide, sulfonylurea(-thiourea) pharmacophores, and some derived thiazole ring systems. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 14, p. 6475-6485.

159. RYU, Y. J.; KOH, W. J.; DALEY, C. L. (2016) Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease: Clinicians' Perspectives. Tuberculosis and Respiratory Diseases, v. 79, p. 74-84.

160. SAEED, A., ABBAS, N., & FLÖRKE, U. (2007). Synthesis and antibacterial activity of some novel 2-arylimino-3-aryl-thiazolidin-4-ones. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.18, p. 559-565.

- 161. SCHROEDER, D. C.** (1955). Thioureas. *Chemical Reviews*, 55(1), 181-228.
- 162. SECRETARIA DE ESTADO DE SAUDE DO RIO DE JANEIRO.** Boletim epidemiológico tuberculose nº 01/2021. Rio de Janeiro, 2021.
- 163. SEIJGER, C.; HOEFSLOOT, W.; BERGSMAN-DE GUCHTENEIRE, I.; TE BRAKE, L.; VAN INGEN, J.; KUIPERS, S.; MAGIS-ESCURRA, C.** (2019). High-dose rifampicin in tuberculosis: Experiences from a Dutch tuberculosis centre. *PLoS One*, v. 14, p. e0213718.
- 164. SHAMEEM, M.; FATIMA, N.; KHAN, H. M.** (2015) Association of TNF- α serum levels with response to antitubercular treatment in MDR tuberculosis patients. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, v.8, p.258.
- 165. SHARMA, S.; SHARMA, M.; ROY, S.; KUMAR, P.; BOSE, M.** (2004) Mycobacterium tuberculosis induces high production of nitric oxide in coordination with production of tumour necrosis factor-alpha in patients with fresh active tuberculosis but not in MDR tuberculosis. *Immunology and Cell Biology*, v. 82, p. 377-82.
- 166. SHIAU, M. Y.; CHIOU, H. L.; LEE, Y. L.; KUO, T. M.; CHANG, Y. H.** (2001) Establishment of a consistent L929 bioassay for TNF- α quantitation to evaluate the effect of lipopolysaccharide, phytoestrogens and cytodifferentiation agents on cytotoxicity of TNF- α secreted by adherent human mononuclear cells. *Mediator of Inflammation*, v. 10, p. 199-208.
- 167. SHOAB, M.; AYAZ, M.; TAHIR, M. N.; SHAH, S. W. A.** (2016) Synthesis, Characterization, Crystal Structures, Analgesic and Antioxidant Activities of Thiourea Derivatives. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, v. 38, p.3.
- 168. STEPPELER, F.; IWAN, D.; WOJACZYNSKA, E.; WOJACZYNSKI, J.** (2020) Chiral Thioureas – Preparation and Significance in Asymmetric Synthesis and Medicinal Chemistry. *Molecules*, v. 25, p. 401-456.
- 169. STROBEL, G. A.** (2003) Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, v. 5, p. 535-544.
- 170. STRONG, EMILY J.; LEE, SUNHEE.** (2021) Targeting Autophagy as a Strategy for Developing New Vaccines and Host-Directed Therapeutics Against Mycobacteria. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 3536.
- 171. SUBBIAN, S.; TSENOVA, L.; O'BRIEN, P.; YANG, G.; KOO, M-S.; PEIXOTO, B.; FALLOWS, D.; ZELDIS, J. B.; MULLER, G.; KAPLAN, G.** (2011) Phosphodiesterase-4 inhibition combined with isoniazid treatment of rabbits with pulmonary tuberculosis reduces macrophage activation and lung pathology. *The American Journal of Pathology*, v. 179, p. 289-301.

- 172. SUDHAMANI, H.; THASLIM, S.K.; BASHA, S.; ADAM, S.; MADHUSUDHANA, A.; USHA, R.; NAGA RAJU, C. (2017).** Synthesis and evaluation of urea and thiourea derivatives of lopinavir intermediate as potent antimicrobial, antioxidant agents and molecular docking studies against Staphopain. *Res Chem Intermed*, v. 43, p. 103-120.
- 173. SUDZHAEV, A. R.; RZAEVA, I. A.; NADZHAFOVA, R. A.; SAFAROV, Y. S.; ALLAKHVERDIEV, M. A. (2011)** Antioxidant properties of some thiourea derivatives. *Russian Journal of Applied Chemistry*, v. 84, p.1394-1397.
- 174. TAHA, M.; ISMAIL, N.H.; JAMIL, W. (2015)** Synthesis and evaluation of unsymmetrical heterocyclic thioureas as potent β -glucuronidase inhibitors. *Med Chem Res*, v. 24, p. 3166-3173.
- 175. TAKAHASHI, H.; NISHINA, A.; FUKUMOTO, R.; KIMURA, H.; KOKETSU, M.; ISHIHARA, H. (2005)** Seleno ureas and thioureas are effective superoxide radical scavengers in vitro. *Life Sciences*, v. 76, p. 2185-2192.
- 176. TAN, R. X.; ZOU, W. X. (2001)** Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, v.18, p. 448-459.
- 177. TATAR, E.; KARAKUŞ, S.; KÜÇÜKGÜZEL, Ş. G.; OKULLU, S. Ö.; ÜNÜBOL, N.; KOCAGÖZ, T.; DE CLERC, E.; ANDREI, G.; SNOECK, R.; PANNECOUQUE, C.; KALAYCI, S.; SAHIN, F.; SRIRAM, D.; YOGEE SWARI, P.; KUÇUKGUZEL, I. (2016)** Design, synthesis, and molecular docking studies of a conjugated thiadiazole–thiourea scaffold as antituberculosis agents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 39, p. 502-515.
- 178. TEELING, J. L., CUNNINGHAM, C., NEWMAN, T. A., & PERRY, V. H. (2010).** The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications for a role of COX-1. *Brain, behavior, and immunity*, v. 24, p. 409-419.
- 179. THAISS, C. A.; KAUFMANN, S. H. (2010)** Toward novel vaccines against tuberculosis: current hopes and obstacles. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 83, p. 209-215.
- 180. TORRADO, E.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. (2010)** Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends in Immunology*, v. 32, p. 66-72.
- 181. TORTOLI, E. (2006)** The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 48, p. 159-178.
- 182. TRAM, T. T.; NHUNG, H. N.; VIJAY, S.; HAI, H. T.; THU, D. D.; HA, V. T.; THUONG, N. T. (2018).** Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates is

associated with sputum pre-treatment bacterial load, lineage, survival in macrophages, and cytokine response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v.1, p. 417.

183. TWEED, C. D.; CROOK, A. M. (2018) Amukoye EI, Dawson R, Diacon AH, Hanekom M, Gillespie SH. Toxicity associated with tuberculosis chemotherapy in the REMox TB study. *BMC infectious diseases*. V. 18, p. 1-10.

184. VALLANCE, P.; LEIPER, J. (2002) Blocking no synthesis: How, where and why? *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 1, p. 939-950.

185. VAN INGEN, J.; KUIJPER, E. J. (2014). Drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Future microbiology*, v. 9, p.1095-1110.

186. VENKATACHALAM, T. K.; QAZI, S.; SAMUEL, P.; UCKUN , F. M. (2003) Inhibition of mast cell leukotriene release by thiourea derivative. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.13, p.485-488.

187. VENTURA, T. L. B. S. (2015a) Estudo de chalconas substituídas com potencial ação anti-inflamatória e antimicobacteriana como nova estratégia para o tratamento da tuberculose. Tese de Doutorado.

188. VENTURA, T. L. B.; CALIXTO, S. D.; ABRAHIM-VIEIRA, B. A.; DE SOUZA, A. M. T.; MELLO, M. V. P.; RODRIGUES, C. R.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A.; LEAL, I. C. R.; LASUNSKAIA, E. B.; MUZITANO, M. F. (2015b) Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of substituted chalcones focusing on anti-tuberculosis dual treatment approach. *Molecules*, v. 20, p. 8072-8093.

189. VIANA, G. M.; SOARES, D. C.; SANTANA, M. V.; AMARAL, L. H.; MEIRELES, P. W.; NUNES, R, P.; SILVA, L. C. R. P.; AGUIAR, L. C. S.; RODRIGUES, C. R.; SOUSA, V. P.; CASTRO, H. C.; ABREU, P. A.; SATHLER, P. C.; SARAIVA, E. M.; CABRAL, L. M. (2017) Anti-leishmanial Thioureas: Synthesis, Biological Activity and in Silico Evaluations of New Promising Derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 65, p. 911-919.

190. WAGH, G.D.; PATHARE, S.P.; AKAMANCHI, K.G. (2018) Sulfated-Tungstate-Catalyzed Synthesis of Ureas/Thioureas via Transamidation and Synthesis of Forchloro fenuron. *Chemistry Select.*, v. 3, p. 7049-7053

191. WALLIS, R. S.; KIM, P.; COLE, S.; HANNA, D.; ANDRADE, B. B.; MAEURER, M.; ZUMLA, A. (2014). Tuberculosis biomarkers discovery: developments, needs, and challenges. *The Lancet infectious diseases*, v. 13, p. 362-372.

192. WANG, J.; HUANG, Y.; FANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; ZHAO, Y.; SU, W. (2002) Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology & Medical*

Microbiology, v. 34, p. 51-57.

193. WANG, K.; LEI, J.; WEI, J.; YAO, N. (2012) Bioactive natural compounds from the plant endophytic fungi *Pestalotiopsis* spp. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 1382-1393.

194. WEISS, G.; SCHAIBLE, U. E. (2015). Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunological reviews*, v. 264, p. 182-203.

195. WIELAND, C. W.; FLORQUIN, S.; PATER, J. M.; WEIJER, S.; VAN DER POLL, T (2006) Interleukin-1 contributes to an effective clearance of *Mycobacterium kansasii* from the respiratory tract. *Microbes and infection*, v. 8, p. 2409-2413, 2006.

196. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. (2019) Relatório Global de Tuberculose 2017. Acessado em 10 Janeiro de 2021. Disponível a partir de <http://www.who.int/Tb/publications/global_report/en/>.

197. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. (2021) Relatório Global de Tuberculose 2017. Acessado em 10 Janeiro de 2021. Disponível a partir de <http://www.who.int/Tb/publications/global_report/en/>.

198. YAO, X. S.; EBIZUKA, Y.; NOGUCHI, H.; KIUCHI, F.; SHIBUYA, M.; IITAKA, Y.; SETO, H.; SANKAWA, U. (1991). Biologically active constituents of *Arnebia euchroma*: Structure of Arnbiol, na Ansa-Type Monoterpenylbenzenoid with inhibitory activity on Prostaglandin biosynthesis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. v. 39, p. 2956-2961.

199. YOUNG, C.; WALZL, G.; DU PLESSIS, N. (2020). Therapeutic host-directed strategies to improve outcome in tuberculosis. *Mucosal immunology*, v. 13, p. 190-204.

200. ZHAI, Z.; SOLCO, A.; WUD, L.; WURTELED, E. S.; KOHUTE, M. L.; MURPHY, P. A.; CUNNICKA, J. E. (2009) Echinacea increases arginase activity and has anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophage cells, indicative of alternative macrophage activation. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 122, p. 76-85.

201. ZHANG, M.; GONG, J.; YANG, Z.; SAMTEN, B.; CAVE, M. D.; BARNES, P. F. (1999) Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 179, p. 1213–1217.

202. ZHONG, Z.; XING, R.; LIU, S.; WANG, L.; CAI, S.; LI, P. (2008) Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro, *Carbohydrate Research*, v. 343, p. 566 –570.

203. ZUMLA, A. I.; GILLESPIE, S. H.; HOELSCHER, M.; PHILIPS, P. P. J.; COLE, S. T.; ABUBAKAR, I.; MCHUGH, T. D.; SCHITO, M.; MAEURER, M.; NUNN, A. J. (2014) New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and

future prospects. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 14, p. 327-340.

204. ZUMLA, A.; RAO, M.; PARIDA, S. K.; KESHAVJEE, S.; CASSELL, G.; WALLIS, R.; AXELSSON-ROBERTSSON, R.; DOHERTY, M.; ANDERSSON, J.; MAEURER, M. (2015) Inflammation and tuberculosis: host-directed therapies. *Journal of Internal Medicine*, v. 277, p. 373-387.

Anexo 1:

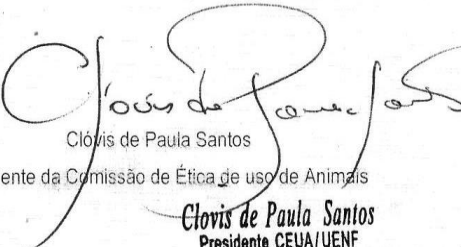


Reitoria
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 350, intitulado "Estudo de virulência das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e novas abordagens terapêuticas para o tratamento adjuvante da tuberculose pulmonar no modelo murino" sob a responsabilidade da Dra. Elena Lassounskaia, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11.794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 28/03/2017. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 28/03/2021.

Campos dos Goytacazes, 28 de março de 2017.


Clovis de Paula Santos
Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais
Clovis de Paula Santos
Presidente CEUA/UENF



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of thiourea derivatives focusing on treatment approaches for severe pulmonary tuberculosis

Sanderson Dias Calixto^{a,b}, Thatiana Lopes Biá Ventura Simão^{a,b},
 Marcos Vinicius Palmeira-Mello^{c,d}, Gil Mendes Viana^e,
 Paloma Wetler Meireles Carreiros Assumpção^e, Marianne Grilo Rezende^e,
 Camila Couto do Espirito Santo^b, Vinicius de Oliveira Mussi^b, Carlos Rangel Rodrigues^c,
 Elena Lasunskaja^b, Alessandra Mendonça Teles de Souza^c, Lúcio Mendes Cabral^{e,*},
 Michelle Frazão Muzitano^{a,*}

^a Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Pólo Novo Cavaleiro, Laboratório de Produtos Bioativos, Curso de Farmácia, Macaé, RJ, Brazil

^b Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biotecnologia e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

^c Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Modelagem Molecular & QSAR (ModMolQSAR), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Valonguinho, Niterói, RJ, Brazil

^e Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Tuberculosis
 Mycobacterium
 Inflammation
 Thiourea
 Structure-activity relationship

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains a serious public health problem and one of the main concern is the emergence of multidrug-resistant and extensively resistant TB. Hyper-reactive patients develop inflammatory necrotic lung lesions that aggravate the pathology and facilitate transmission of mycobacteria. Treatment of severe TB is a major clinical challenge that has few effective solutions and patients face a poor prognosis, years of treatment and different adverse drug reactions. In this work, fifteen novel and thirty-one unusual thiourea derivatives were synthesized and evaluated *in vitro* for their antimycobacterial and anti-inflammatory potential and, *in silico* for ADMET parameters and for structure-activity relationship (SAR). Thioureas derivatives **10**, **15**, **16**, **28** and **29** that had shown low cytotoxicity and high activities were selected for further investigation, after SAR study. These five thioureas derivatives inhibited Mtb H37Rv growth in bacterial culture and in infected macrophages, highlighting thiourea derivative **28** (MIC₅₀ 2.0 ± 1.1 and 2.3 ± 1.1 μM, respectively). Moreover, these compounds were active against the hypervirulent clinical Mtb strain M299, in bacterial culture, especially **16**, **28** and **29**, and in extracellular clumps, highlighting **29**, with MIC₅₀ 5.6 ± 1.2 μM. Regarding inflammation, they inhibited NO through the suppression of iNOS expression, and also inhibited the production of TNF-α and IL-1β. *In silico* studies were carried out suggesting that these five compounds could be administered by oral route and have low toxicological effects when compared to rifampicin. In conclusion, our data show that, at least, thiourea derivatives **16**, **28** and **29** are promising antimycobacterial and anti-inflammatory agents, and candidates for

Abbreviations: TB, Tuberculosis; Mtb, Mycobacterium tuberculosis; MDR, Multidrug-resistant; ADMET, Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicology properties; SAR, Structure-activity relationship; NO, Nitric oxide; iNOS, inducible nitric oxide synthase; TNF-α, Tumor necrosis factor-alpha; IL-1β, interleukin-1β; HDT, Host-directed therapy; NSAID, Non-steroidal anti-inflammatory drugs; TB-IRIS, Tuberculosis immune reconstitution inflammatory syndrome; Ph, Phenyl; Bu, Butyl; Cy, Cyanate; iPr, Isopropyl; Et, Ethyl; Br, Bromo; Cl, Cloro CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute; IC₅₀, Inhibitory concentration 50%; MIC₅₀, Minimum inhibitory concentration 50%; CC₅₀, Cytotoxic concentration 50%; SI, Selectivity index; HOMO, Highest Occupied Molecular Orbital; LUMO, Lowest Unoccupied Molecular Orbital; MEPs, Molecular electrostatic potential maps; SNP, Sodium nitroprusside; C-, Negative control; C+, Positive control; CFU, colony-forming unit; p.i, Post infection; ALP, Alkaline Phosphatase; AST, Serum Aspartate Transaminase; ALT, Serum Alanine Transaminase; GGT, Gama-Glutamyltransferase; LDH, Lactate Dehydrogenase; MW, Molecular weight; LogP, Lipophilicity; HBD, Number of hydrogen bond donor; HBA, Number of hydrogen bond acceptor; HEPAT, Hepatotoxicity; MUTAGEN, Mutagenicity; REPR, Reproductive toxicity.

* Corresponding authors at: Laboratório de Produtos Bioativos, Farmácia, Campus Macaé, Universidade Federal do Rio de Janeiro, R. Aluísio da Silva Gomes, 50, CEP: 27930-560, Macaé, RJ, Brazil (M.F. Muzitano). Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), CEP 21941-902, Rio de Janeiro, Brazil (L.M. Cabral).

E-mail addresses: lmcabral@pharma.ufrrj.br (L.M. Cabral), mfmuzitano@macae.ufrrj.br (M.F. Muzitano).

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116506>

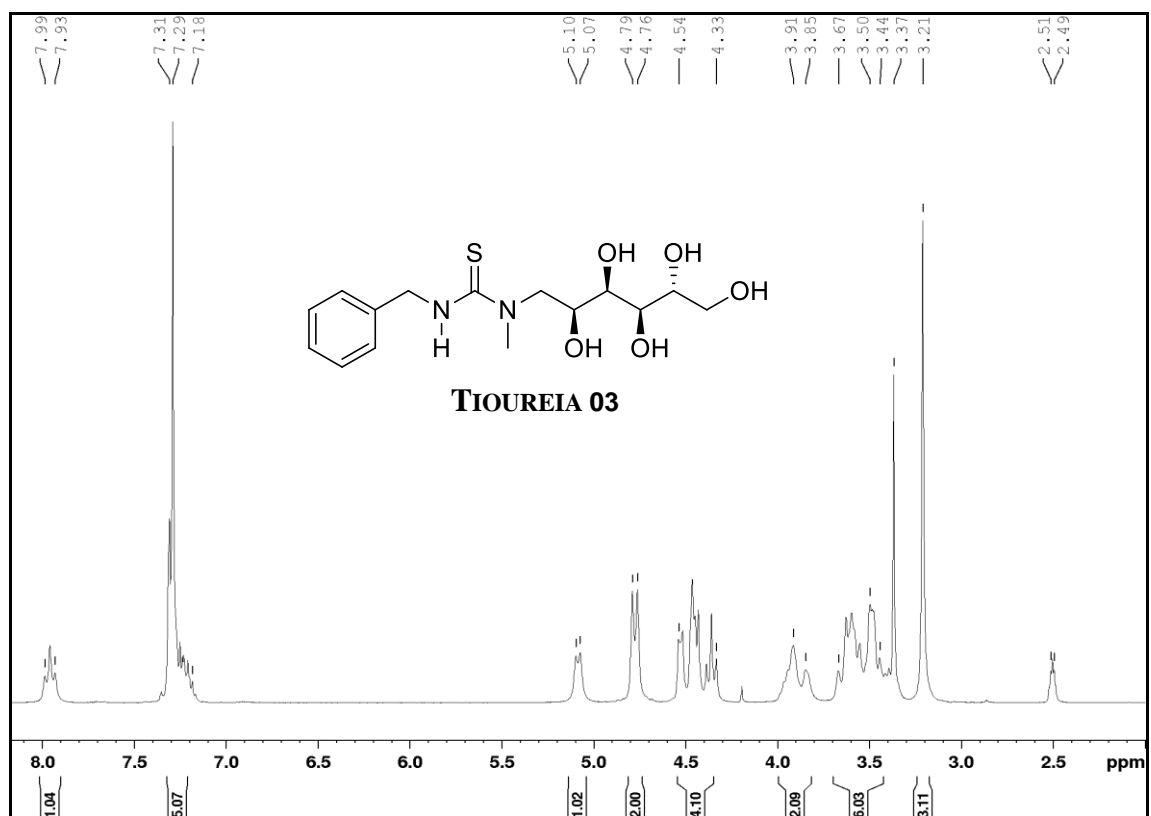
Received 18 August 2021; Received in revised form 1 November 2021; Accepted 2 November 2021

Available online 11 November 2021

0968-0896/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Anexo 3:

1. ^1H E ^{13}C NMR ESPECTROS PARA OS COMPOSTOS 3, 7-10, 13-16, 22, 23, 30-46.



(A)

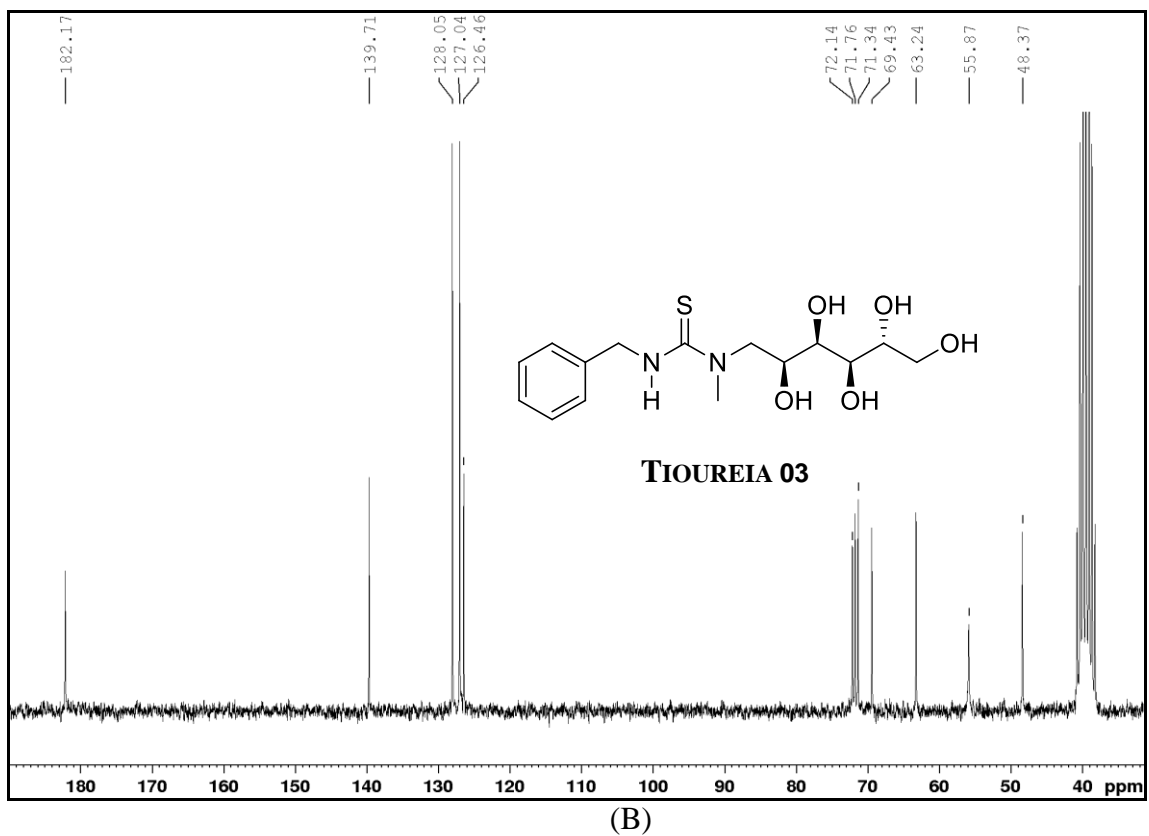
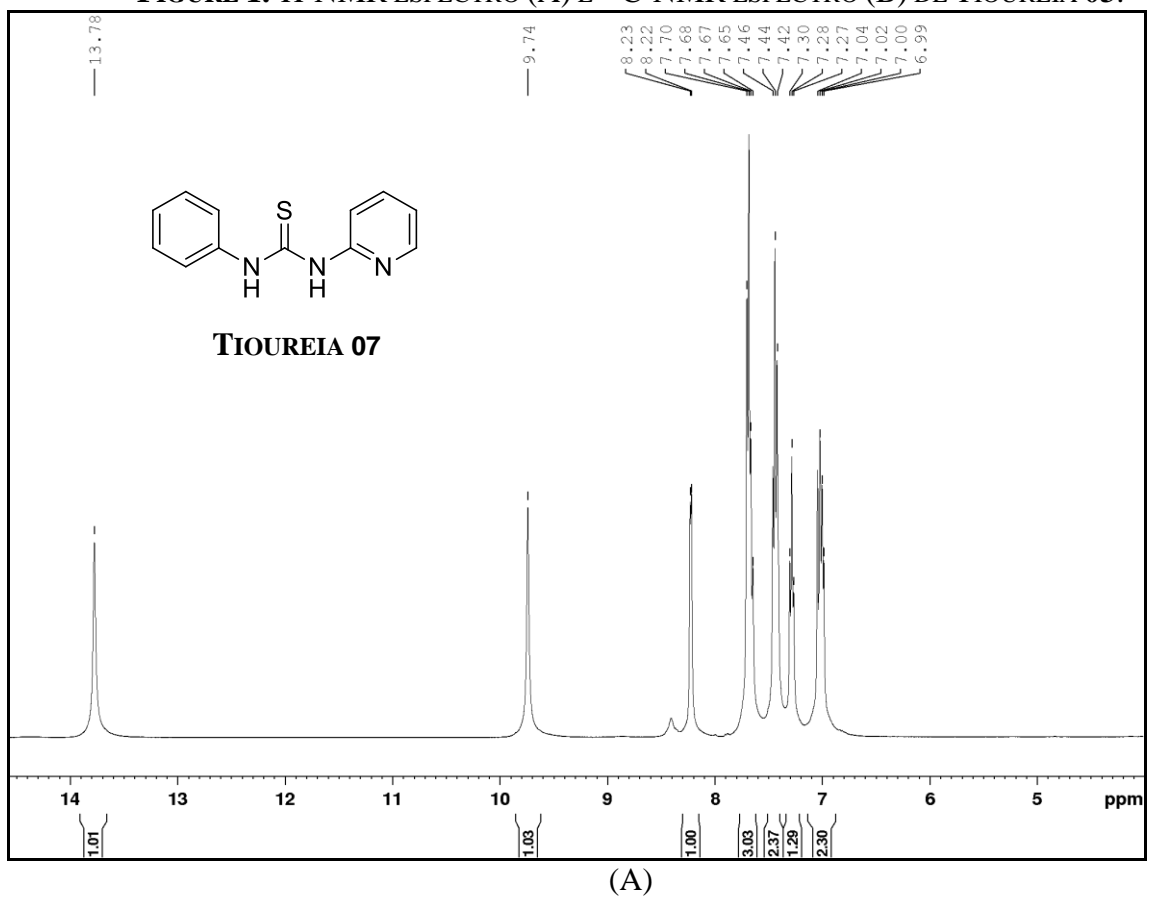


FIGURE 1. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 03.



