

ESTUDO DE CHALCONAS SUBSTITUÍDAS COM POTENCIAL
AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIMICOBACTERIANA
CÓMO NOVA ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE

THATIANA LOPES BIÁ VENTURA SIMÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO/ UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES
JUNHO 2015

ESTUDO DE CHALCONAS SUBSTITUÍDAS COM POTENCIAL
AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIMICOBACTERIANA
CÓMO NOVA ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE

THATIANA LOPES BIÁ VENTURA SIMÃO

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
com ênfase em Biologia Celular.

CAMPOS DOS GOYTACAZES
JUNHO 2015

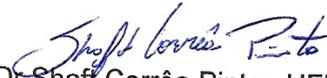
ESTUDO DE CHALCONAS SUBSTITUÍDAS COM POTENCIAL AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIMICOBACTERIANA CÓMO NOVA ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

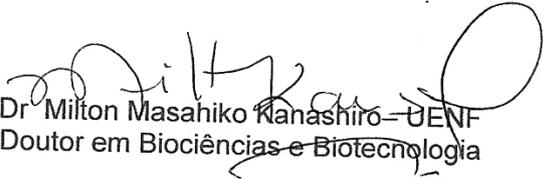
Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia com ênfase em Biologia Celular.

Aprovada em 9 de junho de 2015.

Comissão examinadora:


Dr^a Alba Lucinia Peixoto Rangel - UENF
Doutora em Biociências e Biotecnologia


Dr. Shafr Corrêa Pinto - UFRJ
Doutor em Química de Produtos Naturais


Dr. Milton Masahiko Nanashiro - UENF
Doutor em Biociências e Biotecnologia


Dr^a Elena Lassounskaia - UENF
Doutora em Ciências Médicas
CO-ORIENTADORA


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 co-
orientação da Profª Drª Elena Lassounskaia e orientação da Profª. Drª.
Michelle Muzitano.**

Apoio:

- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
- FAPERJ- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
- CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

“Devemos mergulhar num mundo desconhecido, para conhecermos nosso próprio mundo.” Delva Brito

Aprender um pouco mais do universo científico, me levou à uma grande jornada, conhecer muito mais de mim mesma. Espero que meu “diário de campo” seja esclarecedor... para mim com certeza foi.

Agradecimentos...

Sempre achei melhor escrever primeiro os agradecimentos como fonte de motivação durante a longa caminhada que é a escrita de um trabalho científico. Contudo, esta foi a parte mais difícil, talvez porque o encerramento deste ciclo tenha um significado misto, a alegria pelo dever cumprido e um certo vazio diante das lembranças e pessoas presentes nesta trajetória...

Agradeço a Deus, por ter me dado coragem para enfrentar os desafios do dia-a-dia, paciência e determinação. Por ter colocado em meu caminho pessoas que me inspiraram, ajudaram, desafiaram e me encorajaram a ser cada dia melhor. Por me lembrar sempre de todos os motivos que me trouxeram até aqui.

A UENF, por ter me acolhido, me transformado como pessoa, me proporcionado muitos amigos e todo o conhecimento obtido.

À minha orientadora, Michelle, pela amizade e todo conhecimento transmitido. Agradeço pela confiança em mim depositada, principalmente por me inserir num universo científico completamente novo, pelas palavras de motivação para sempre seguir em frente e o carinho com que sempre tratou seus alunos.

À Elena, minha co-orientadora, pela sua presença imprescindível durante todo este trabalho, e por ter me aceitado no seu grupo de pesquisa desde o 2º período de graduação, somando 10 anos de convivência. Obrigada por suas palavras de encorajamento e pelo tempo a mim dedicado.

Aos professores Dr. Milton, Dr. Shaft e Dr^a Alba por terem aceitado participar da minha banca de defesa e pelas contribuições valorosas para com este trabalho. Ao professor Dr. Francisco, pela revisão da tese.

Aos professores colaboradores, Dr^a Ivana Leal, Dr. Rodrigo de Souza, Dr^a Alessandra de Souza e Dr. Carlos Rangel, por terem acreditado nesta parceria e por toda contribuição científica para ampliação dos resultados obtidos.

As técnicas Rita e Juliana por todo auxílio durante estes 4 anos, não somente nos experimentos como também pela amizade.

A Verônica Lanes, minha querida Vevê, por toda ajuda técnica nos experimentos, por se preocupar com detalhes que parecem pequenos, mas são imensamente valiosos, visto a nossa rotina experimental longa e por nos acolher como filhos.