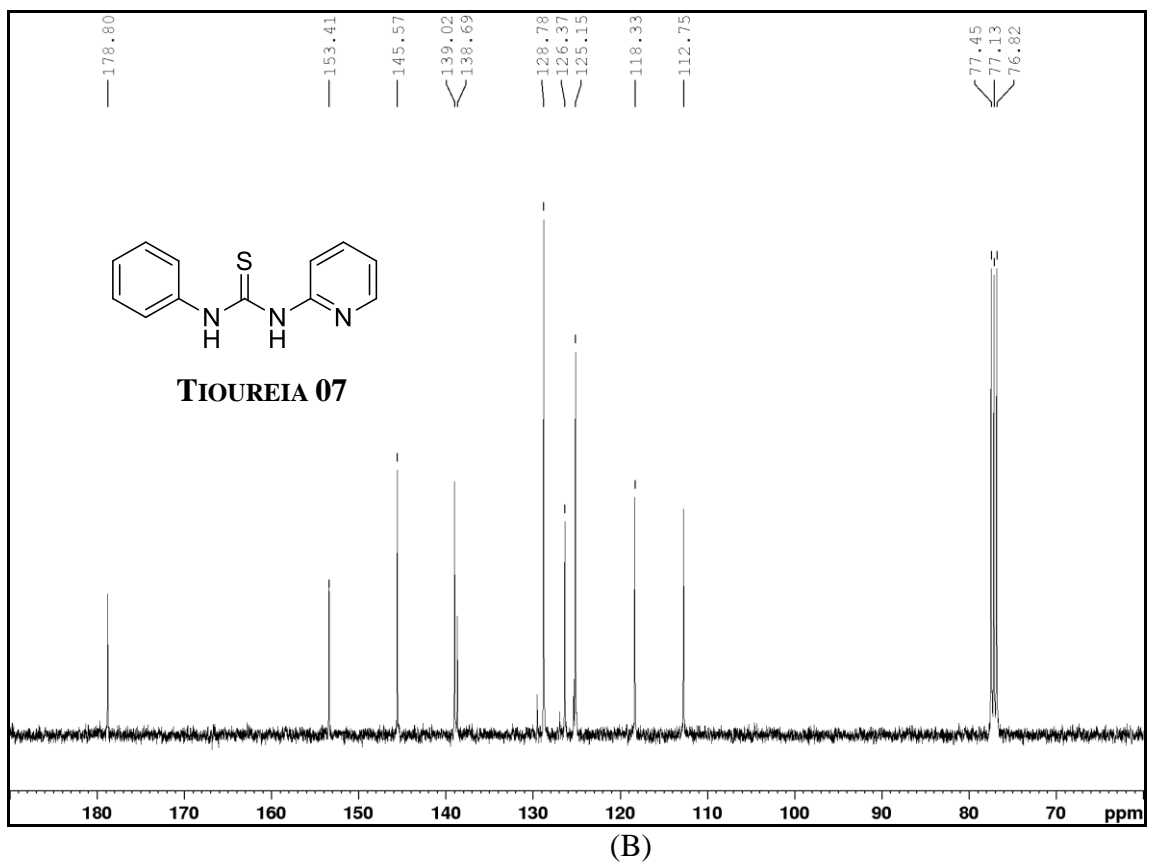
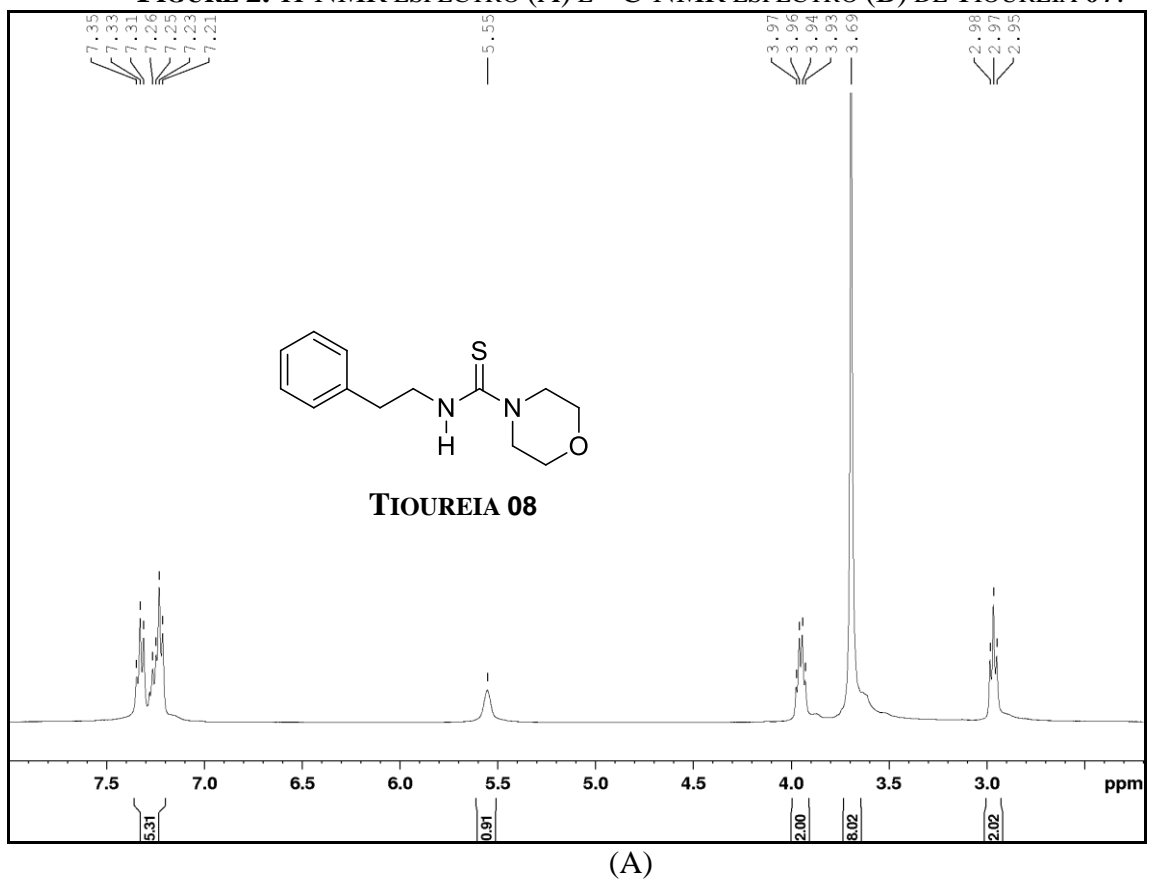


FIGURE 2. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 07.



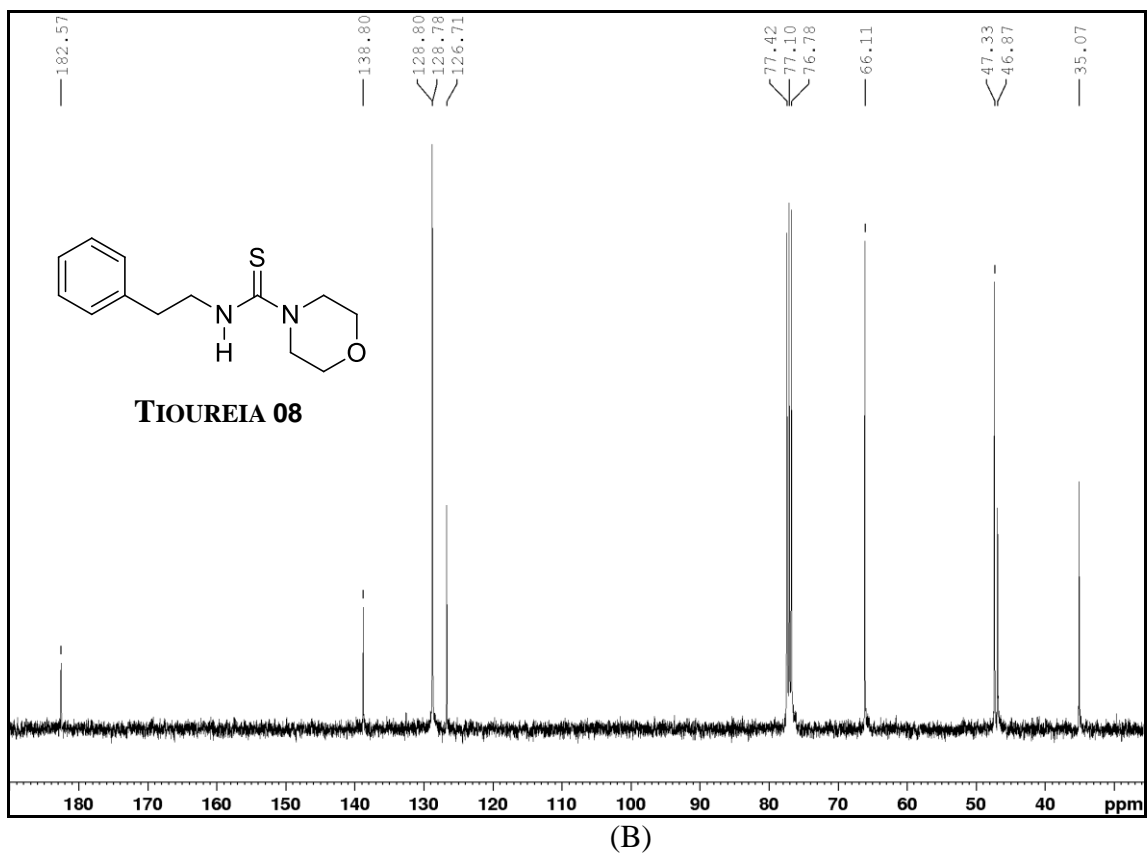
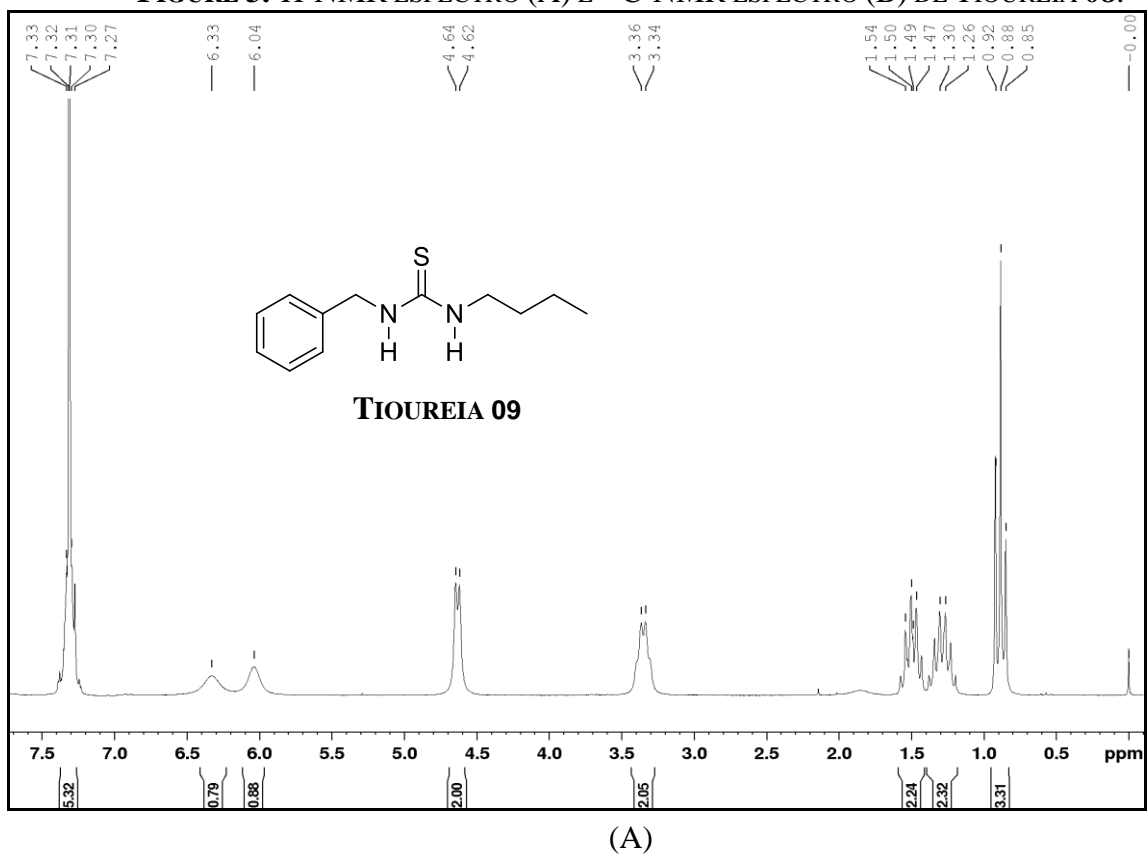
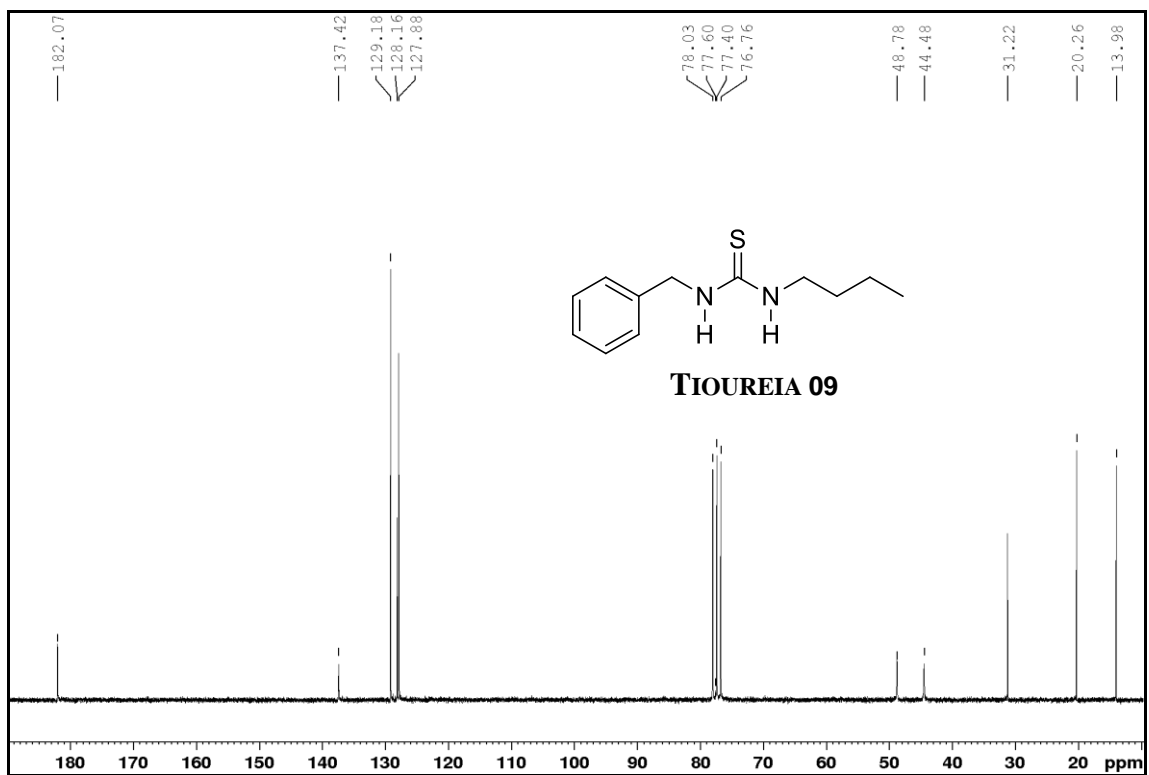


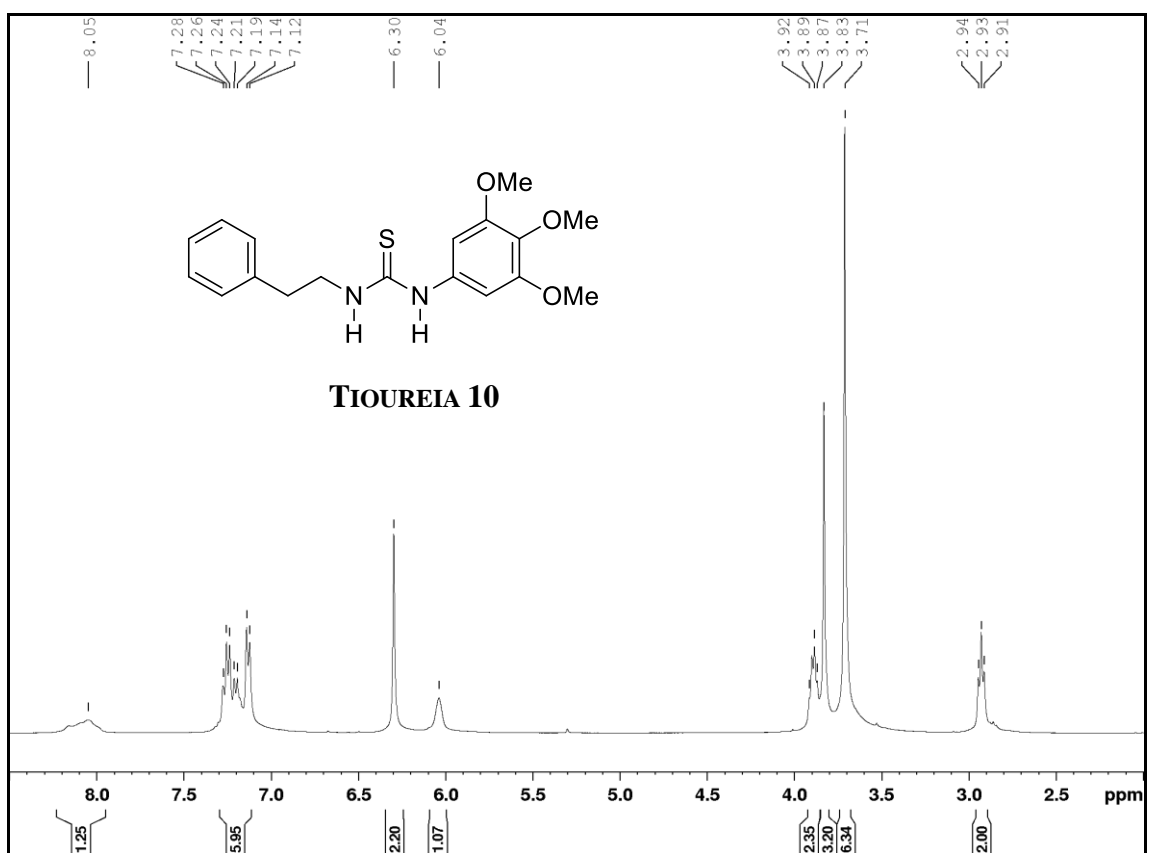
FIGURE 3. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 08.





(B)

FIGURE 4. $^1\text{H-NMR}$ ESPECTRO (A) E $^{13}\text{C-NMR}$ ESPECTRO (B) DE TIUREIA 09.



(A)

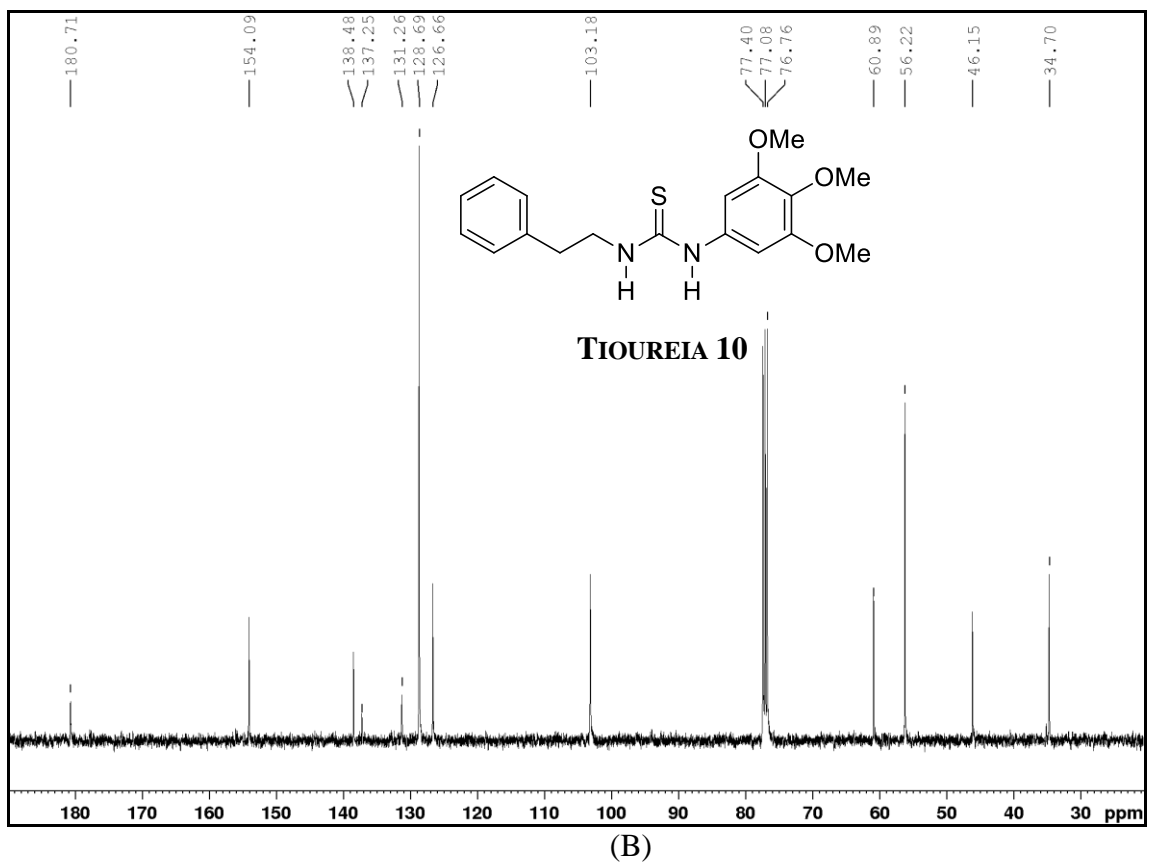
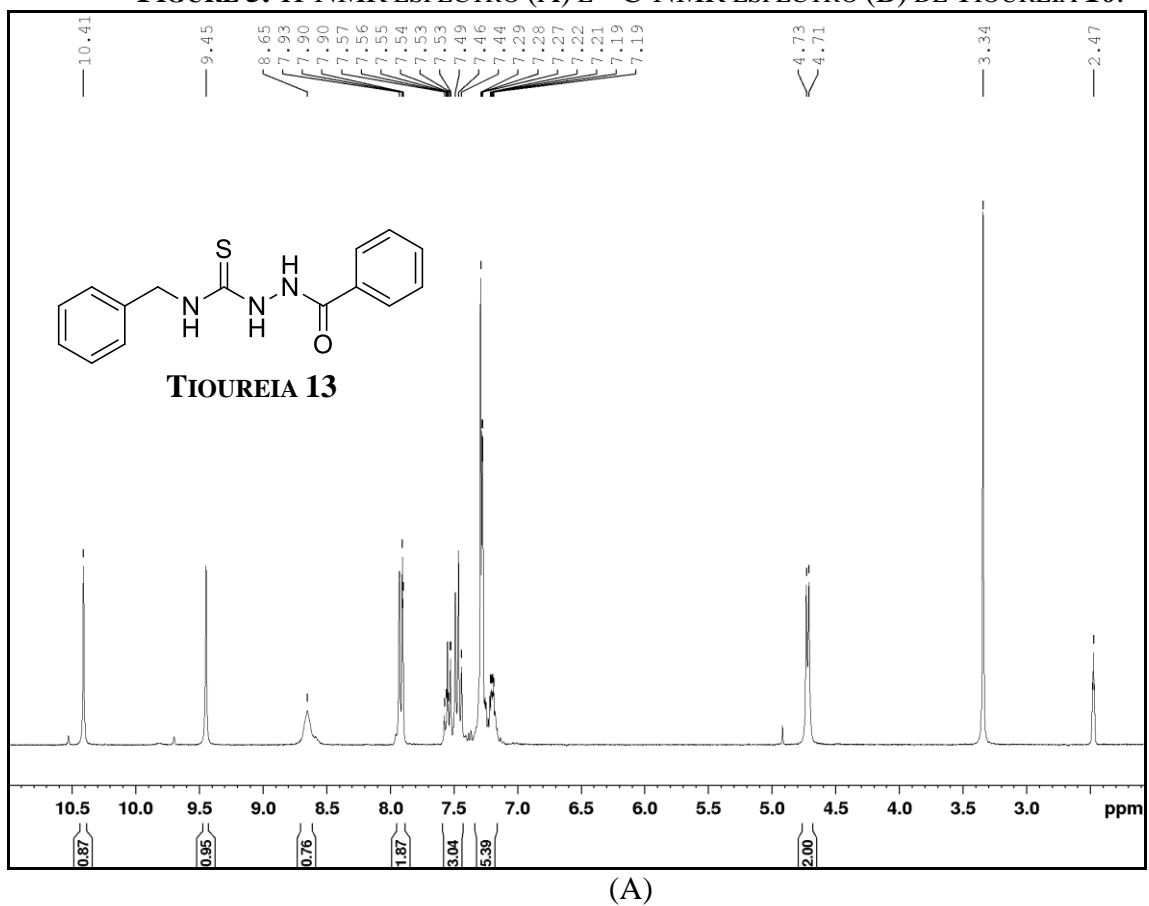


FIGURE 5. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIOUREIA 10.



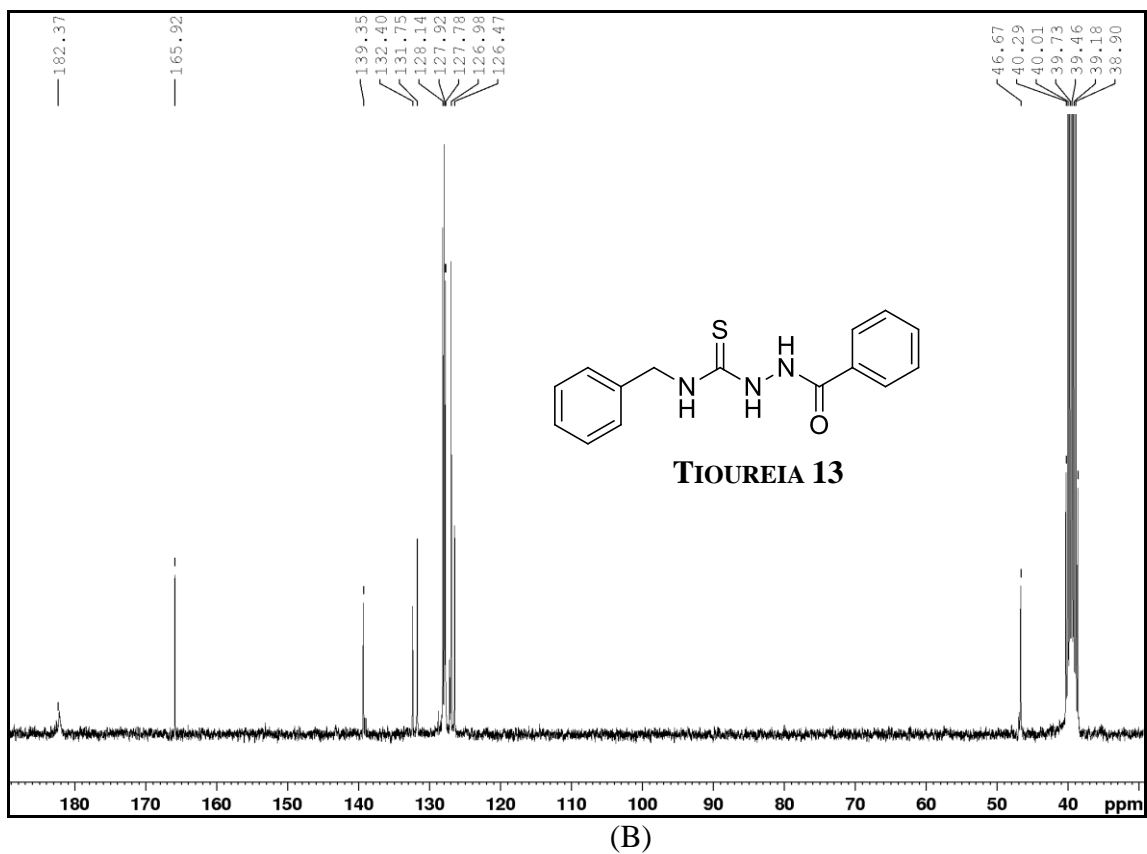
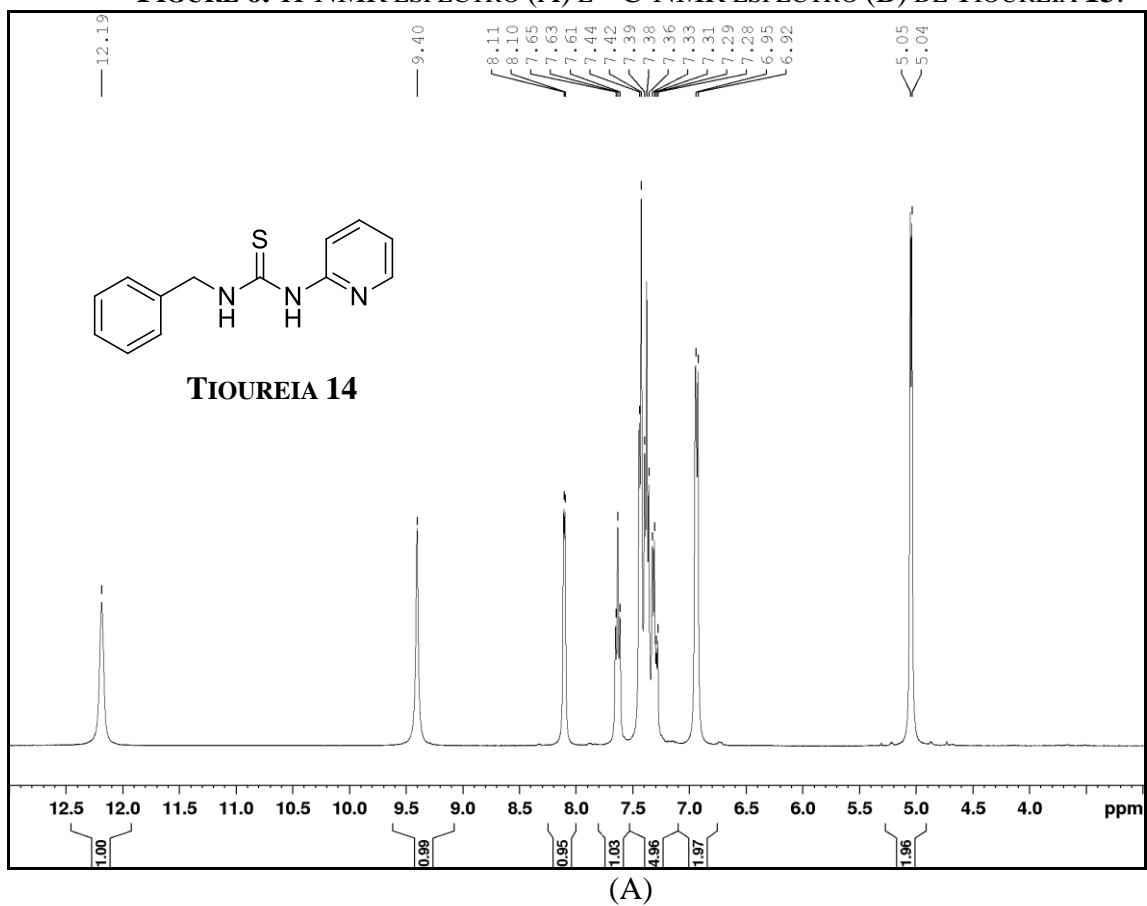
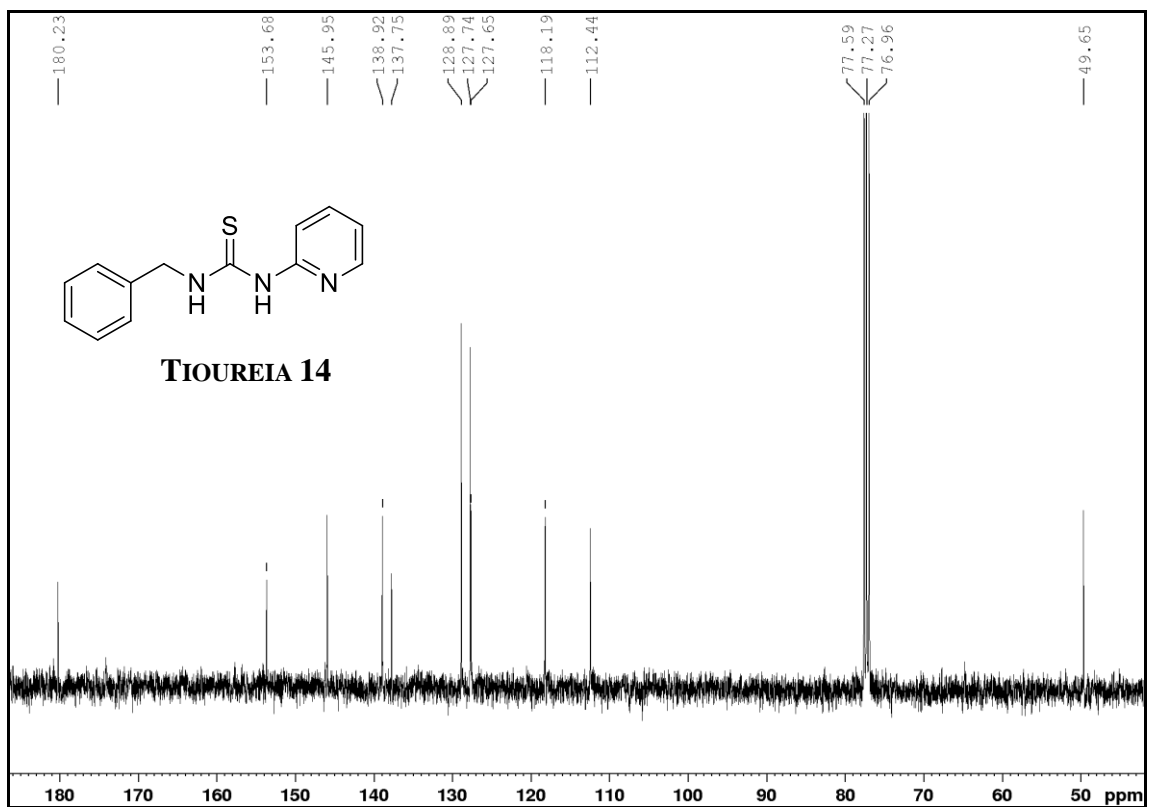


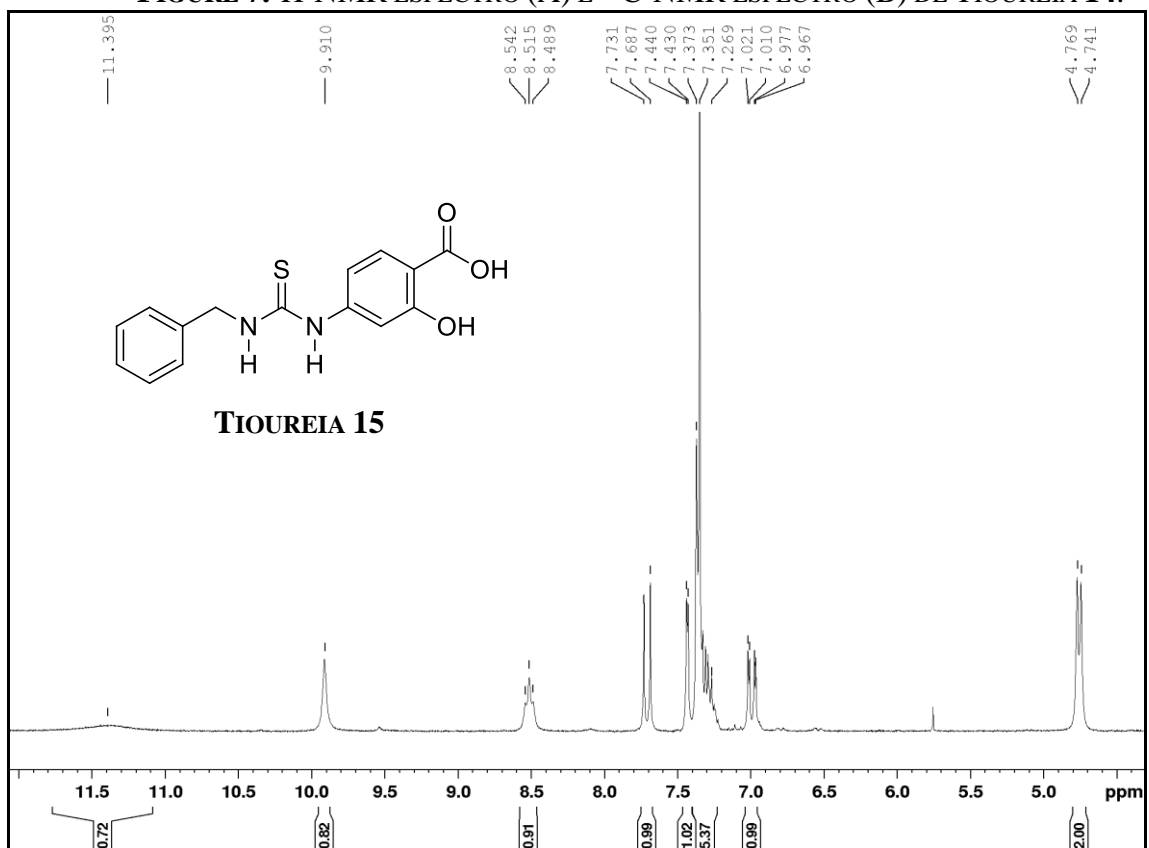
FIGURE 6. ^1H -NMR ESPECTRO (A) E ^{13}C -NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 13.





(B)

FIGURE 7. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 14.



(A)

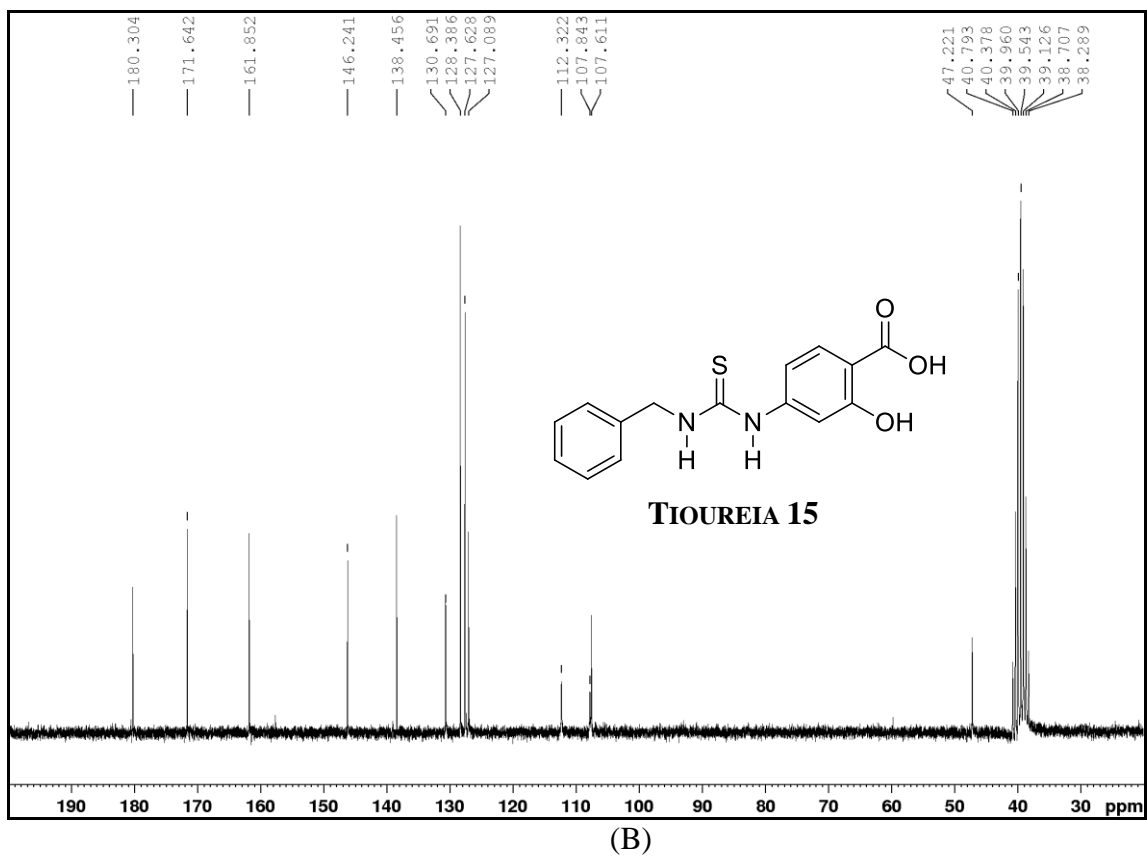
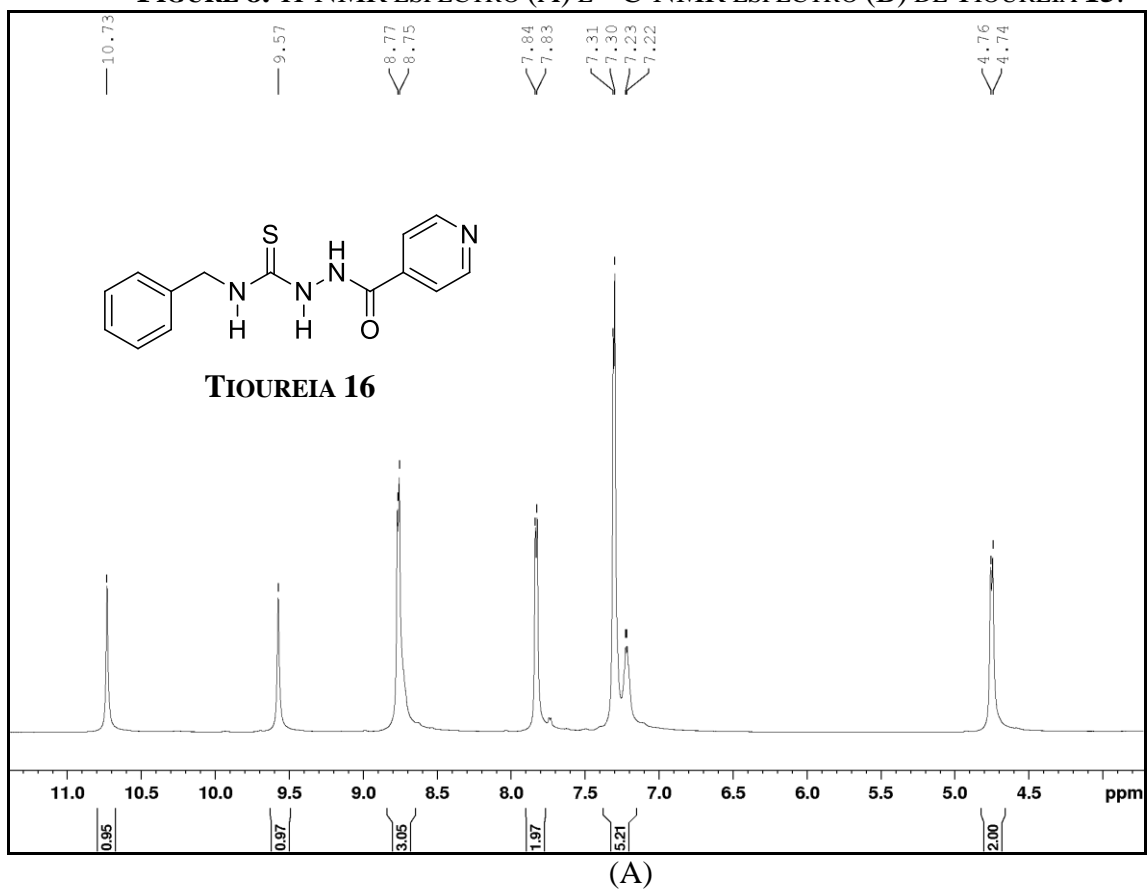
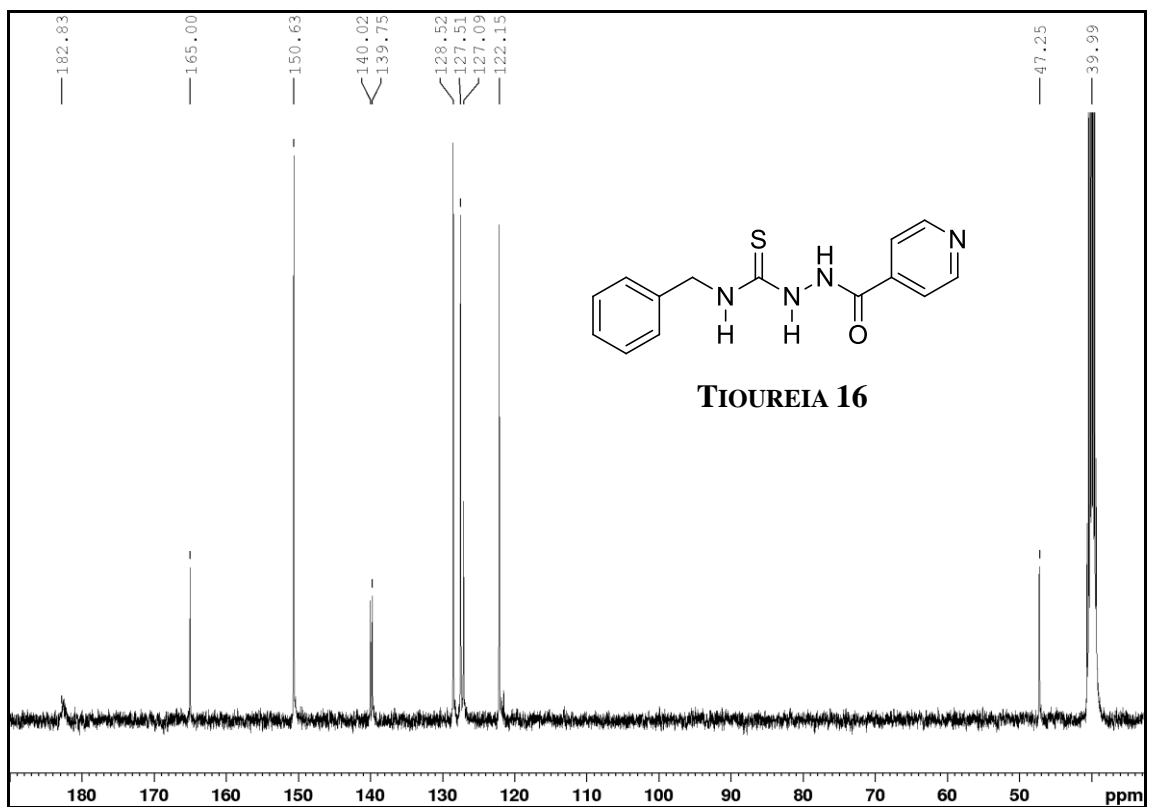


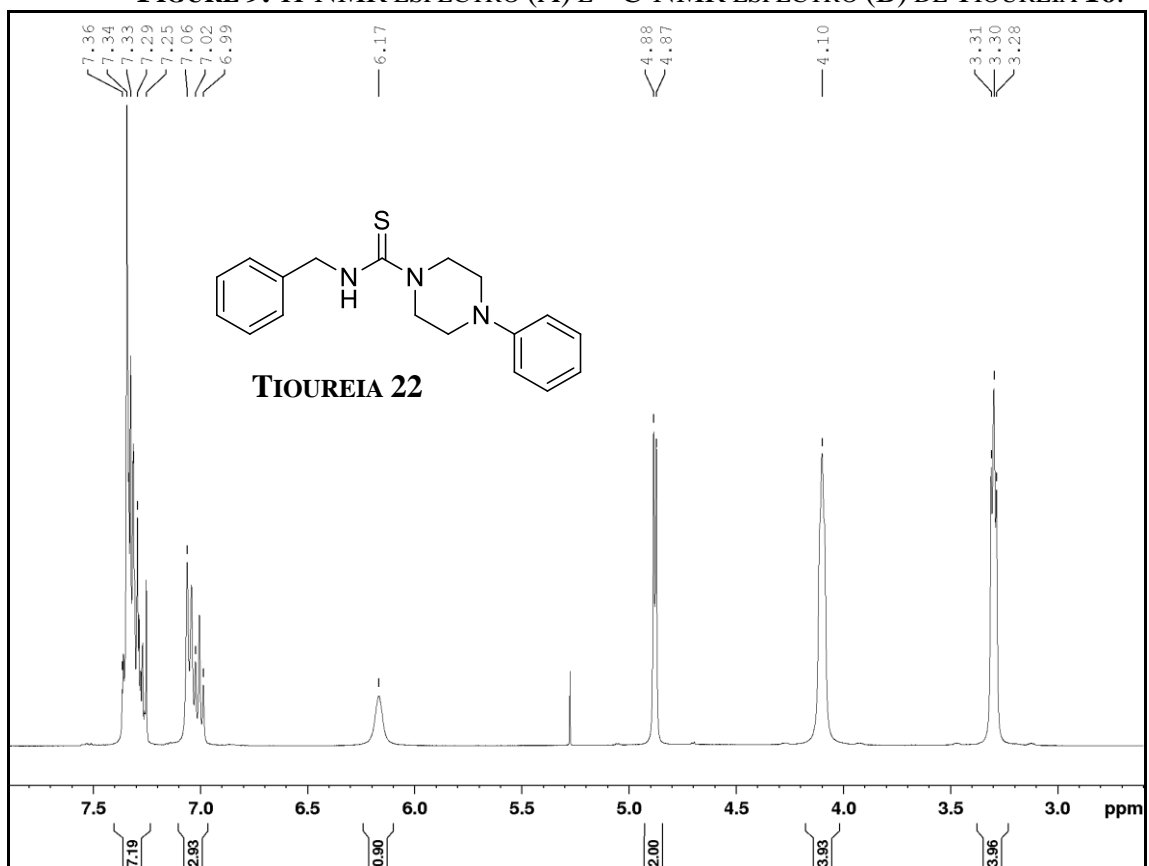
FIGURE 8. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 15.





(B)

FIGURE 9. $^1\text{H-NMR}$ ESPECTRO (A) E $^{13}\text{C-NMR}$ ESPECTRO (B) DE TIUREIA 16.



(A)

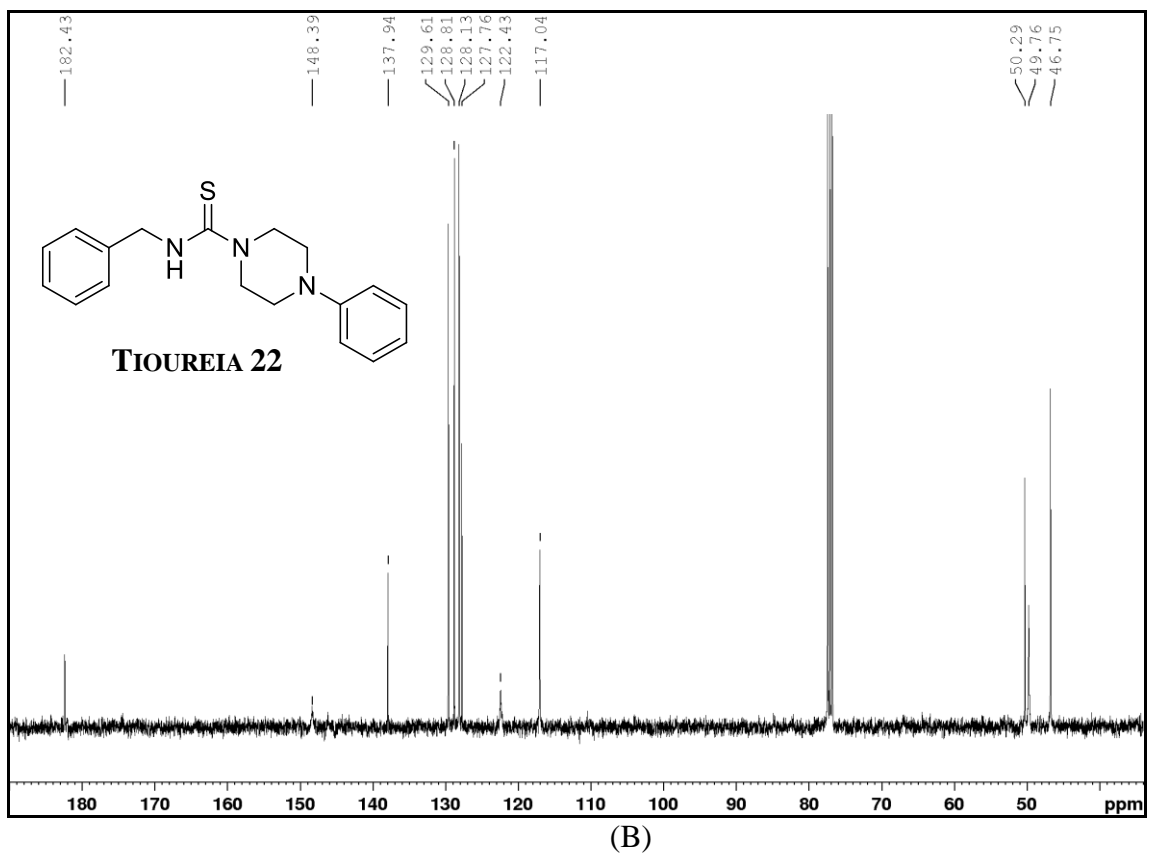
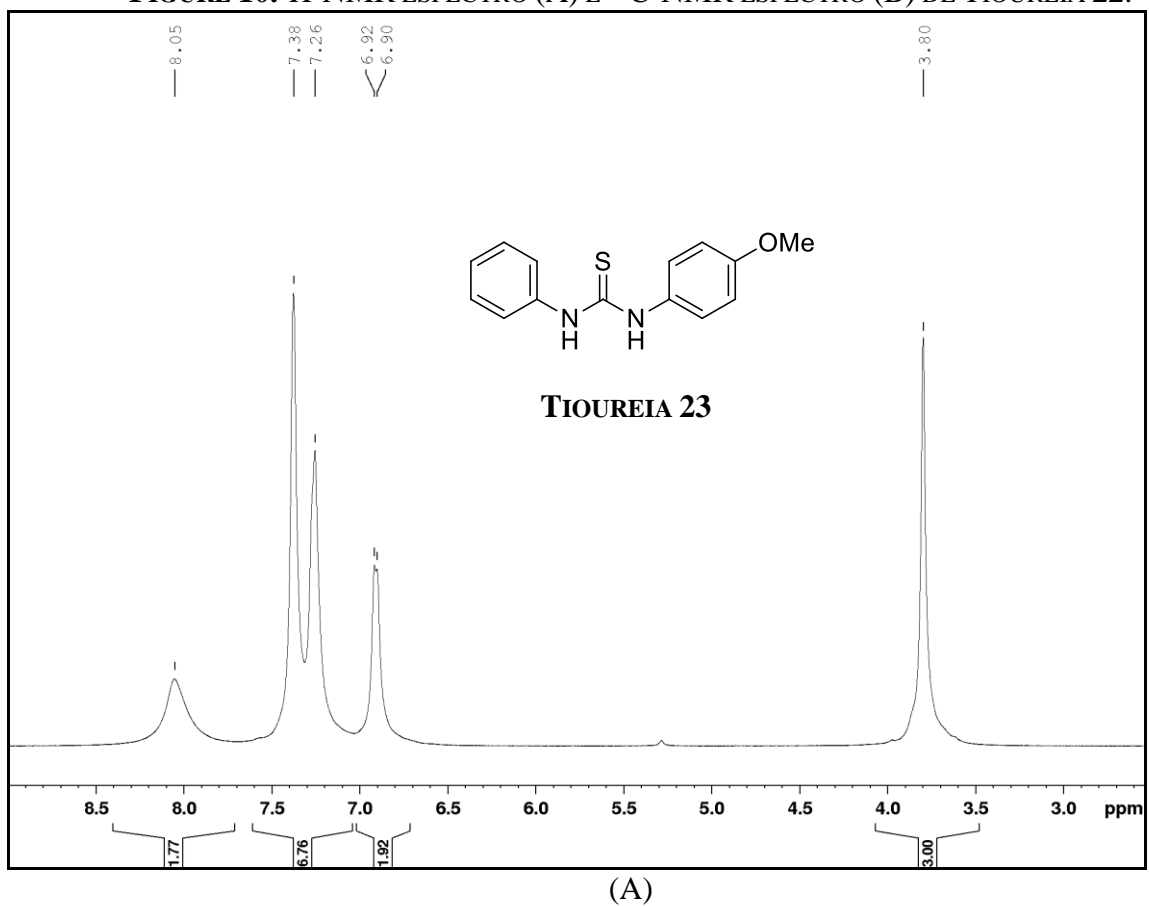
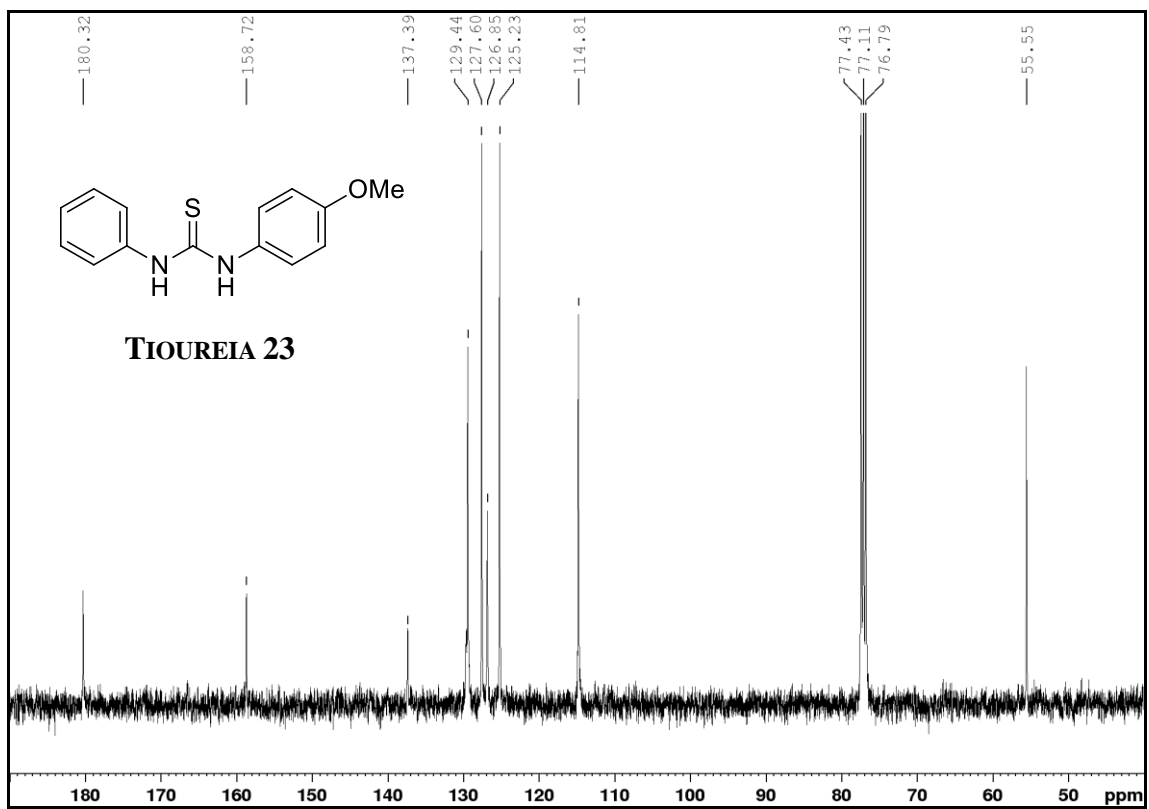


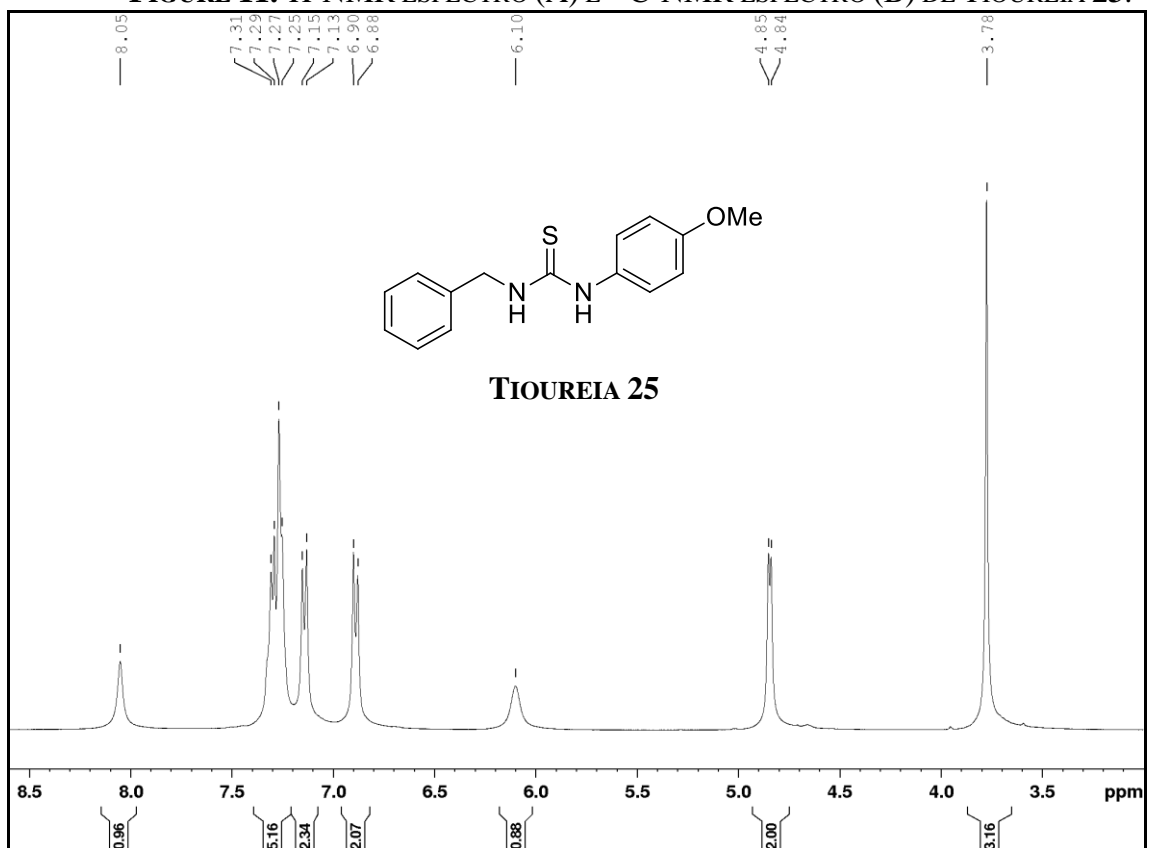
FIGURE 10. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 22.





(B)

FIGURE 11. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIOUREIA 23.



(A)

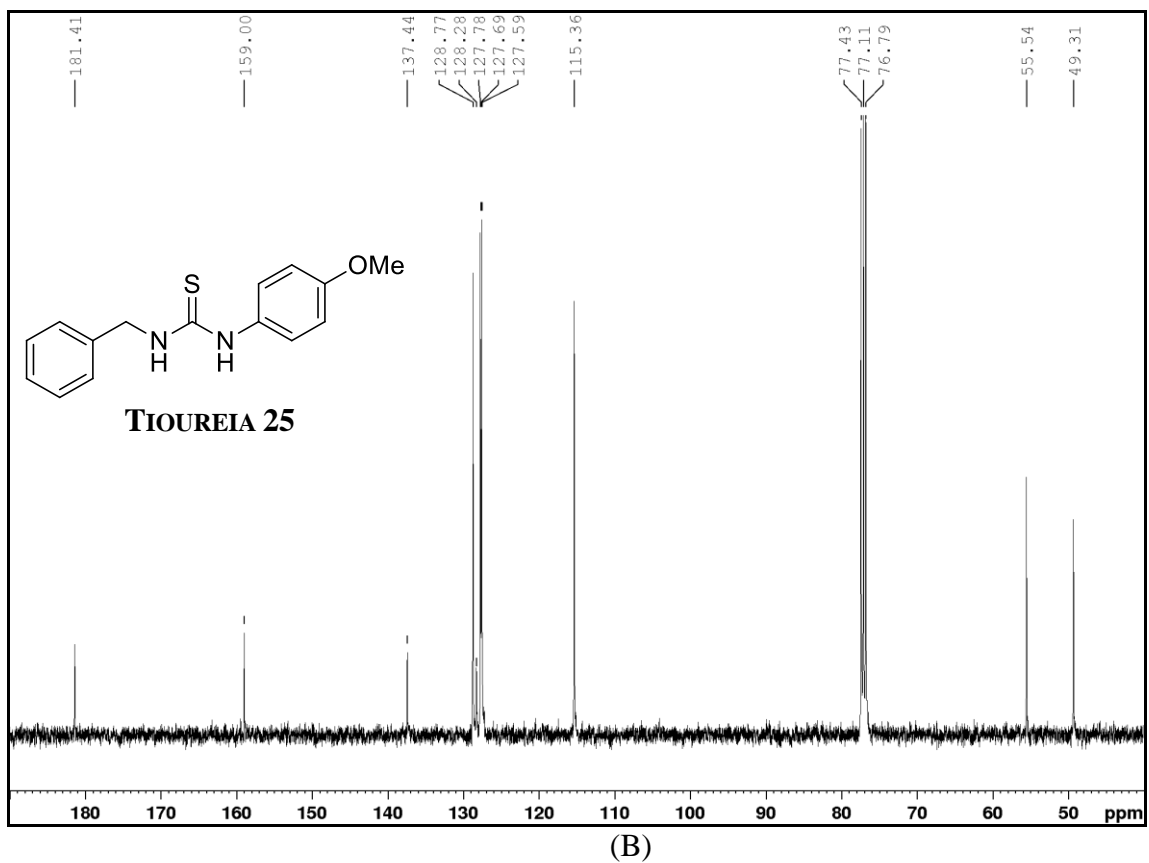
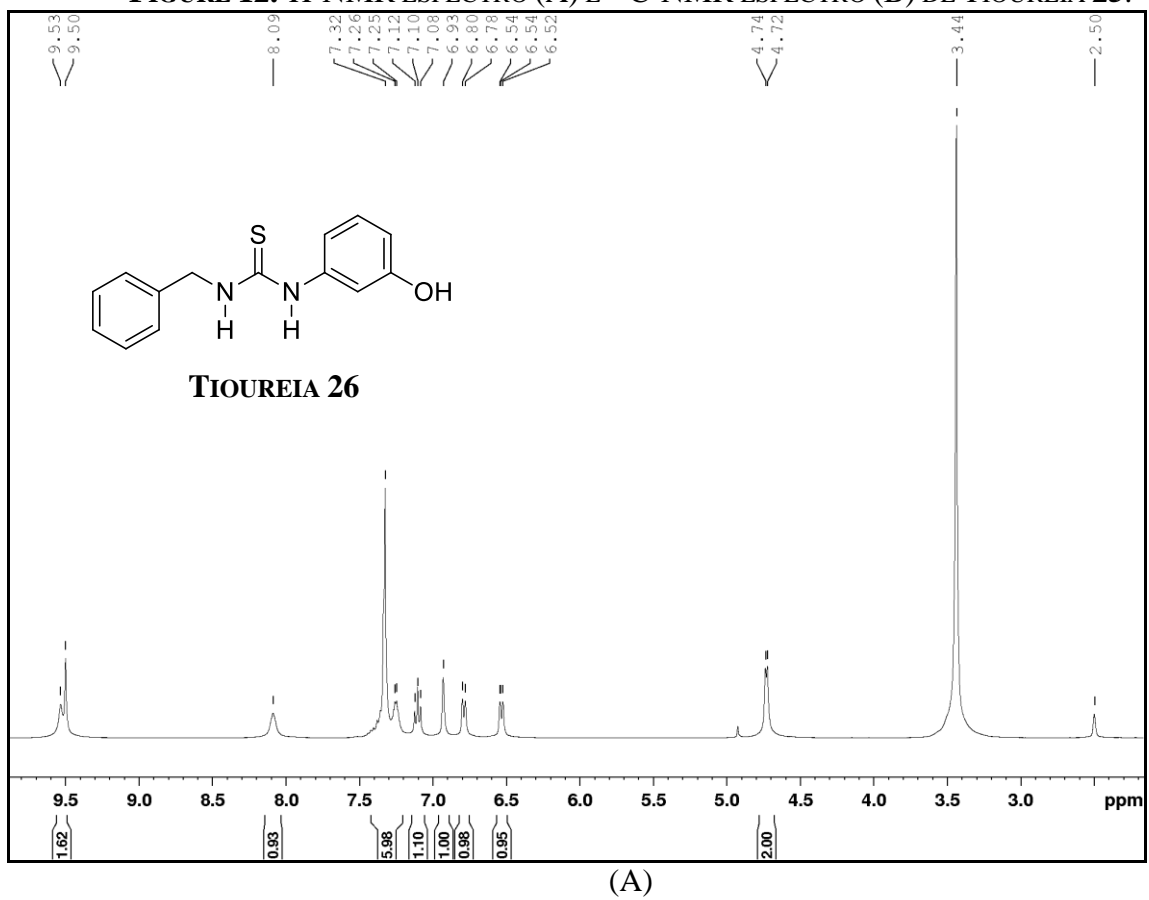


FIGURE 12. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 25.



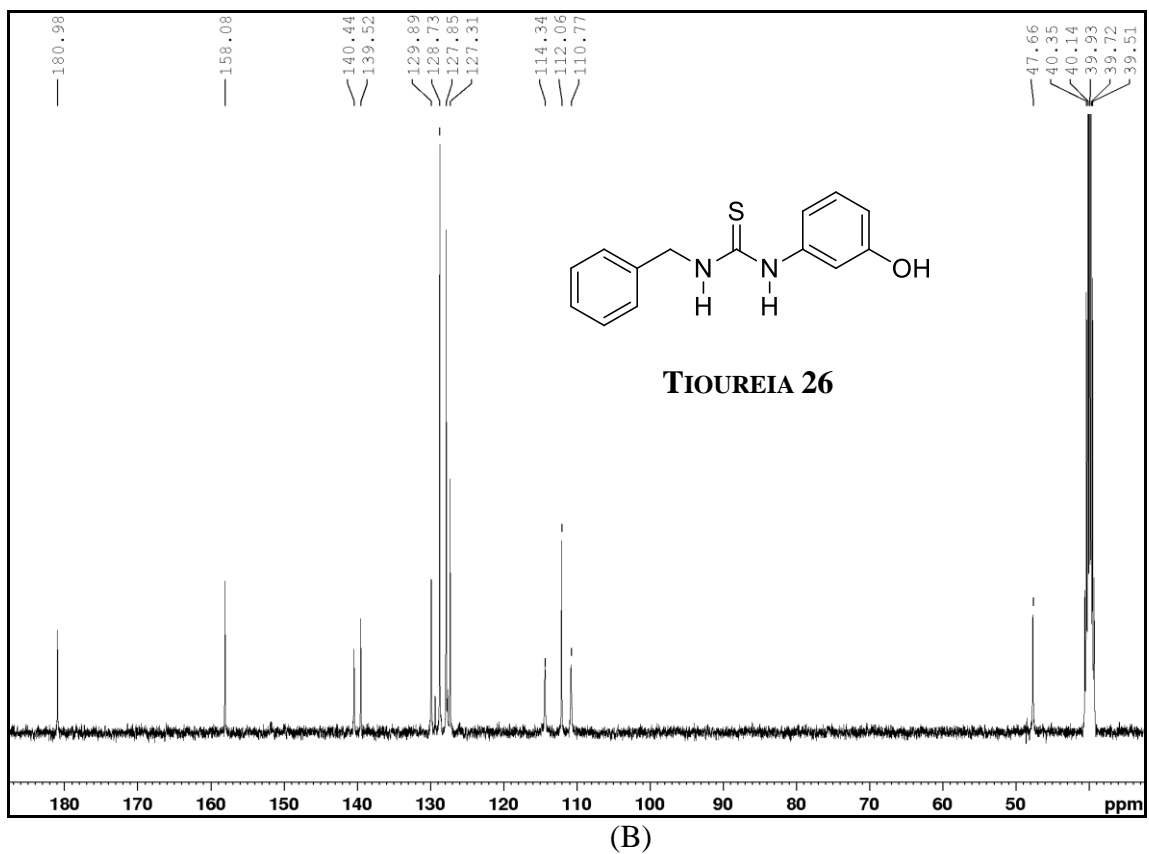
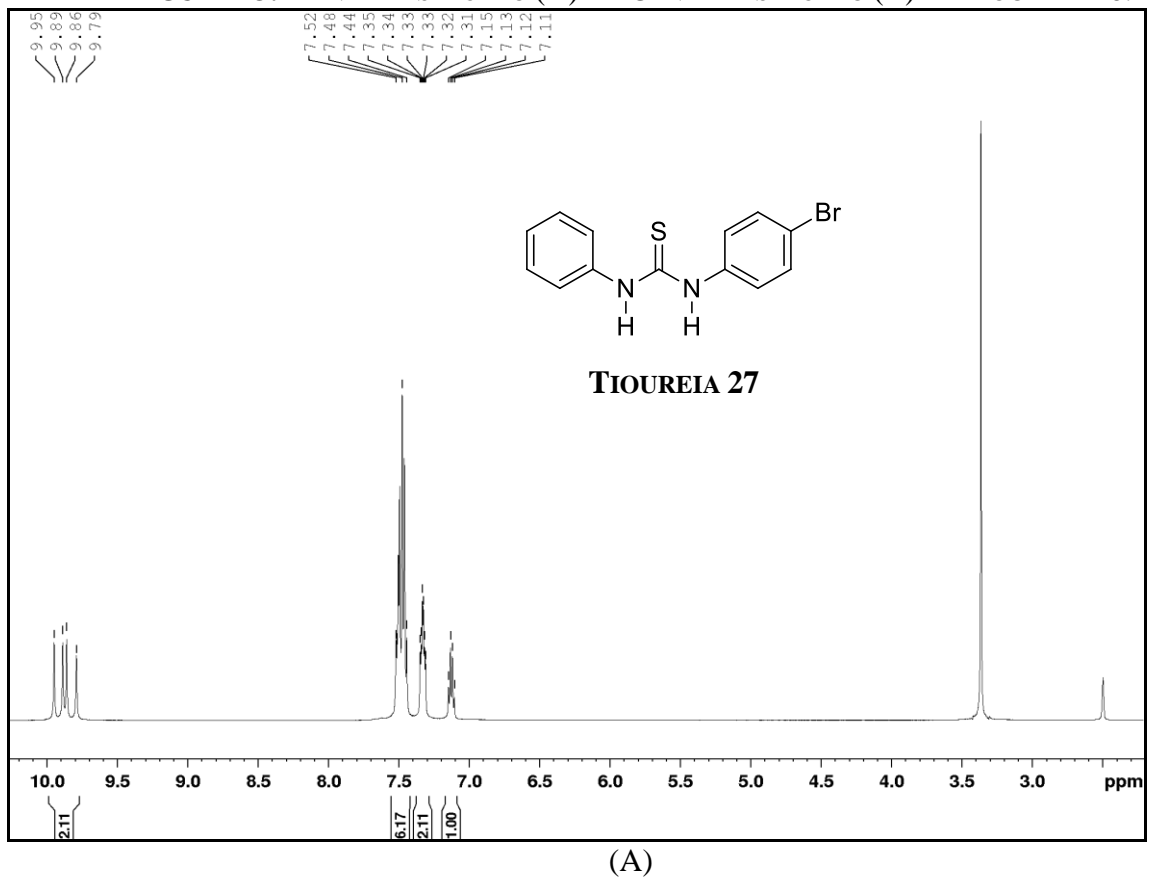


FIGURE 13. ^1H -NMR ESPECTRO (A) E ^{13}C -NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 26.



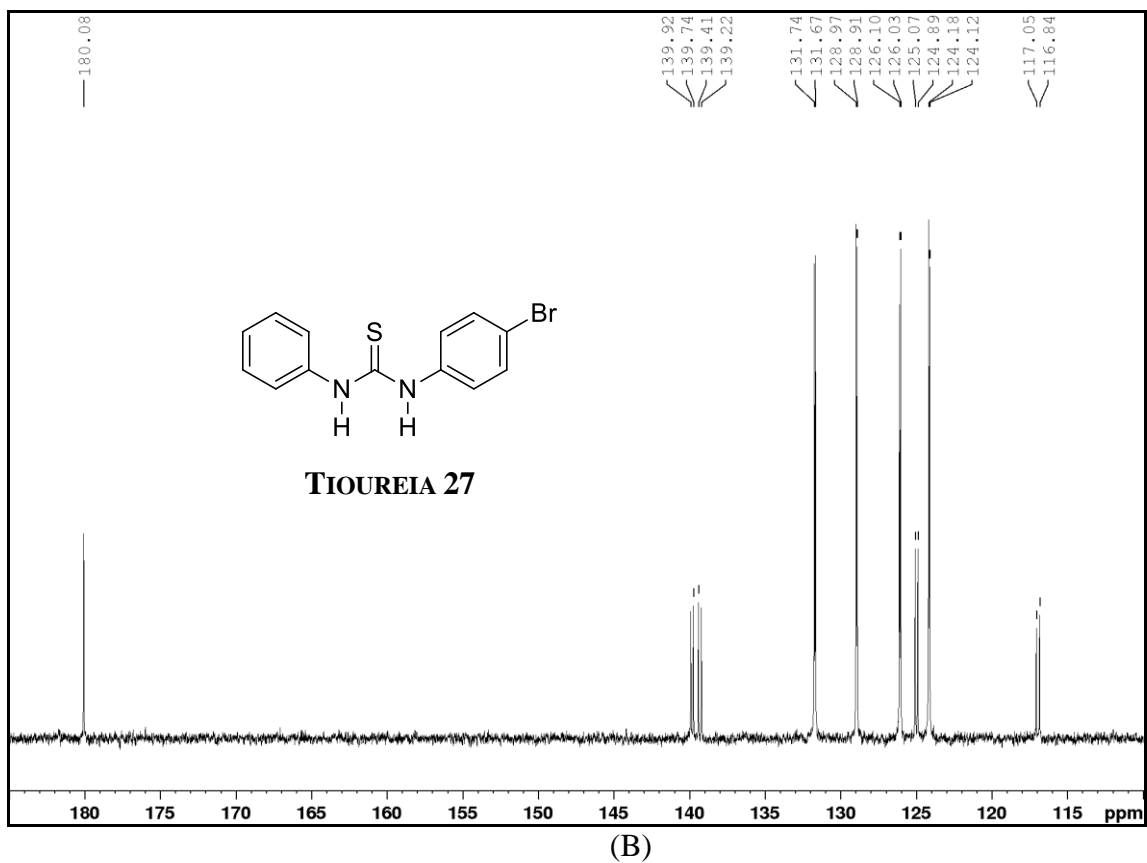
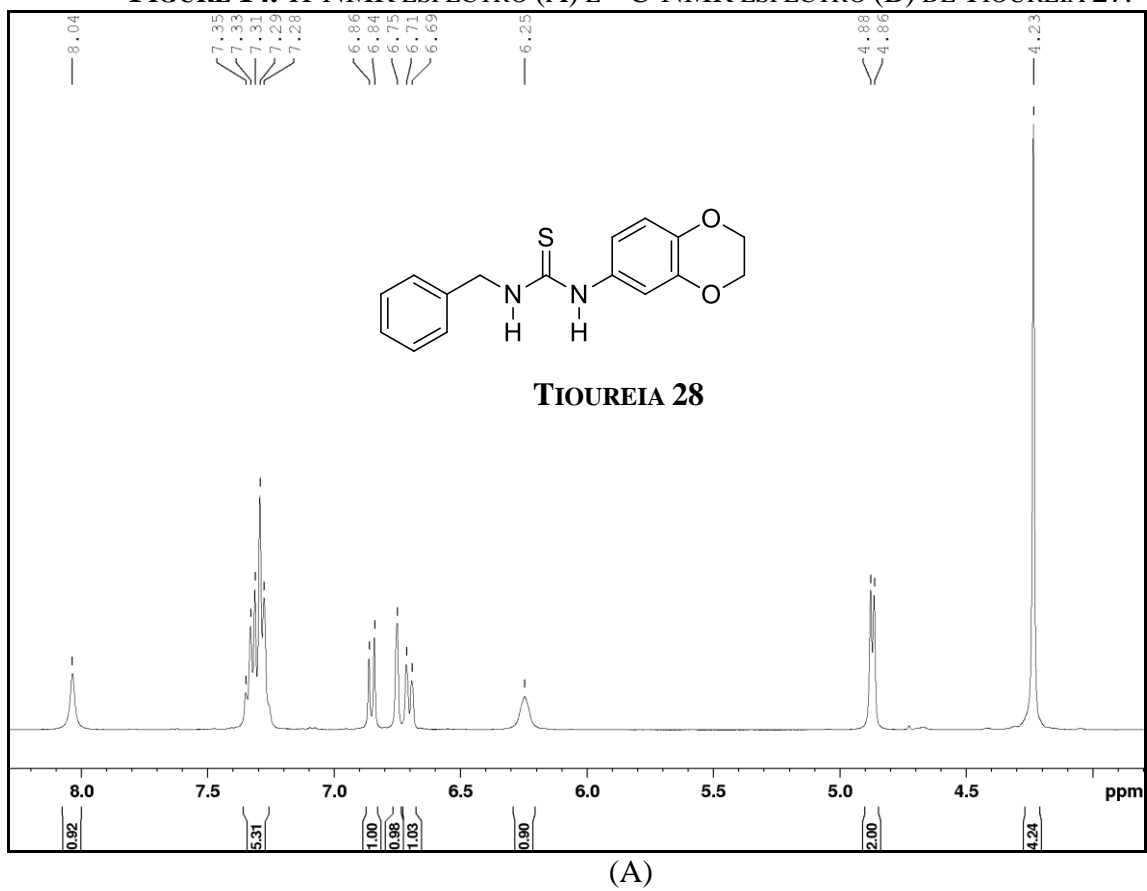


FIGURE 14. ^1H -NMR ESPECTRO (A) E ^{13}C -NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 27.



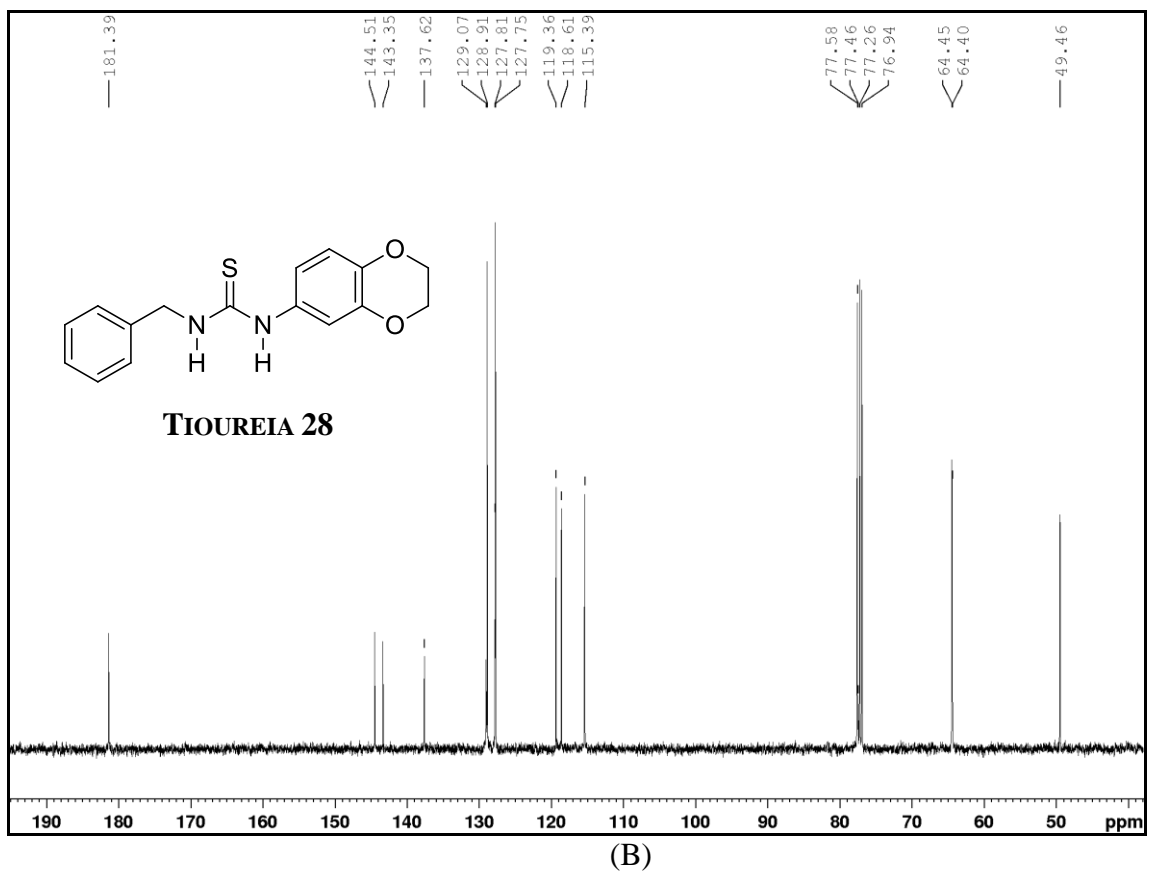
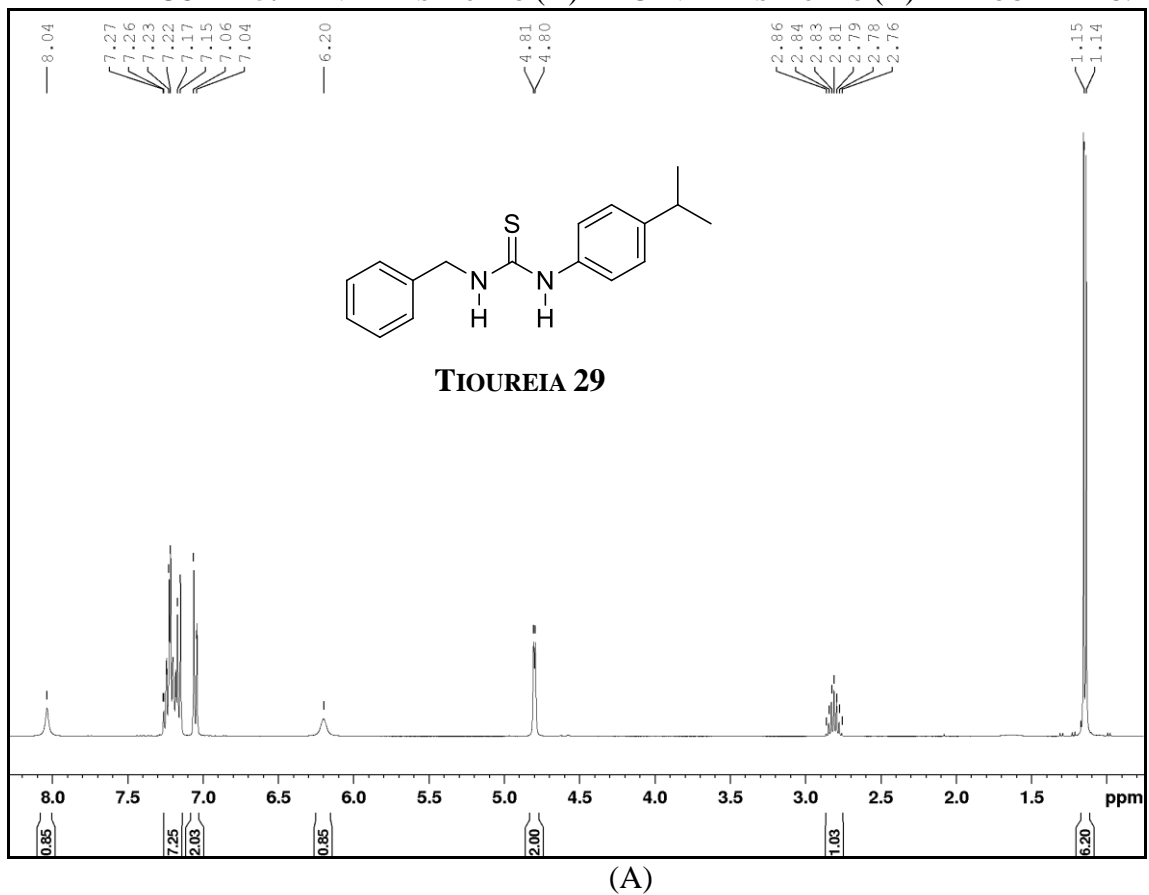
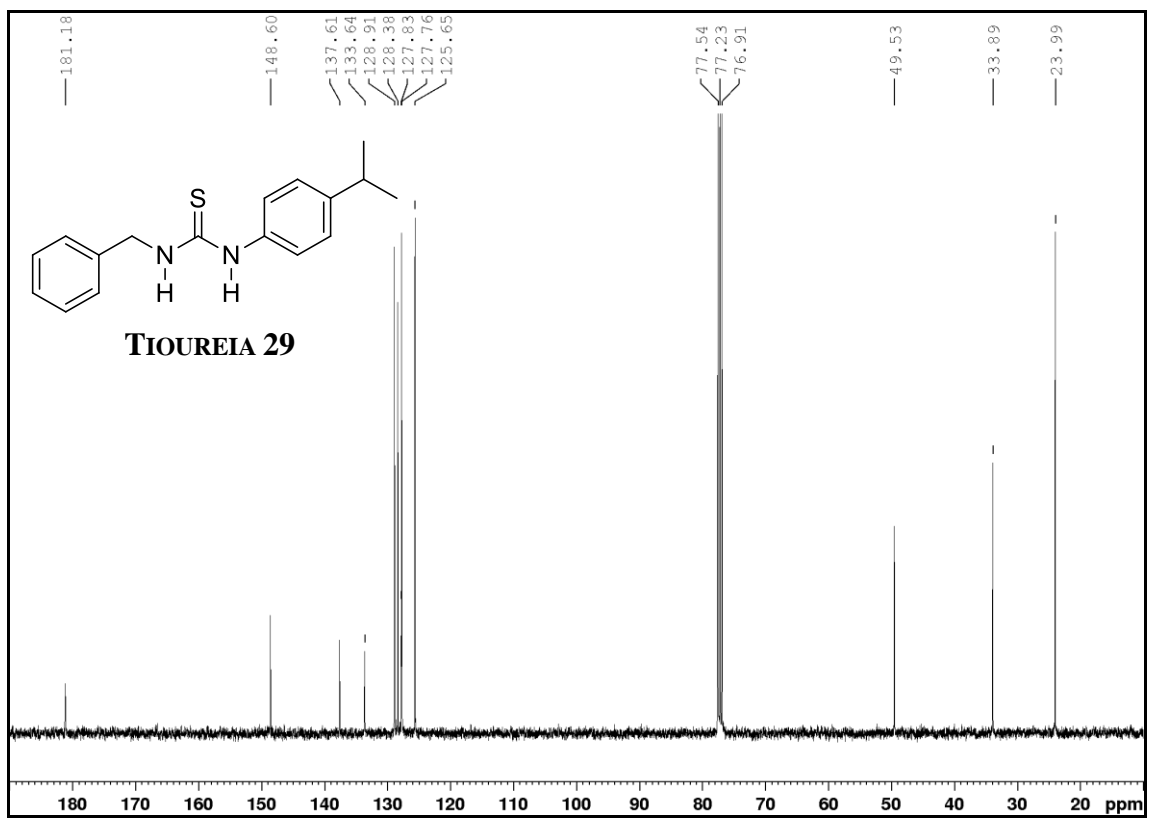


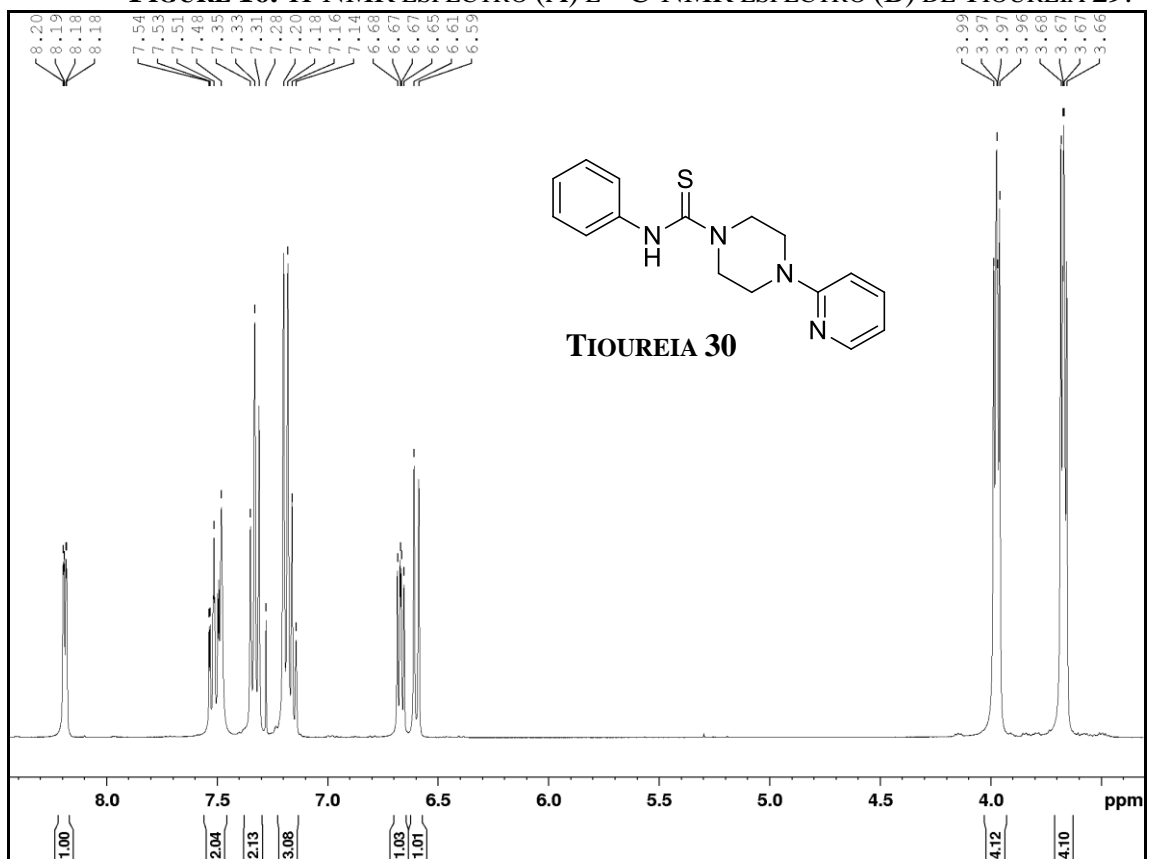
FIGURE 15. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 28.



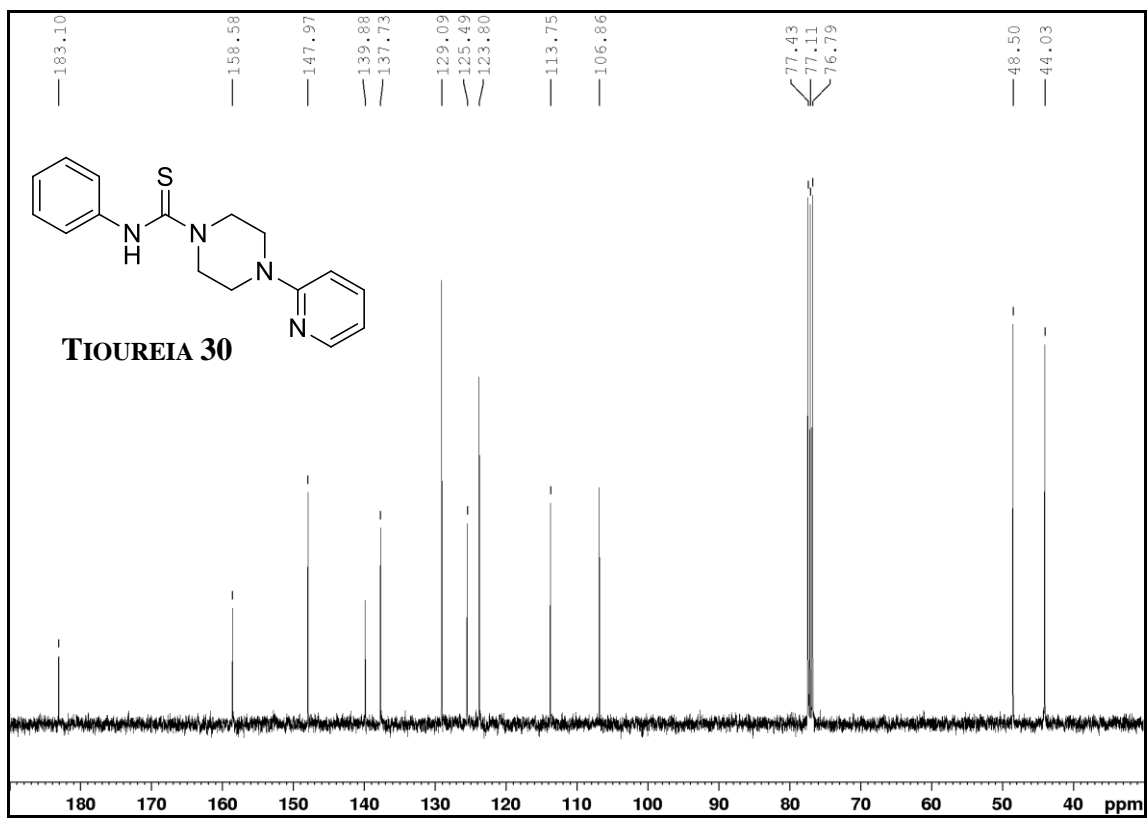


(B)

FIGURE 16. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 29.

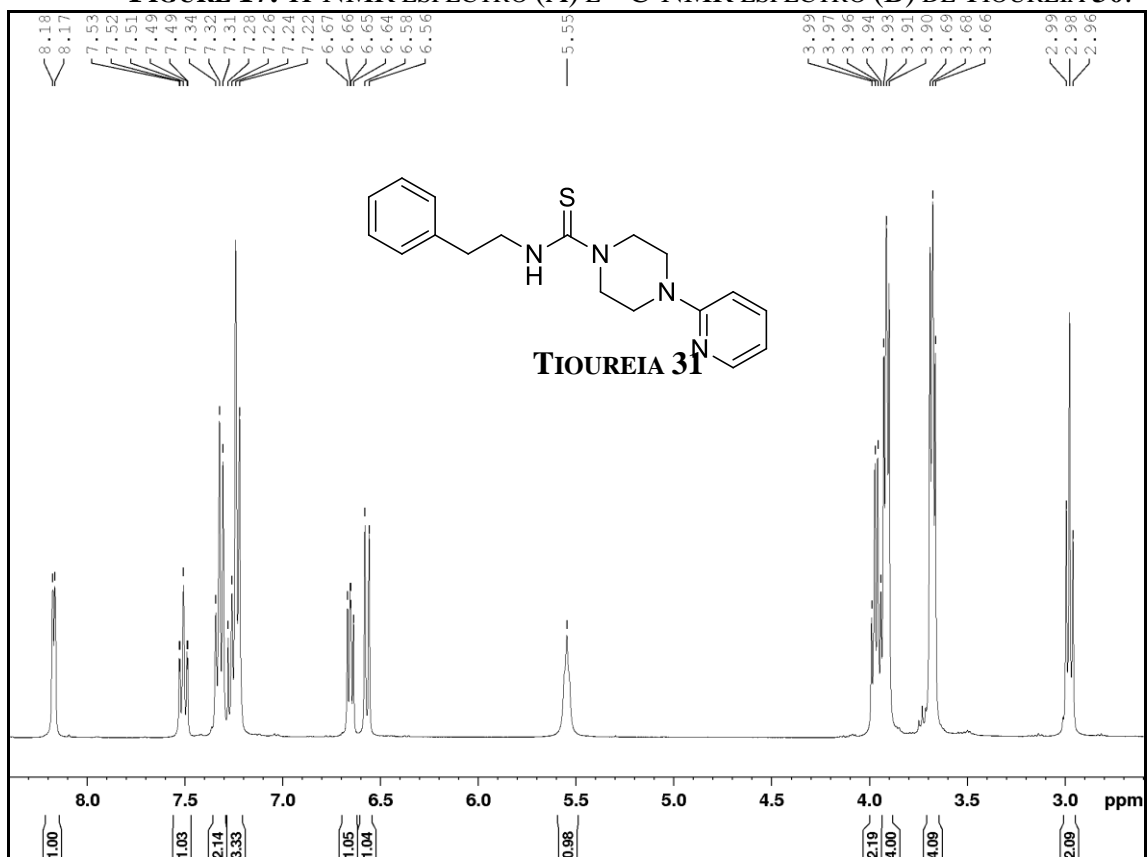


(A)



(B)

FIGURE 17. $^1\text{H-NMR}$ ESPECTRO (A) E $^{13}\text{C-NMR}$ ESPECTRO (B) DE TIOUREIA 30.



(A)

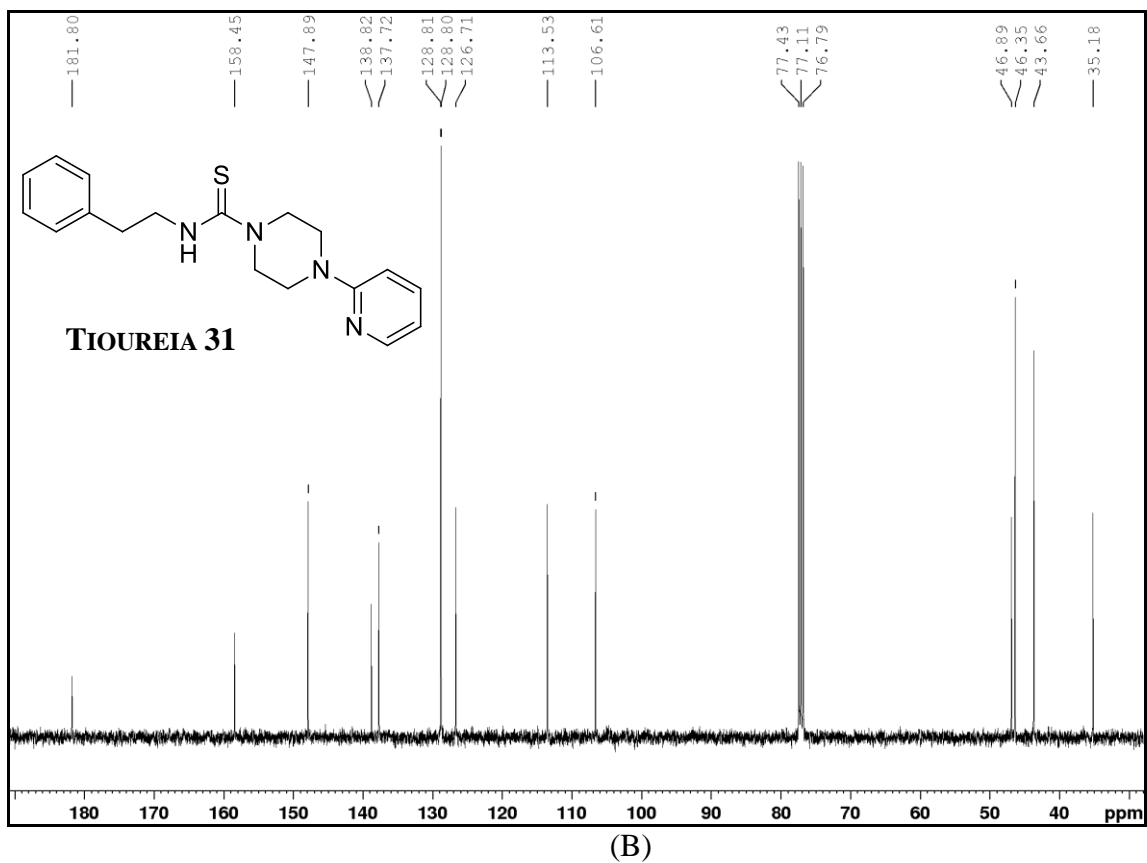
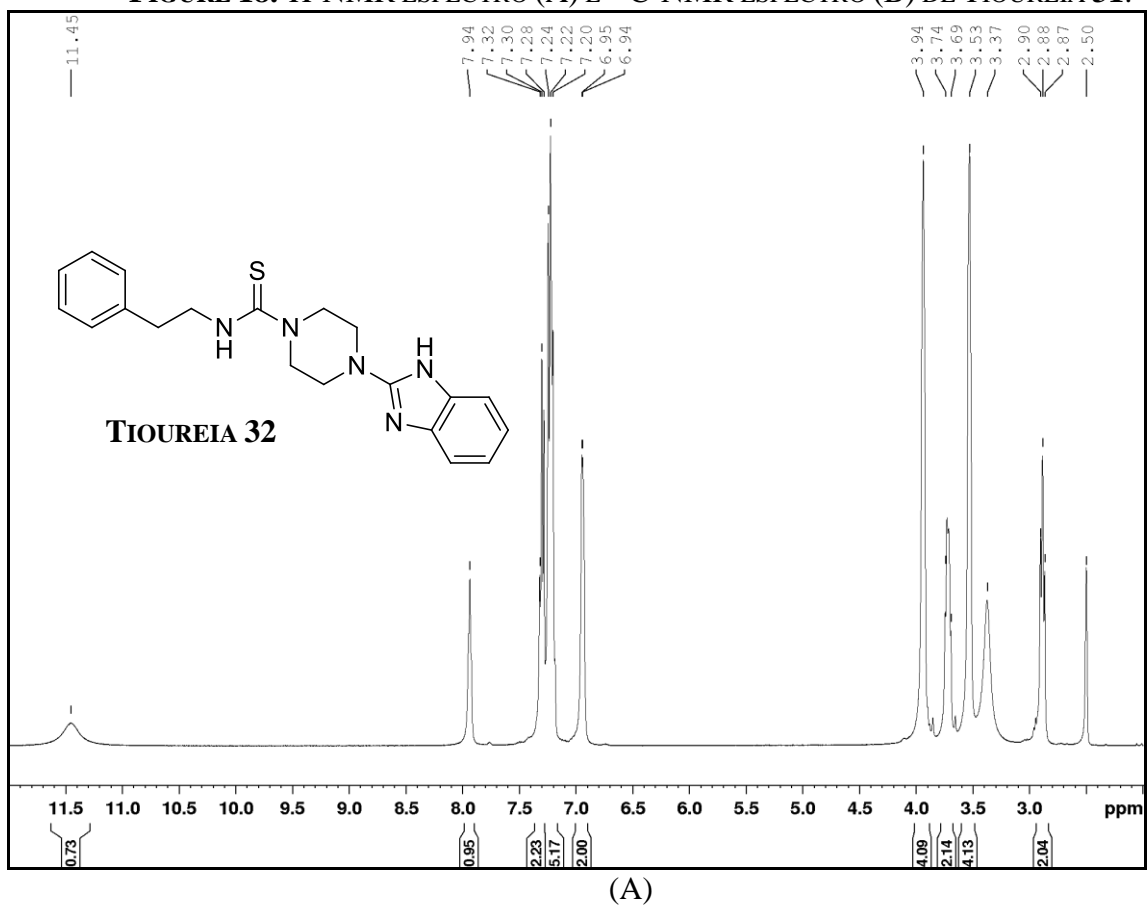


FIGURE 18. $^1\text{H-NMR}$ ESPECTRO (A) E $^{13}\text{C-NMR}$ ESPECTRO (B) DE TIUREIA 31.



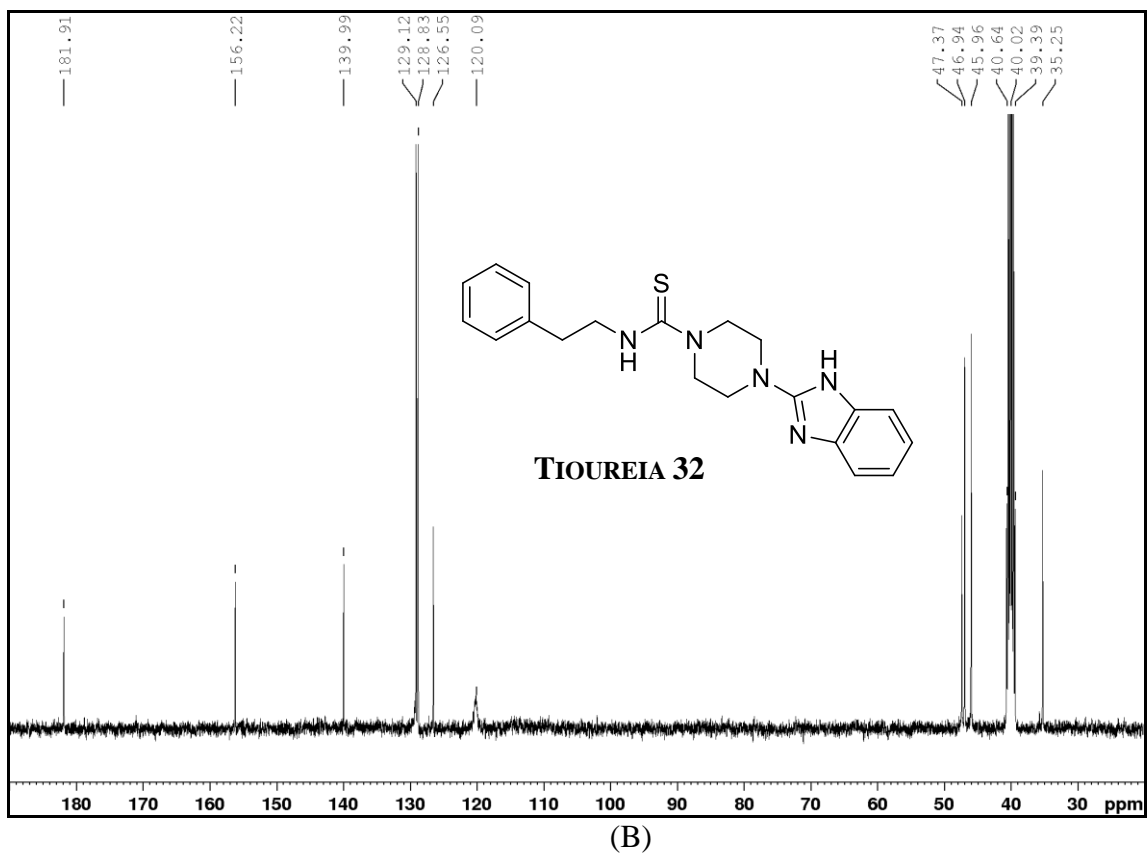
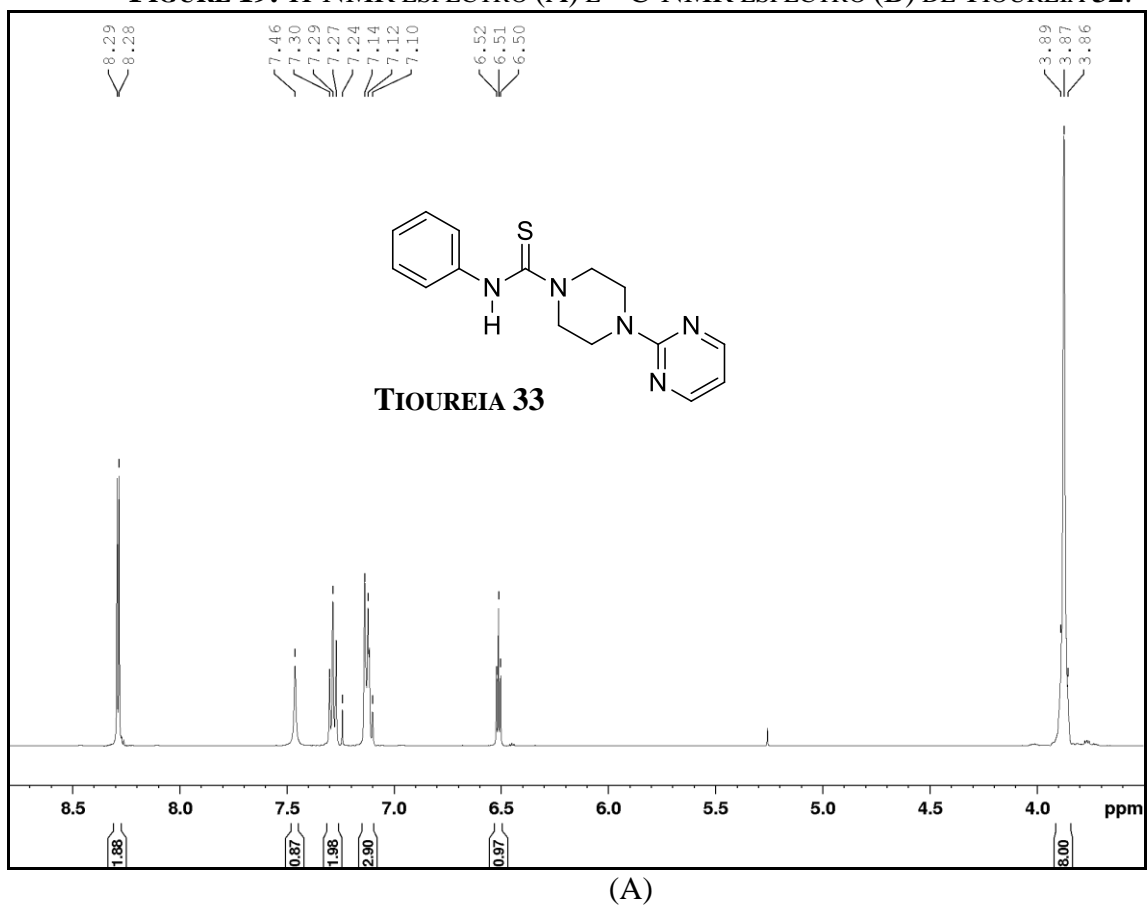


FIGURE 19. $^1\text{H-NMR}$ ESPECTRO (A) E $^{13}\text{C-NMR}$ ESPECTRO (B) DE TIUREIA 32.



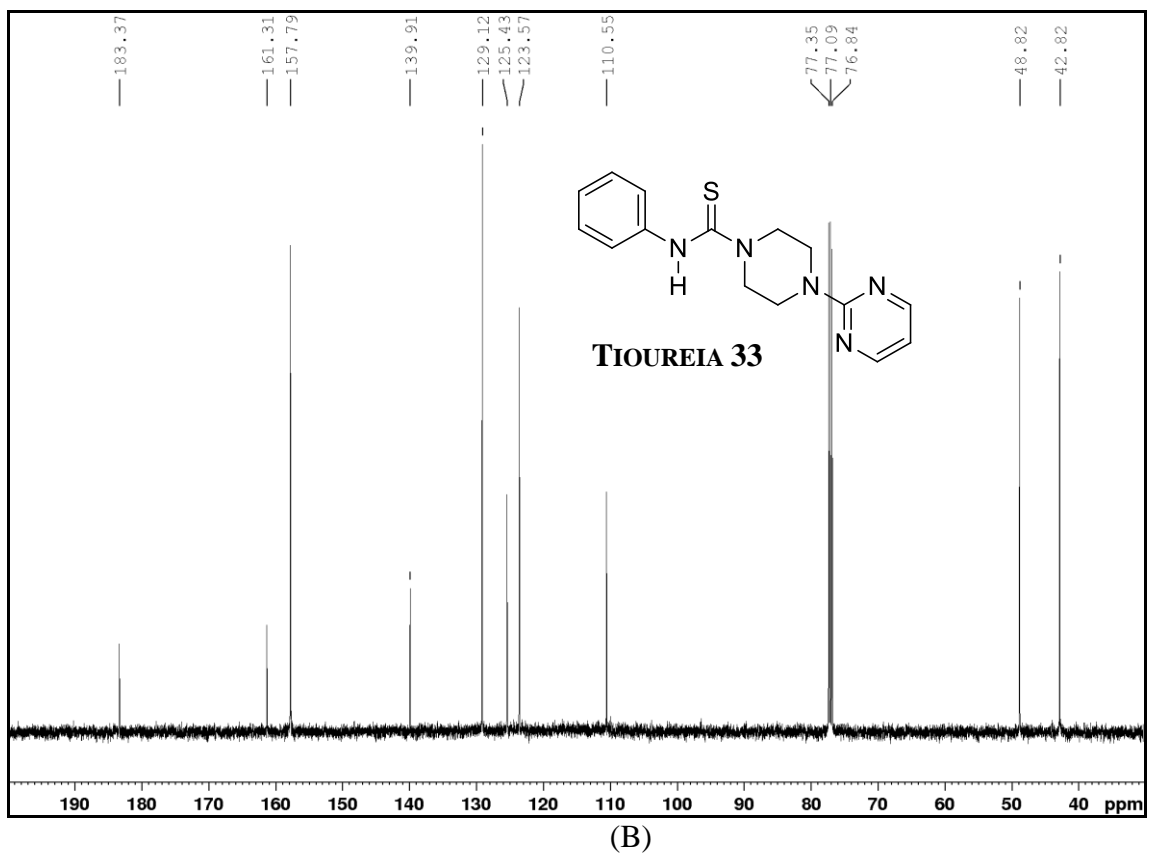
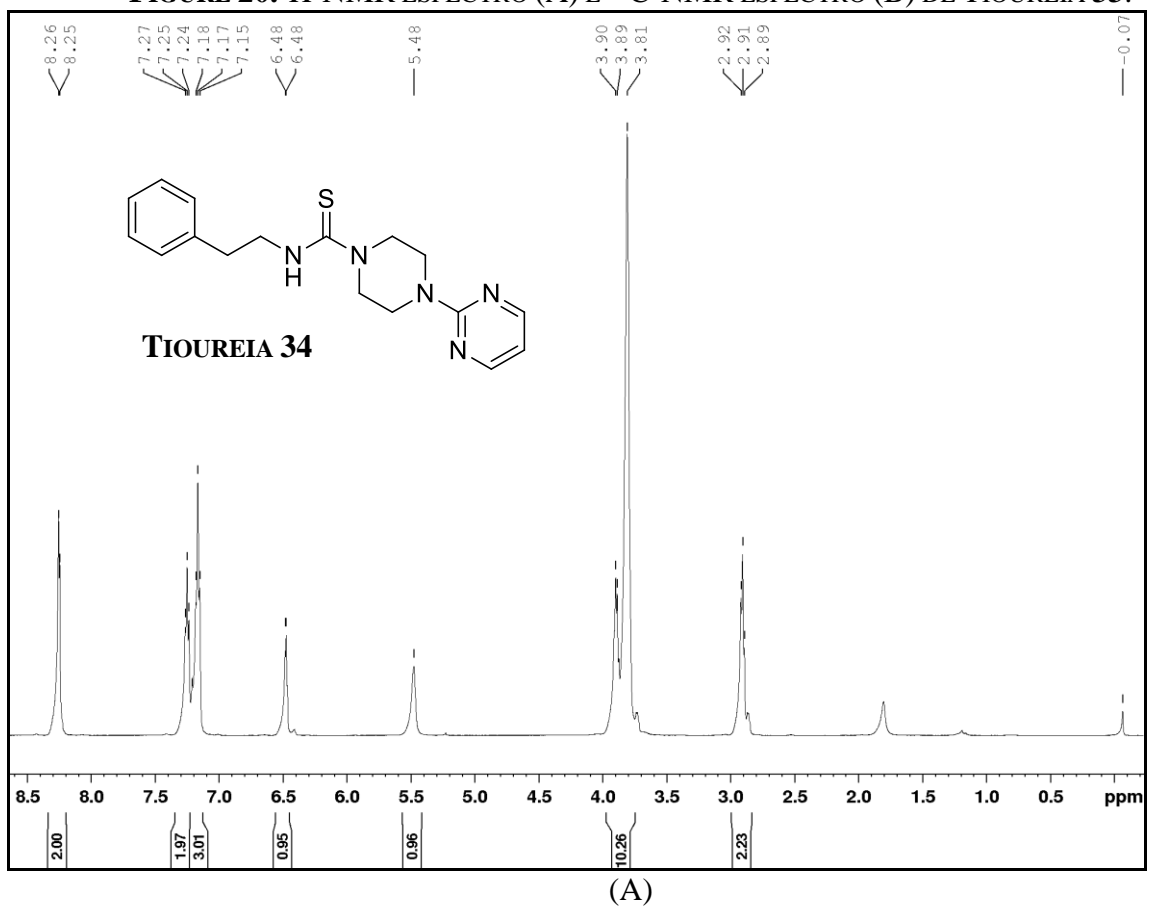
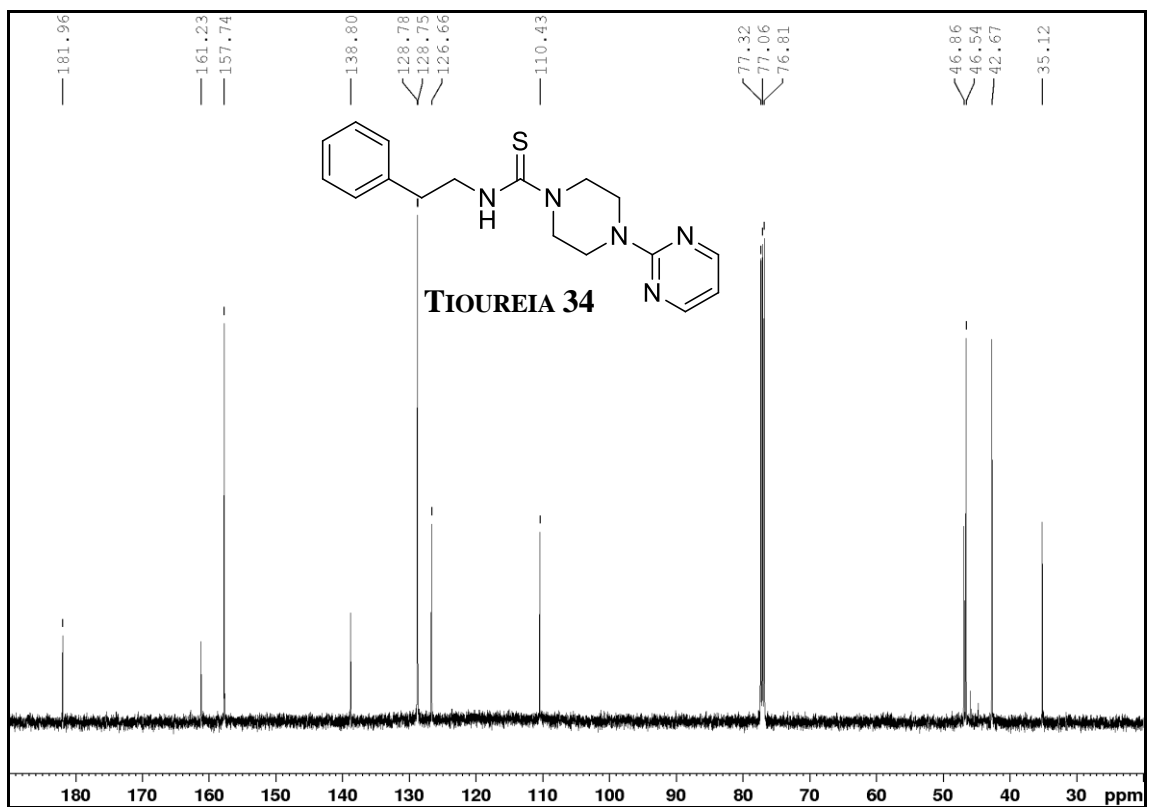


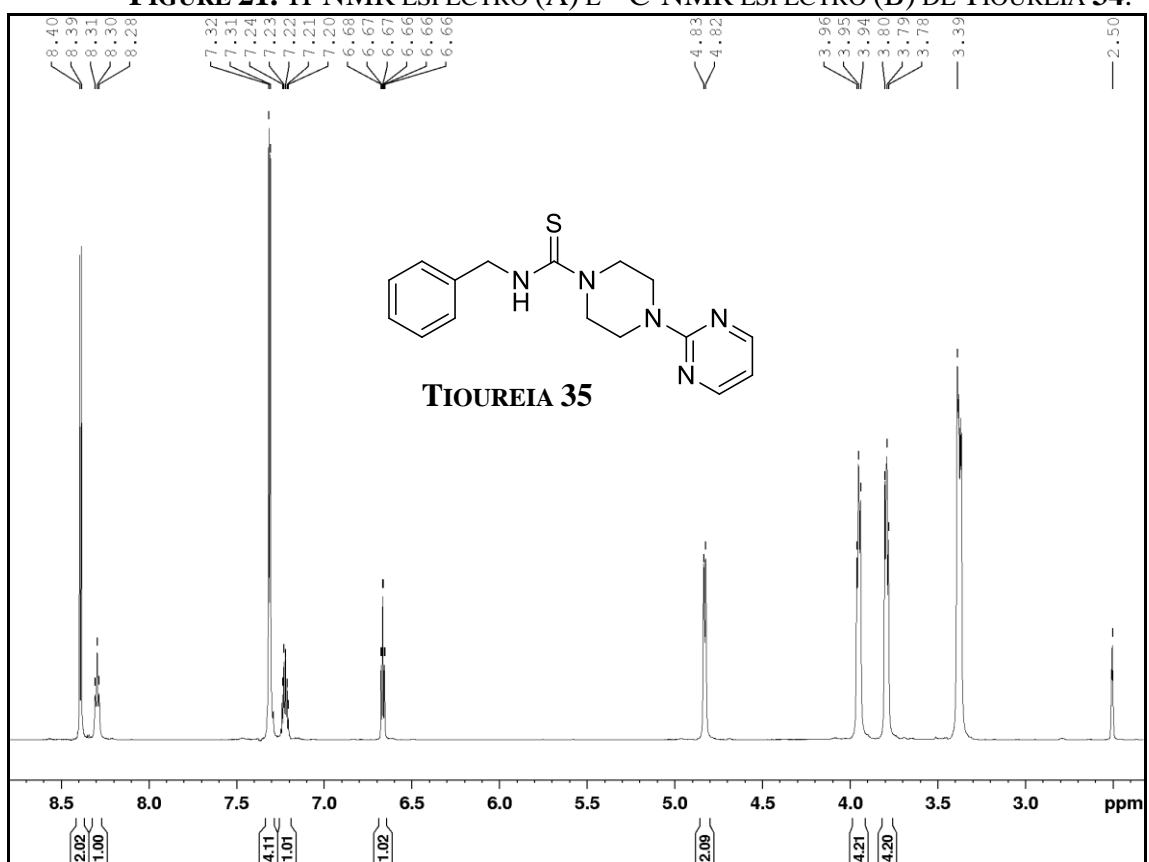
FIGURE 20. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 33.





(B)

FIGURE 21. $^1\text{H-NMR}$ ESPECTRO (A) E $^{13}\text{C-NMR}$ ESPECTRO (B) DE TIUREIA 34.



(A)

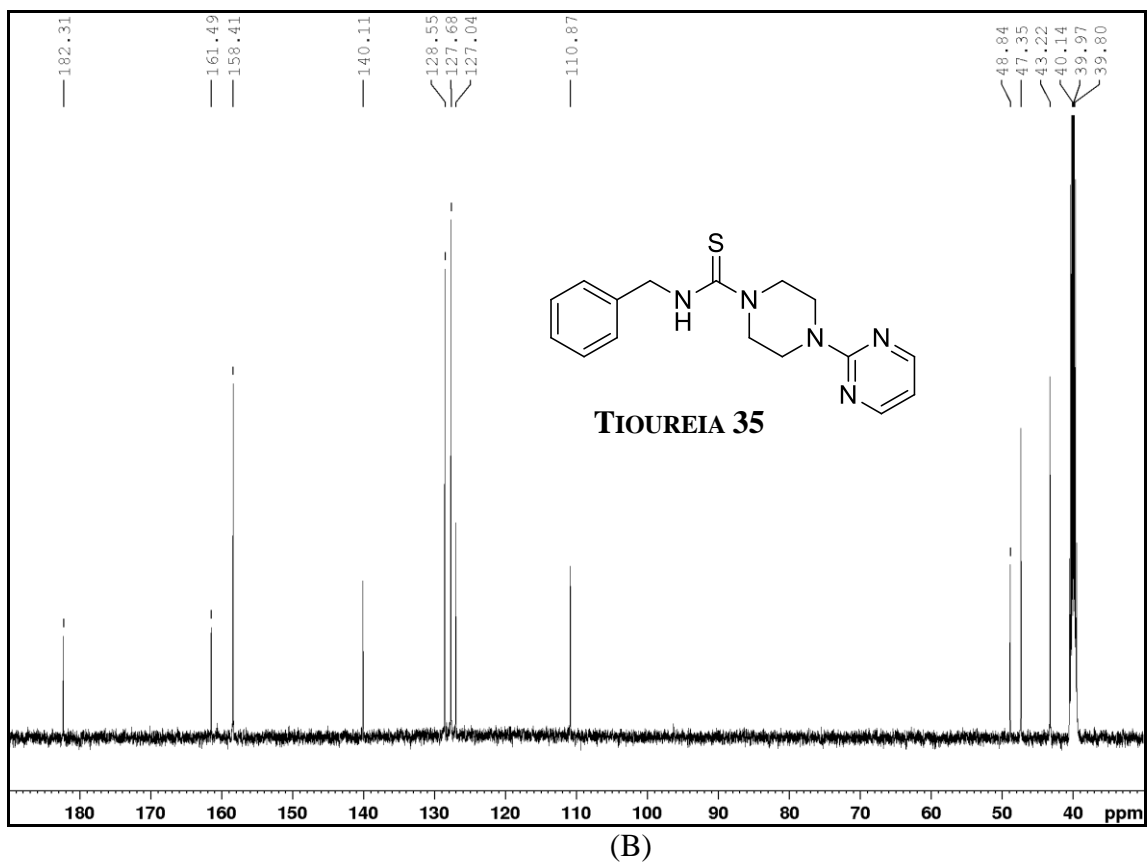
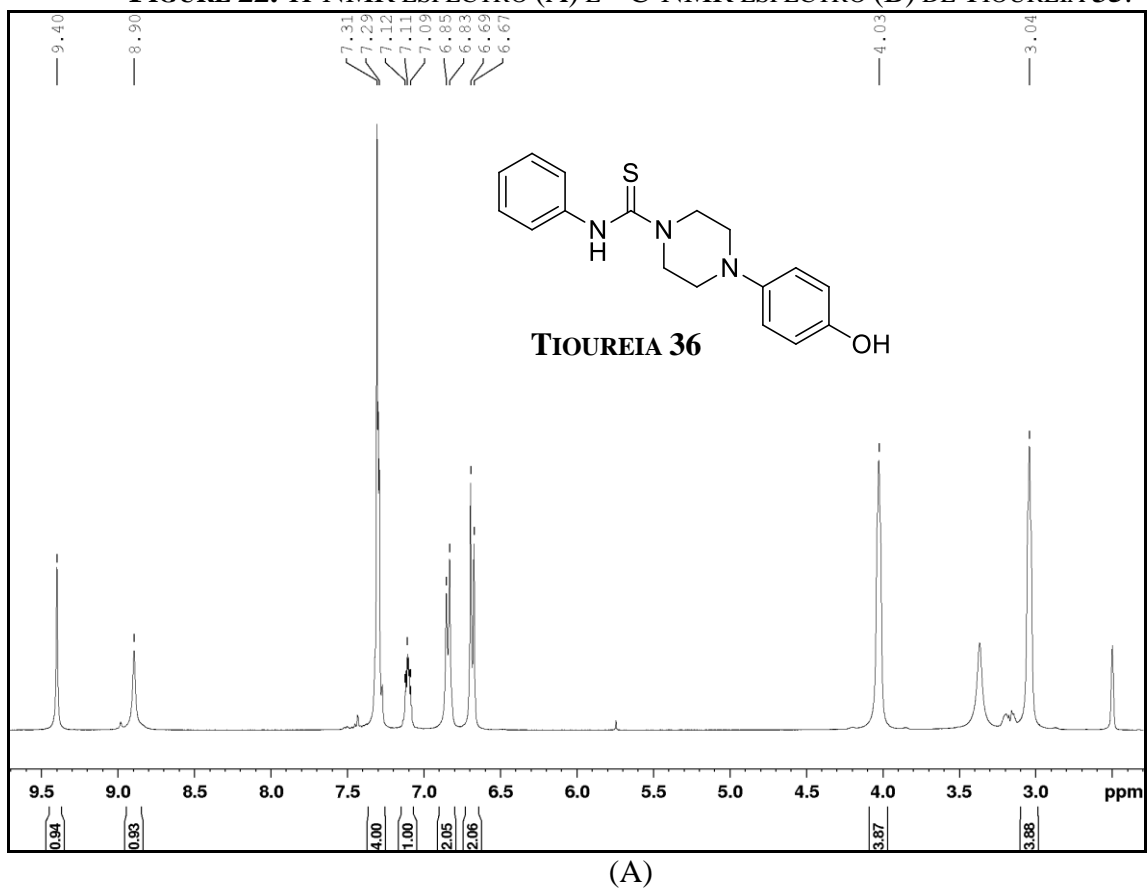


FIGURE 22. $^1\text{H-NMR}$ ESPECTRO (A) E $^{13}\text{C-NMR}$ ESPECTRO (B) DE TIOUREIA 35.



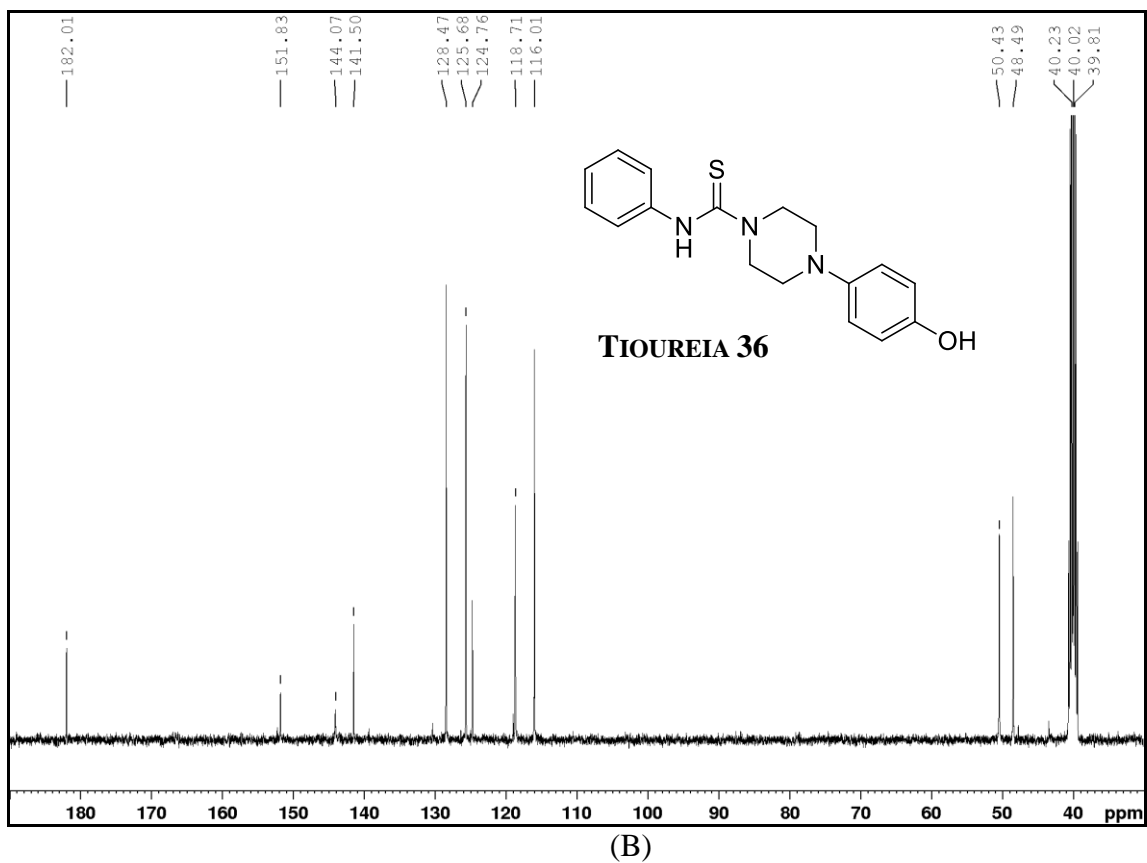
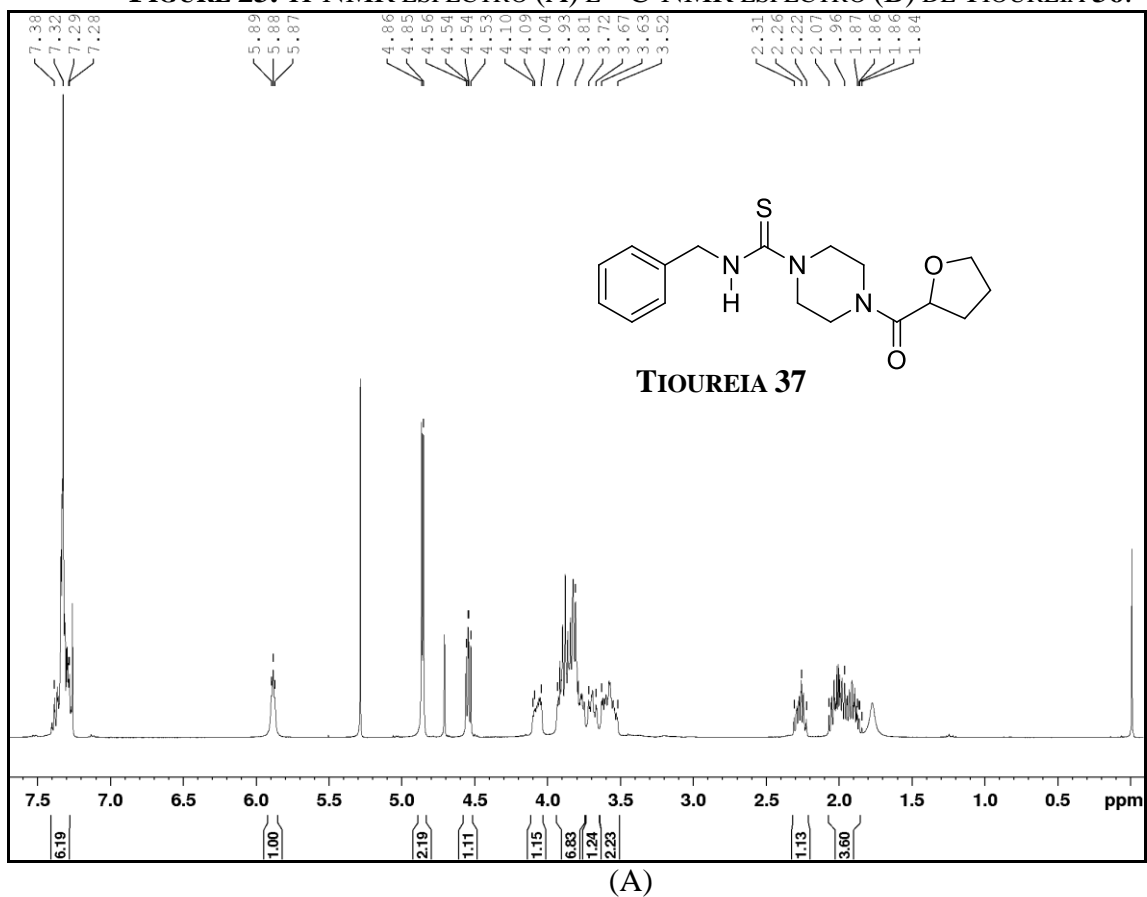


FIGURE 23. ^1H -NMR ESPECTRO (A) E ^{13}C -NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 36.



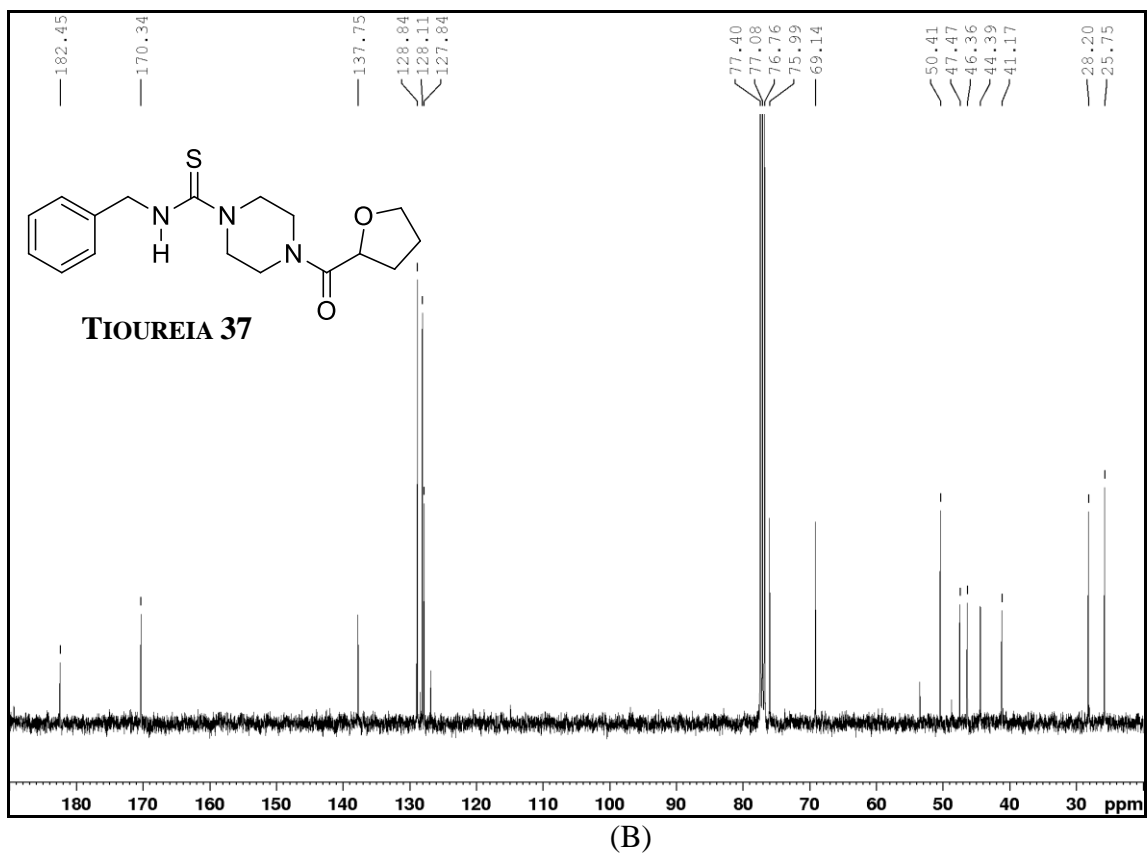
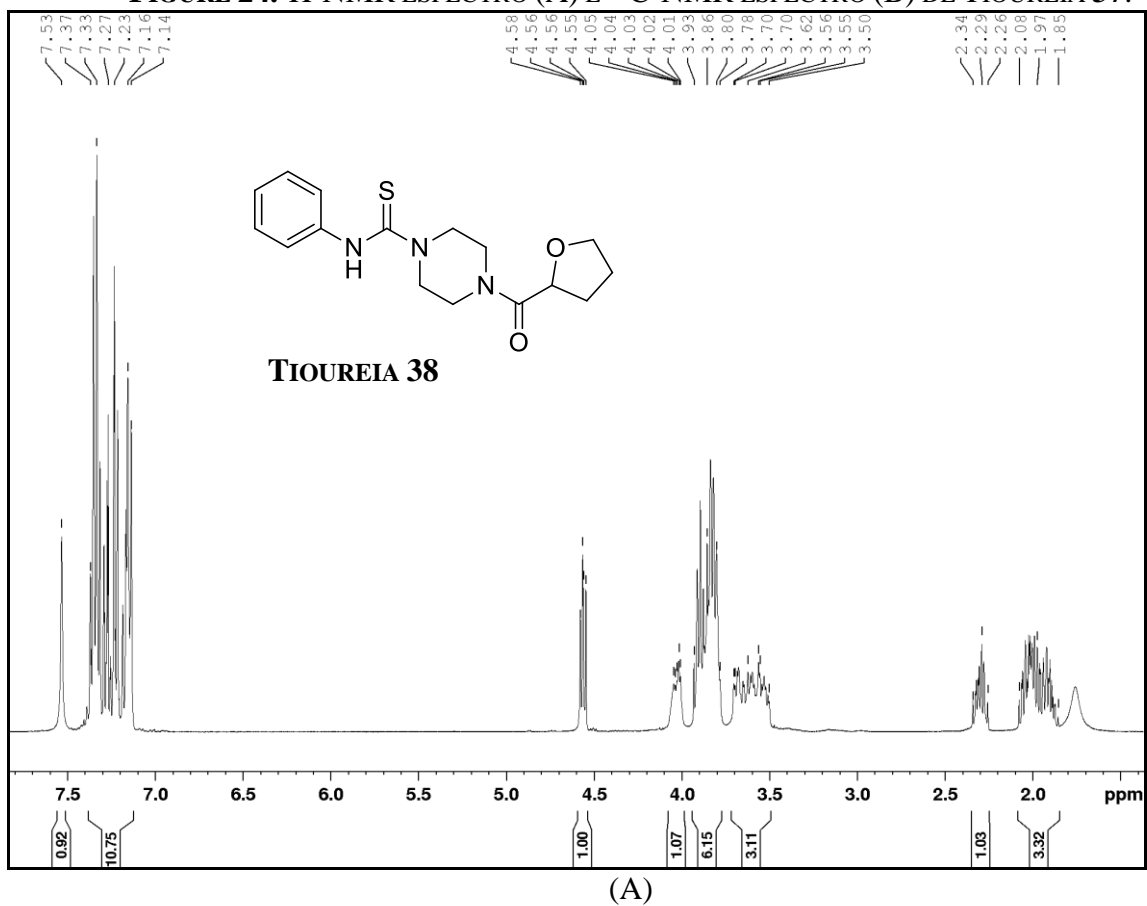


FIGURE 24. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIOUREIA 37.



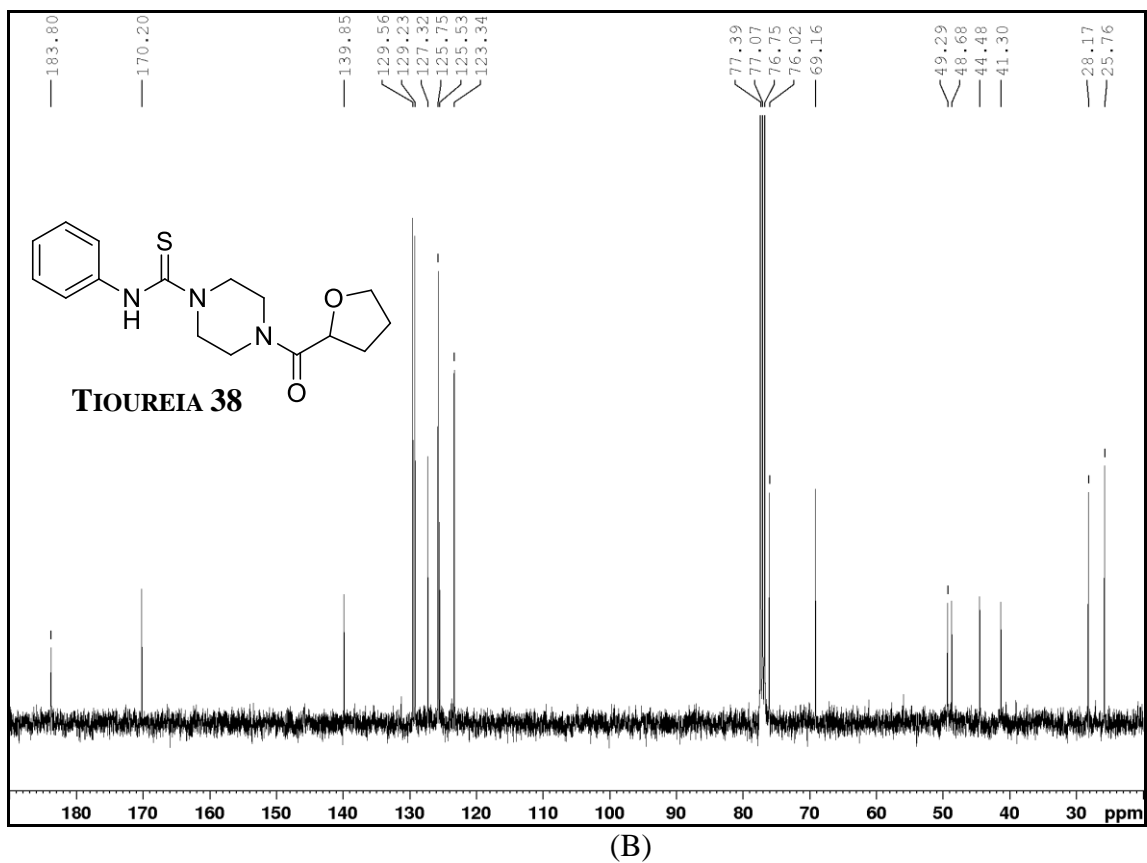
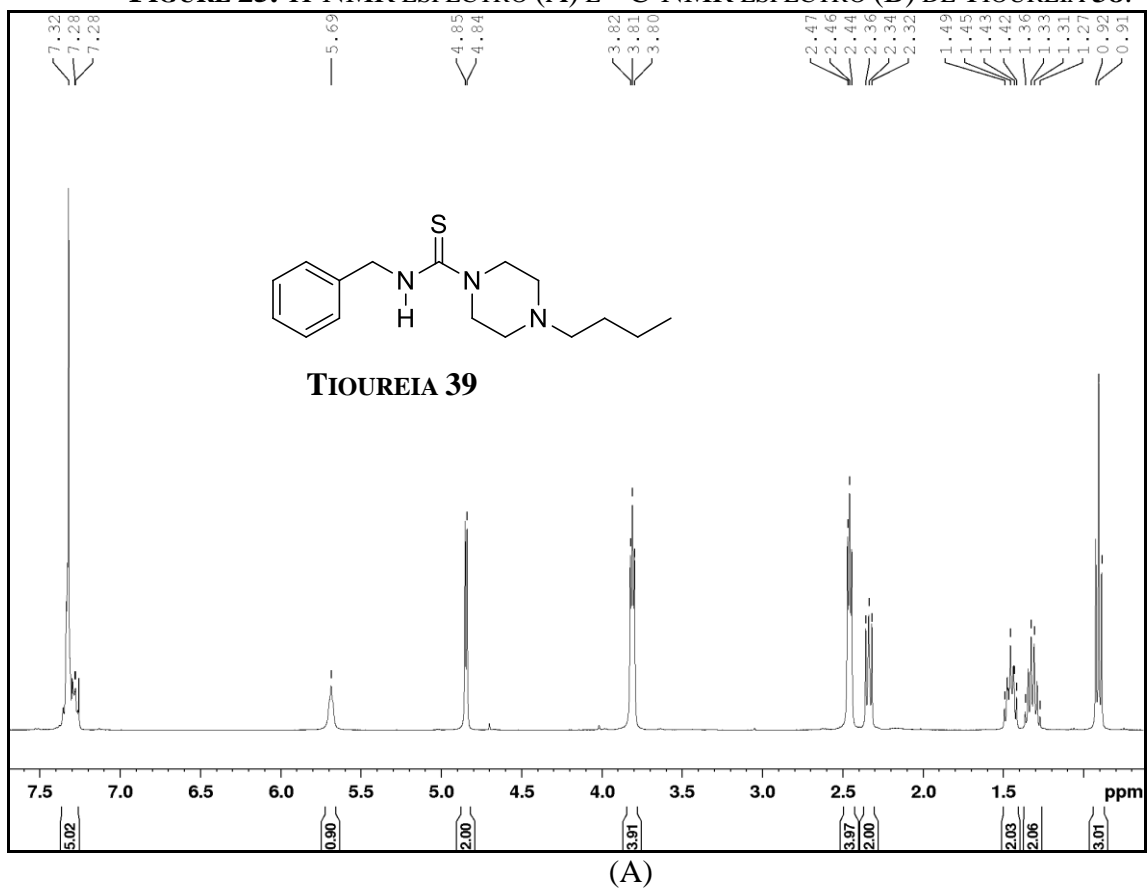


FIGURE 25. ^1H -NMR ESPECTRO (A) E ^{13}C -NMR ESPECTRO (B) DE TIOUREIA 38.



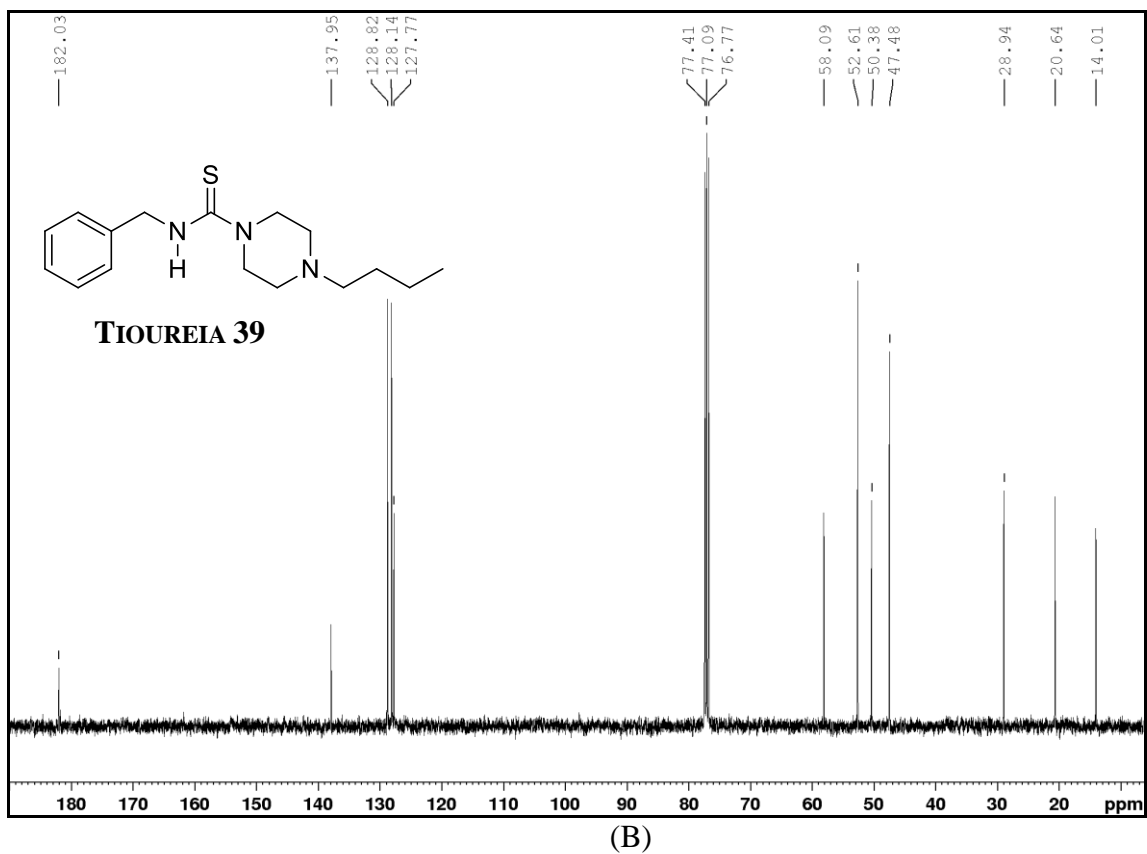
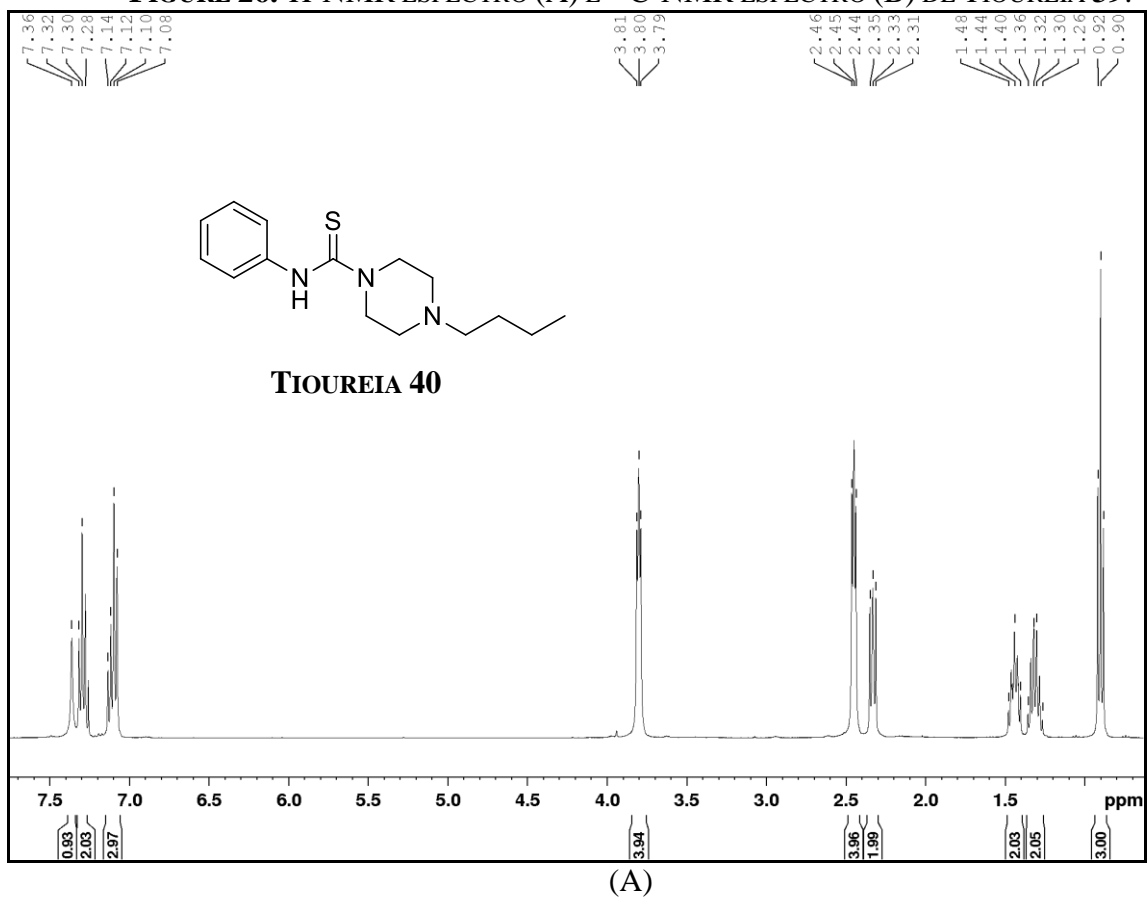


FIGURE 26. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIOUREIA 39.



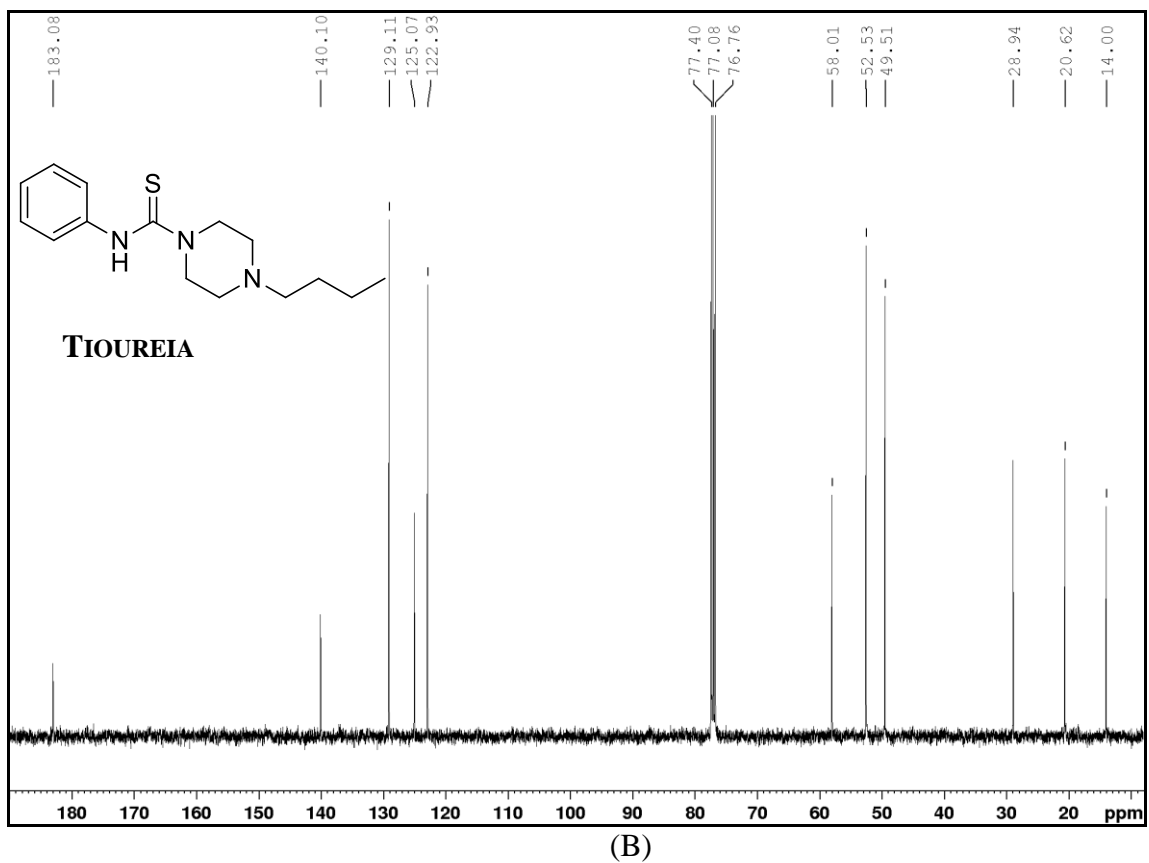
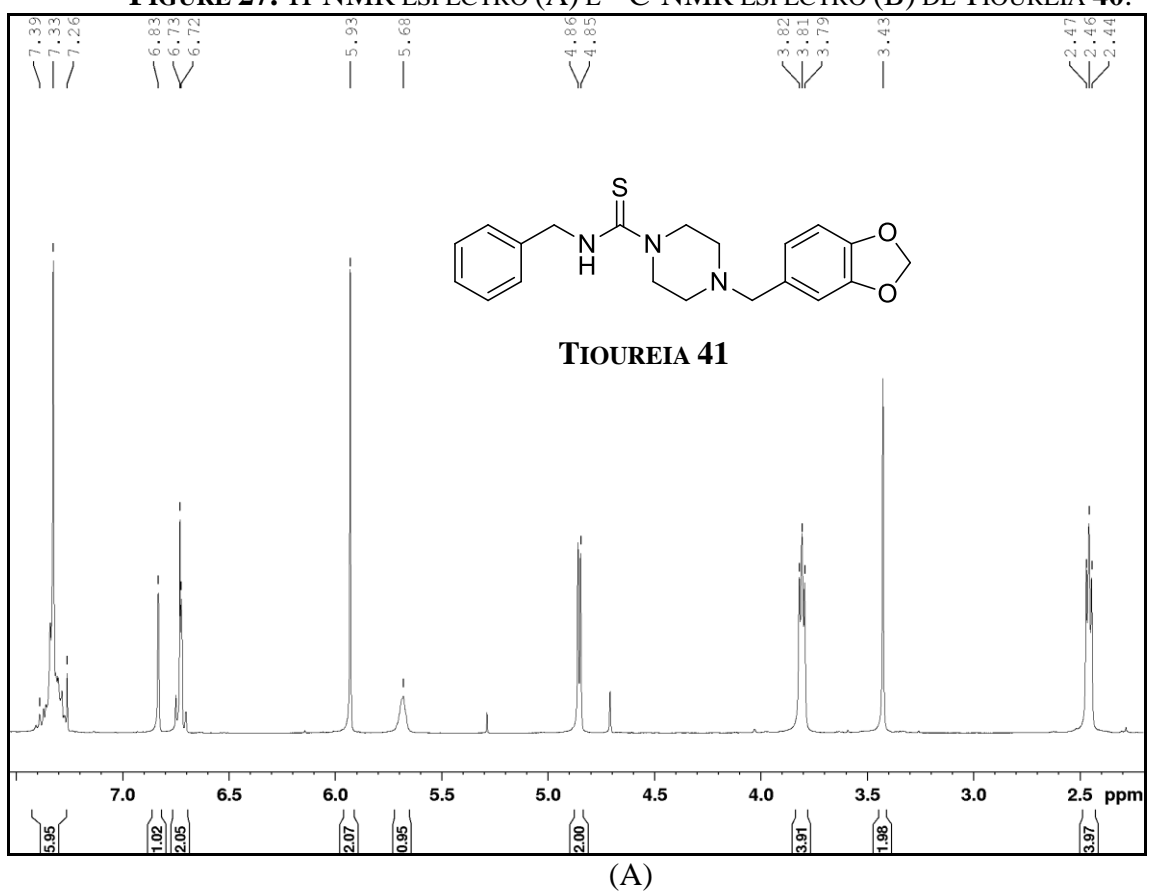
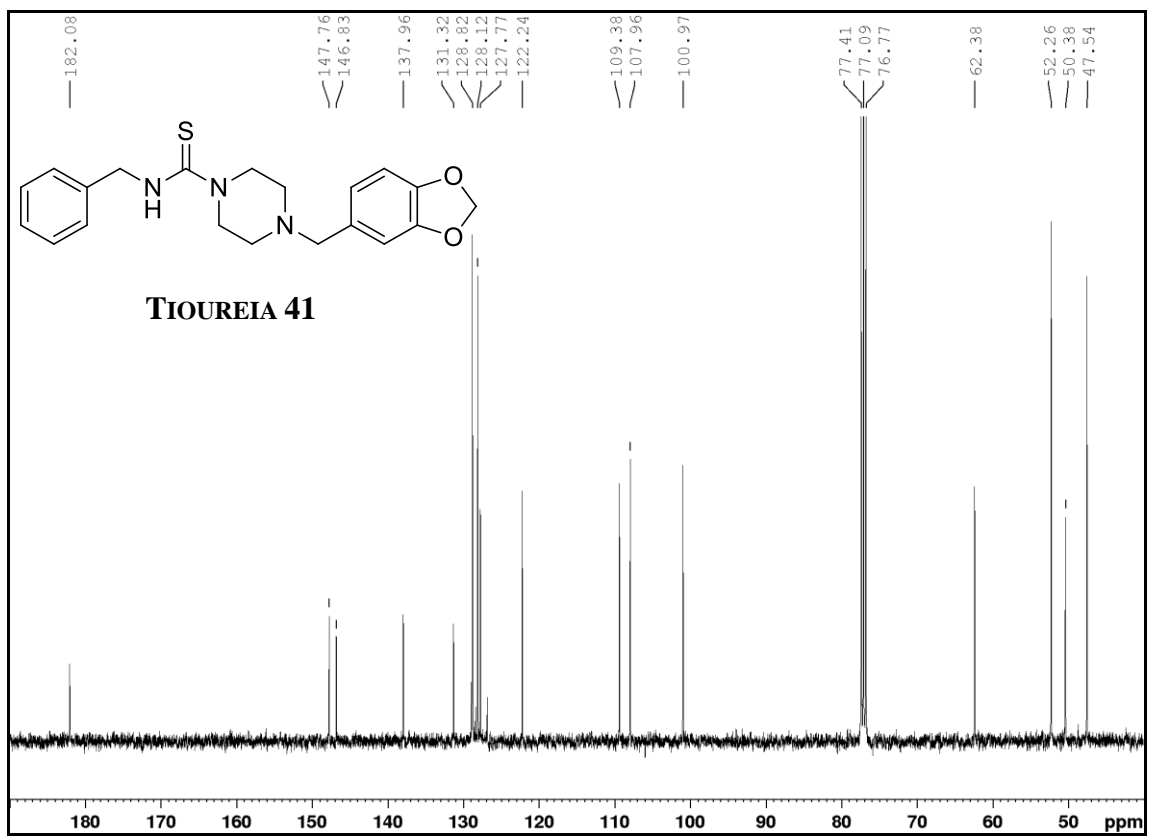


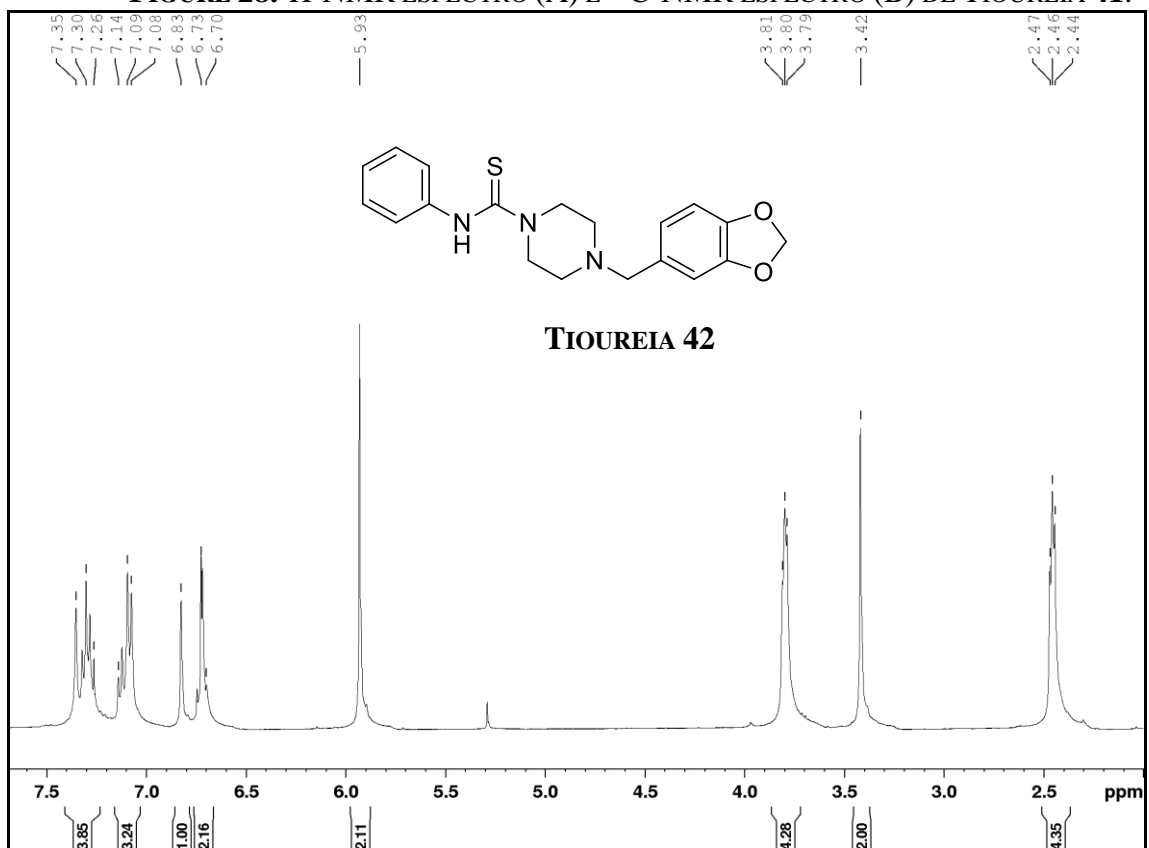
FIGURE 27. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 40.





(B)

FIGURE 28. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 41.



(A)

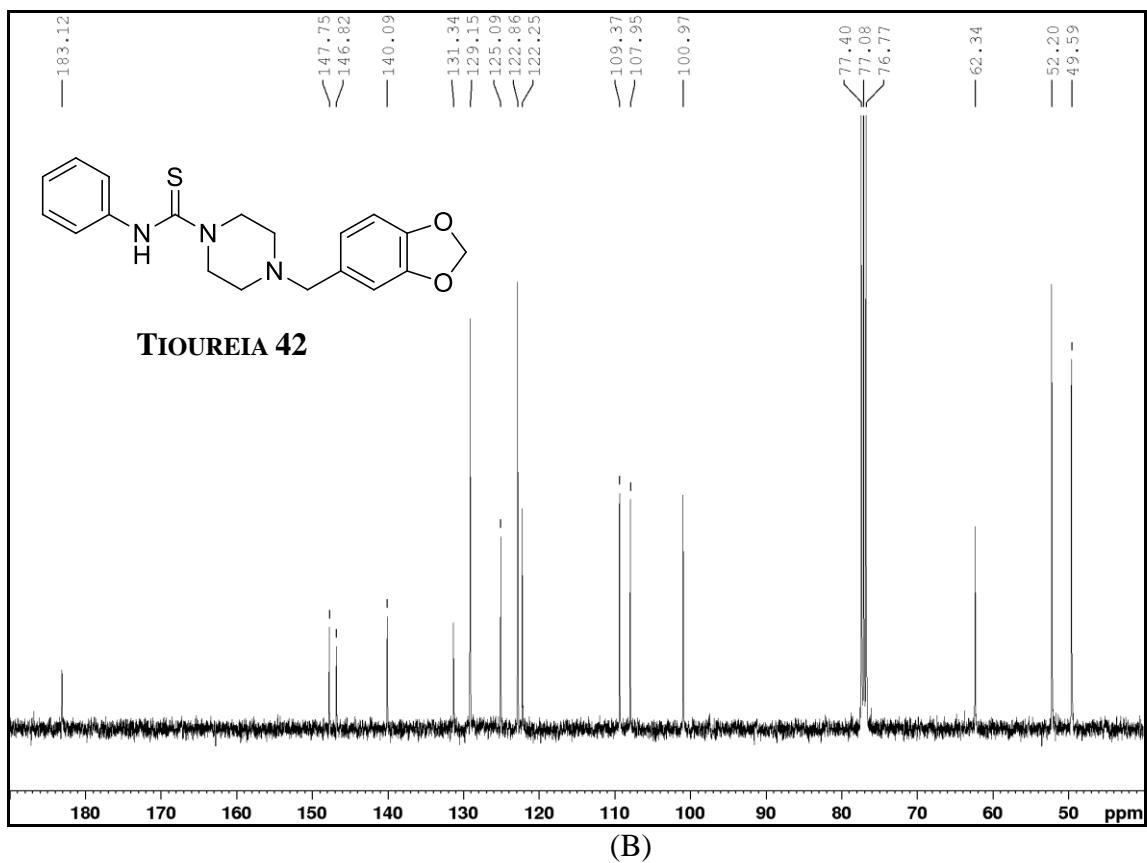
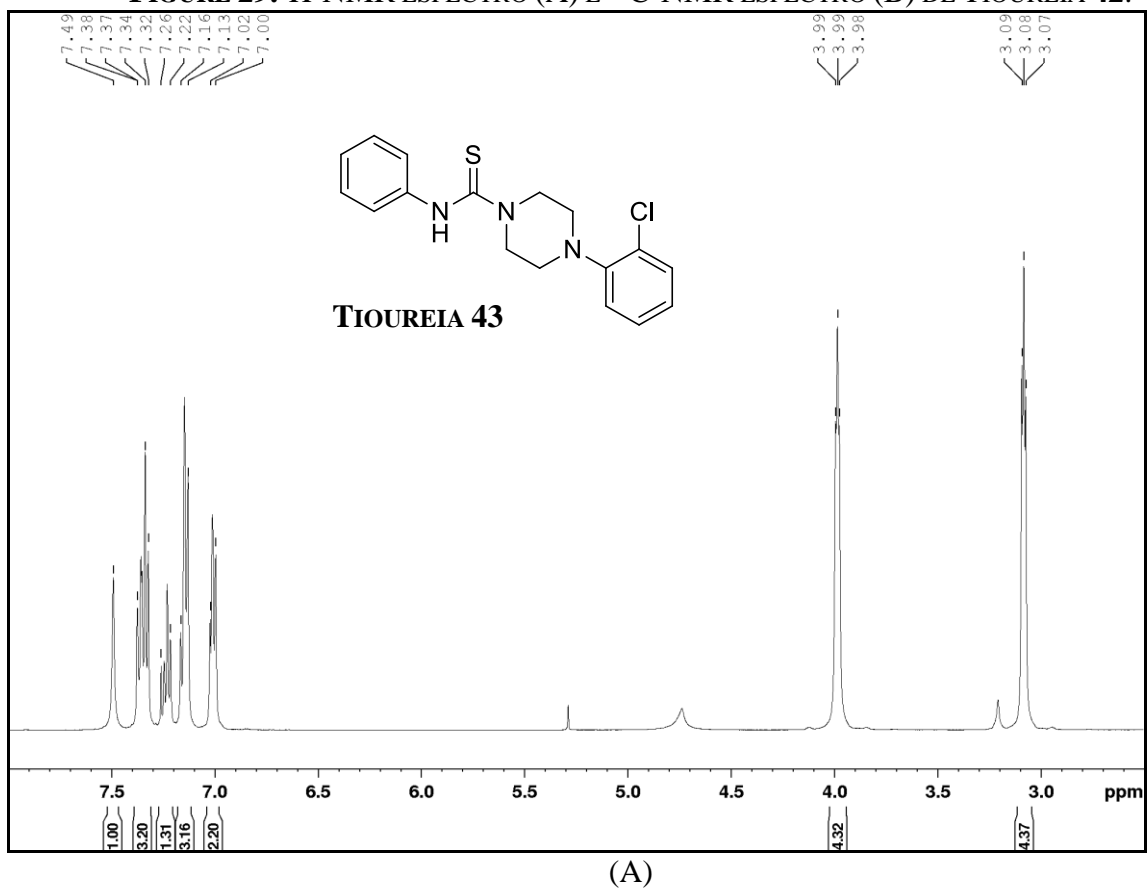
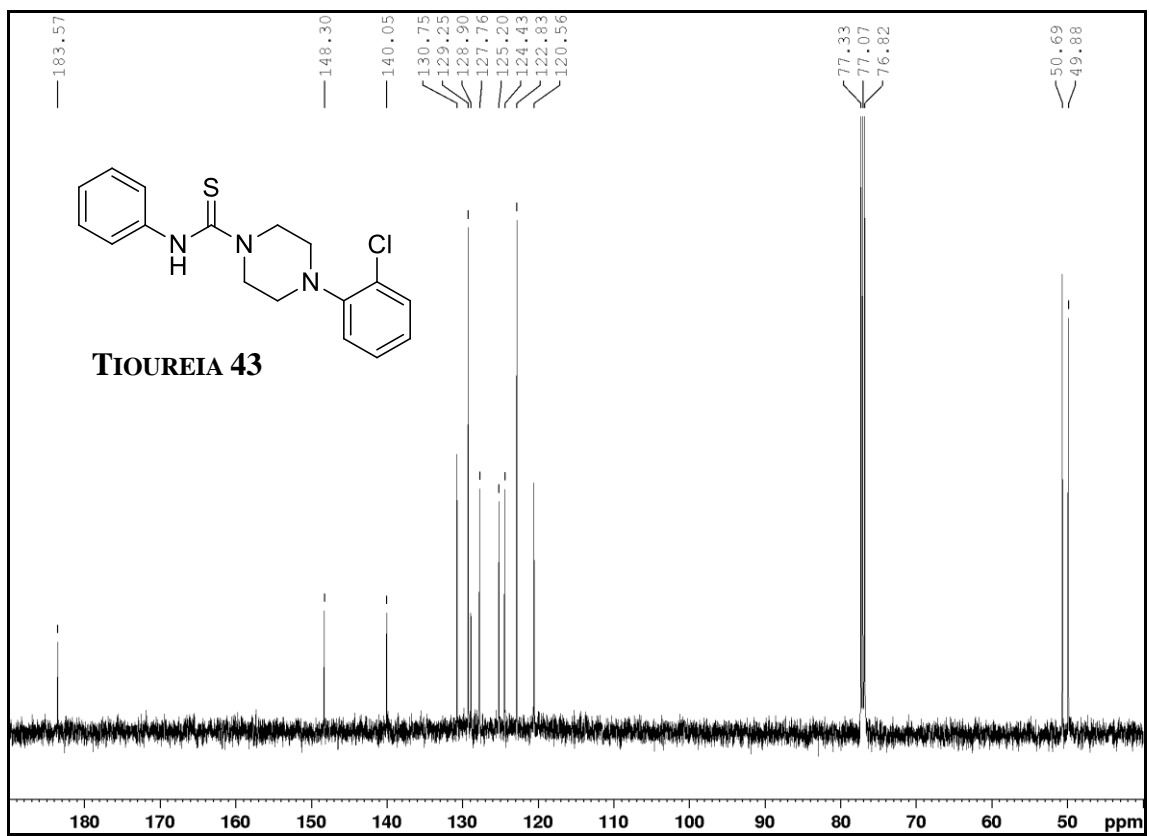


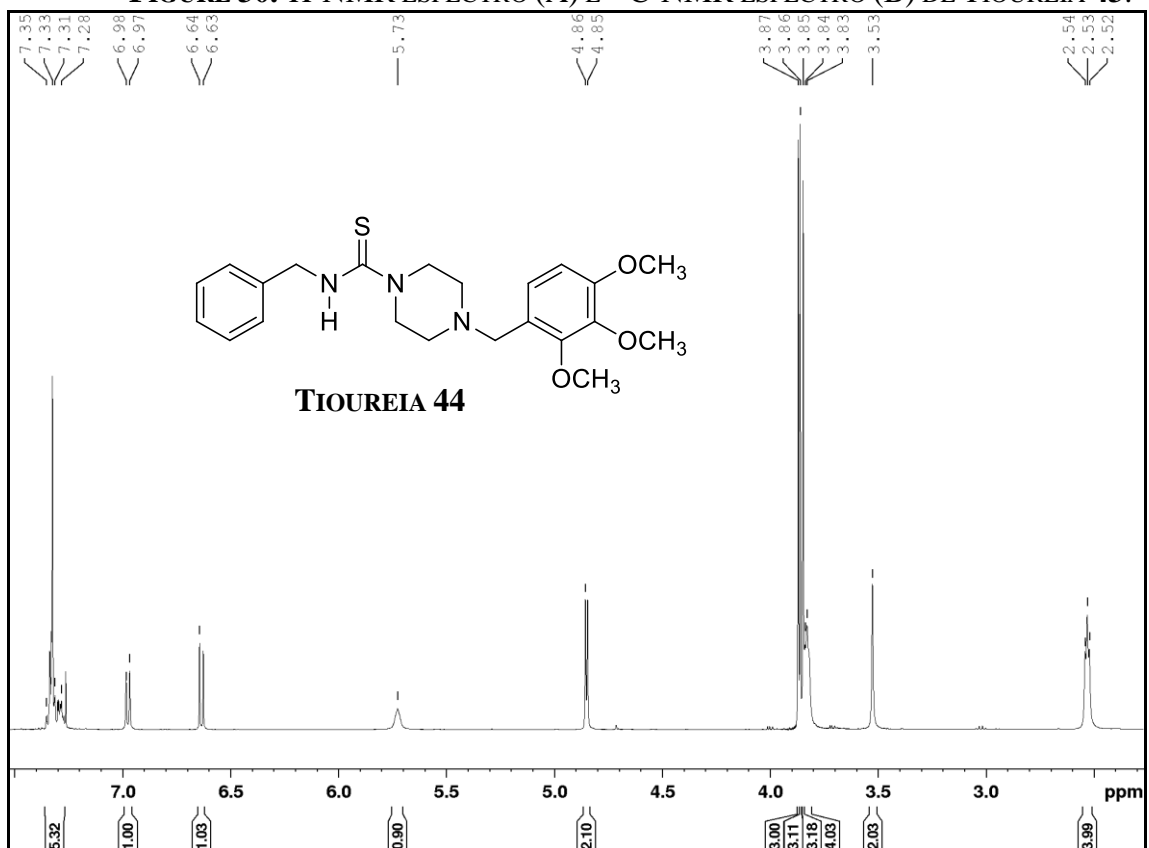
FIGURE 29. ^1H -NMR ESPECTRO (A) E ^{13}C -NMR ESPECTRO (B) DE TIOUREIA 42.





(B)

FIGURE 30. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 43.



(A)

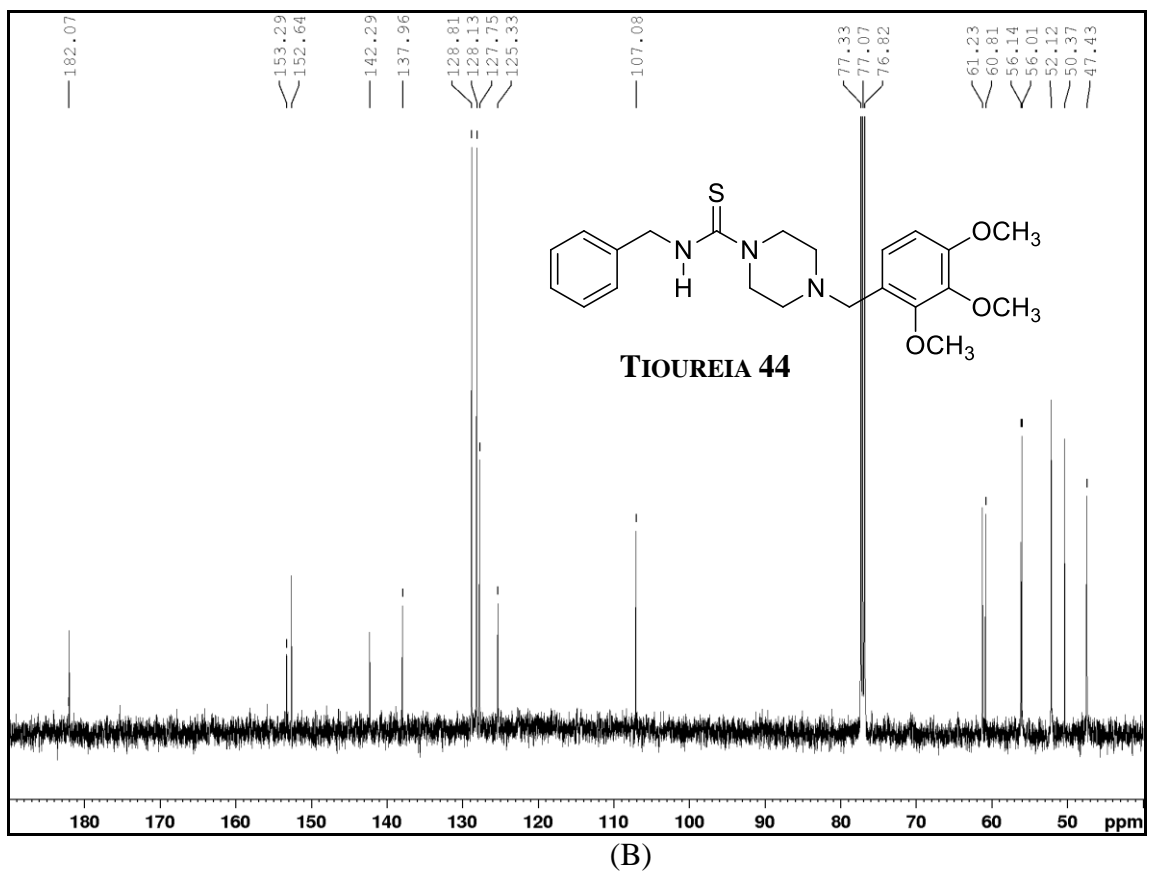
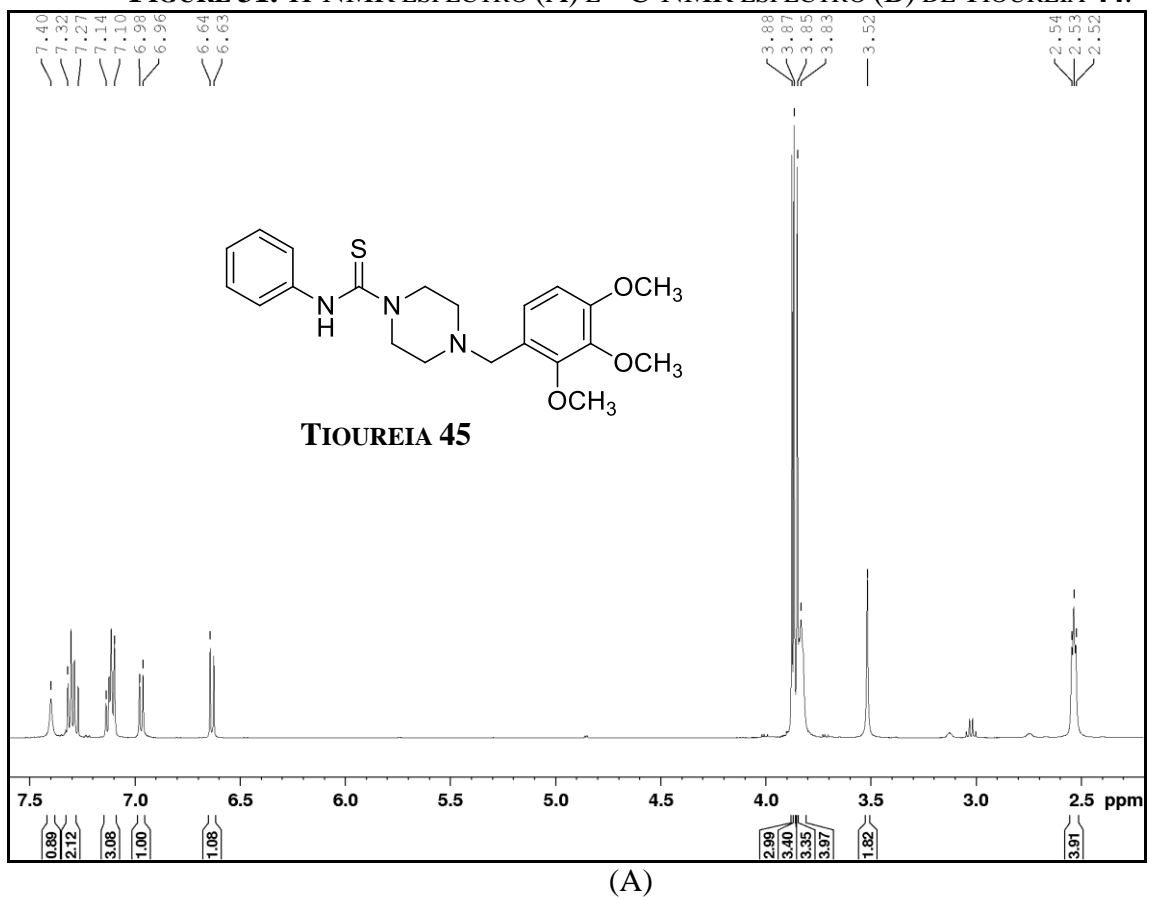
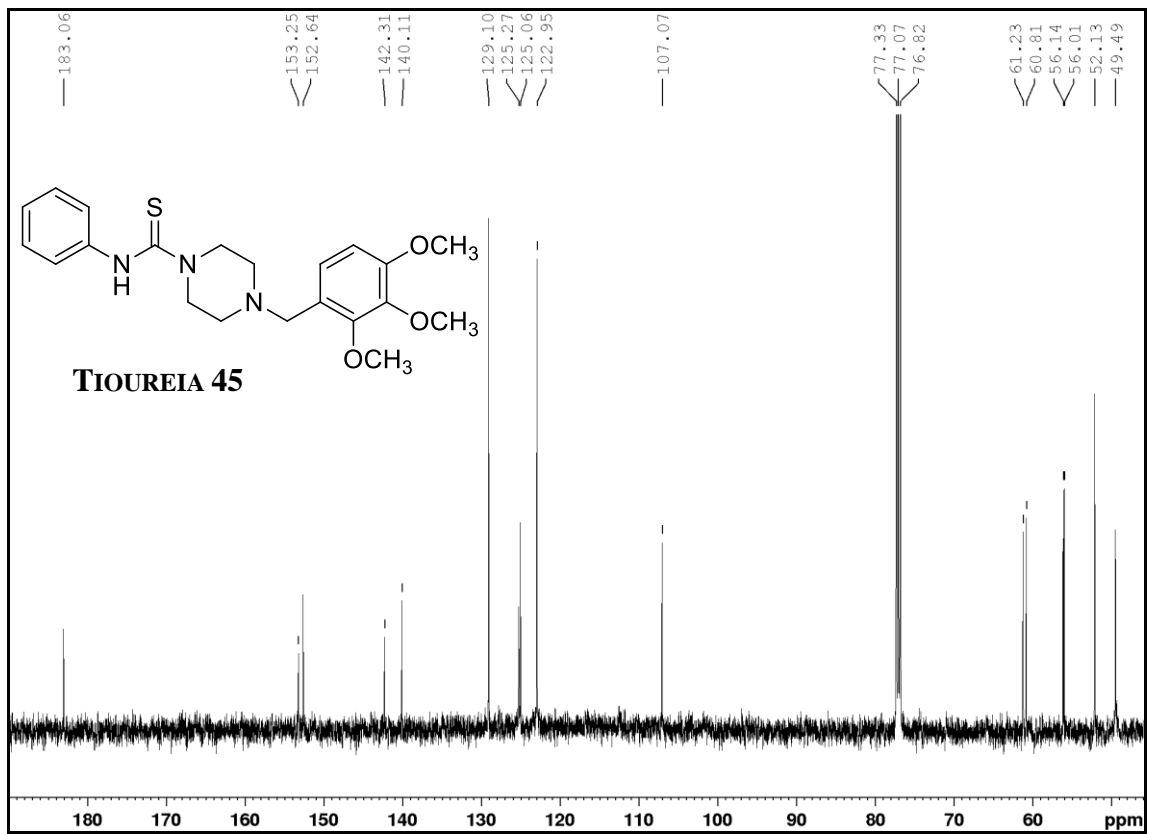


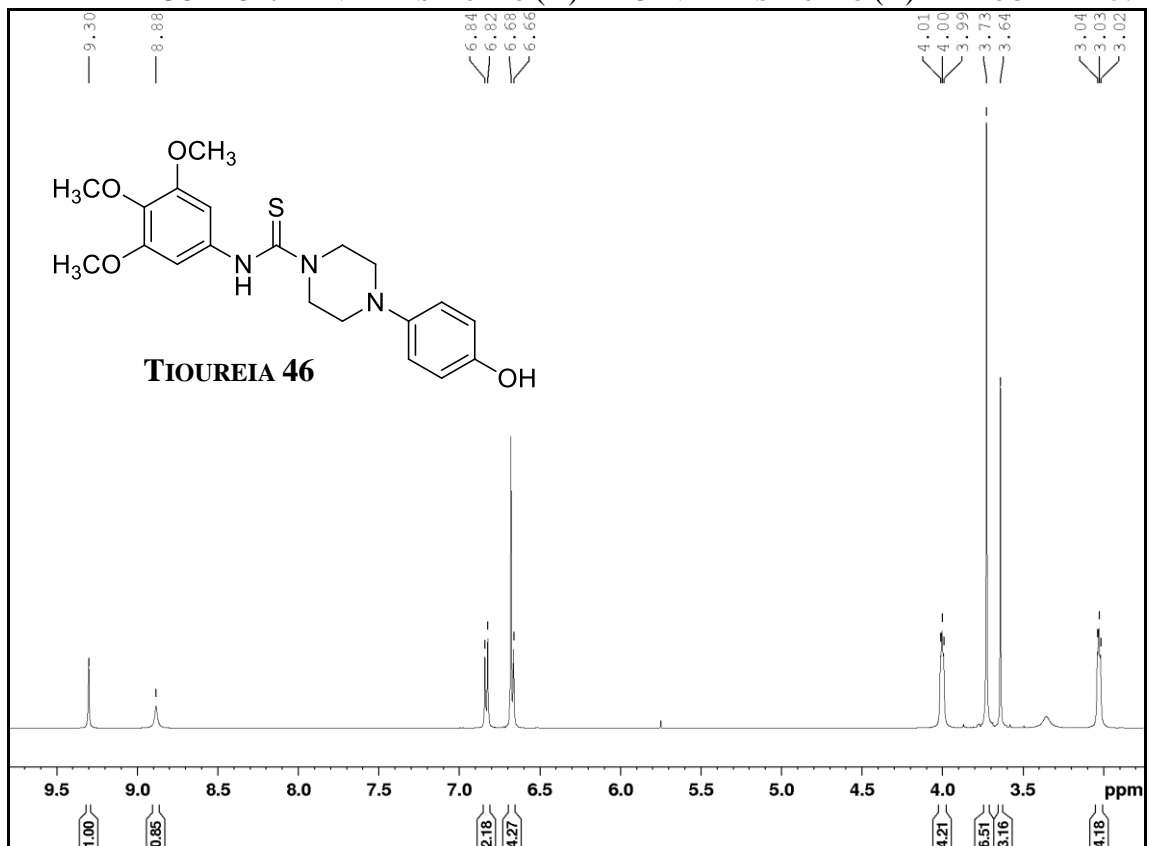
FIGURE 31. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 44.





(B)

FIGURE 32. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIUREIA 45.



(A)

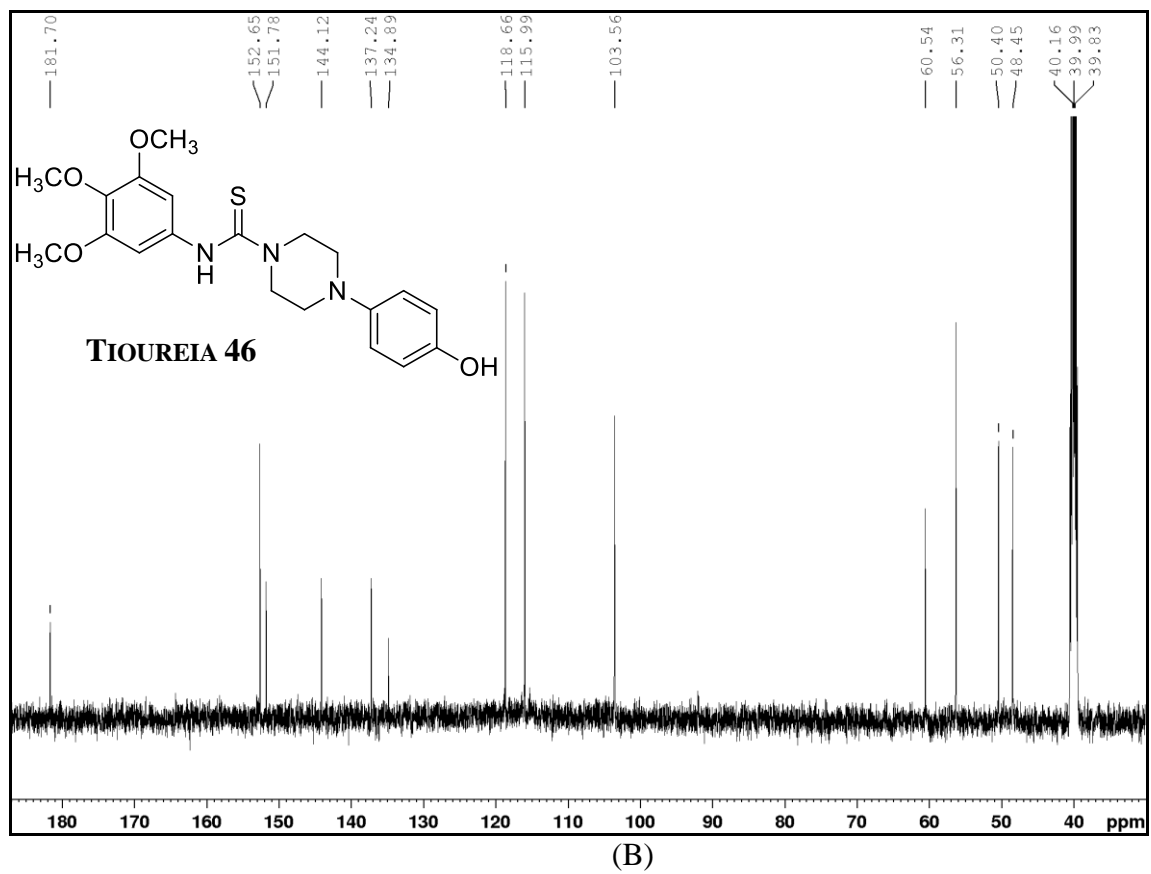


FIGURE 33. ¹H-NMR ESPECTRO (A) E ¹³C-NMR ESPECTRO (B) DE TIOUREIA 46.