Ao Sanderson, por ter sido muito mais que um aluno de IC, um amigo para se contar em todos os momentos, muito responsável, espero ter conseguido transmitir o máximo da minha experiência para você e agradeço tudo o que aprendi contigo nestes anos de convivência.

Ao Marlon, um grande amigo e parceiro profissional, que mesmo a distância se fez muito presente, pela paciência e todos os bons conselhos: “Fica calma, Thati.....rs”

Aos meus amigos Elenetes: Fabrício, Andreza, Giliane, Simone, Marcelle, Letícia, Vinícius e Gislane, por todos os momentos de alegria, aprendizado, de paciência e suporte nos momentos de tristeza. Vocês não sabem o quanto sou grata pela amizade e como vou sentir falta de estar com vocês todos os dias. Muito Obrigado!

As minhas amigas Marina e Laura pelo apoio, encorajamento e pelos bons momentos de alegria que sempre nos reuniram.

Aos meus pais, Ricardo e Nadir, por terem me encorajado a seguir meus sonhos, mesmo sabendo que não estaríamos juntos todos os dias. Eu não tenho como agradecer tudo o que vocês fizeram por mim durante todos estes anos. Agradeço por toda dedicação, abdicação de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter uma boa formação profissional.

A minha irmã Cinthia, por entender as minhas faltas e momentos de reclusão. Por ser meu ombro amigo, por me alegrar, pelo carinho. Ao meu cunhado Pedro, pelo incentivo e encorajamento.

Ao meu marido Felipe, por de uma forma simples e sincera entender os meus sonhos e minhas ausências, por me tranquilizar e me manter firme. Por ter enfrentado muitas situações difíceis com o dobro da coragem para que pudéssemos superar.

A minha madrinha Diléia e avó Alidéia, por estarem sempre presentes durante a minha vida e pelo seu apoio em todos os momentos.

Ao Artur, uma criança maravilhosa, pelas alegrias e bons momentos de descontração.

Aos meus sogros, Dirlei e Rosilene e aos meus cunhados Aline e Lucas pelas orações a mim destinadas durante minha formação acadêmica. Obrigado pelas palavras.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de Pós-graduação.

SUMÁRIO

SUMÁRIO DE FIGURAS.....	xi
SUMÁRIO DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A tuberculose.....	1
1.2. O micro-organismo.....	2
1.3. Resposta imune e imunopatogenia da TB.....	5
1.4. Tratamento atual da TB e desenvolvimento de novos fármacos.....	11
1.4.1. Tratamento adjuvante direcionado à inflamação.....	18
1.5. Produtos naturais no tratamento da TB.....	21
1.6. A classe das chalconas e seu potencial anti-TB.....	25
1.7. Chalconas anti-inflamatórias e promissoras contribuições para o tratamento adjuvante da TB.....	29
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1. Síntese e caracterização das chalconas e preparação de uso.....	36
4.2. Cultivo celular.....	36
4.2.1. Quantificação de citocinas e mediadores inflamatórios.....	38
4.2.2. Avaliação da morte celular em macrófagos (método do LDH e do MTT).	39
4.3. Avaliação da atividade antioxidante (método do DPPH e do SNP).....	39
4.4. Avaliação do potencial de inibição da expressão enzimática da iNOS e COX-2.....	41
4.5. Obtenção e preparo do cultivo micobacteriano.....	42

4.5.1.	Avaliação da atividade antimicobacteriana.....	43
4.6.	Infecção de cultura de macrófagos e quantificação do crescimento micobacteriano intracelular.....	43
4.7.	Avaliação do potencial inibitório da associação das chalconas mais ativas ao fármaco rifampicina.....	44
4.8.	Avaliação da capacidade inibitória das chalconas mais ativas na viabilidade de bactérias extracelulares agregadas em <i>clumps</i>	44
4.9.	Infecção experimental dos camundongos.....	45
4.9.1.	Tratamentos e grupos experimentais.....	46
4.9.2.	Obtenção de células pulmonares e dos bacilos.....	47
4.9.3.	Análise macroscópica e histopatológica do pulmão, baço e fígado.....	48
4.9.3.1.	Método de coloração com Hematoxilina-Eosina (H&E).....	48
4.9.3.2.	Método de Ziehl-Neelsen.....	49
4.9.3.3.	Análise morfométrica do tecido pulmonar.....	49
4.10.	Análise fenotípica do infiltrado celular pulmonar.....	50
4.11.	Análise estatística.....	50
5.	RESULTADOS.....	51
5.1.	<i>Screening</i> das chalconas quanto à capacidade de inibição da produção de NO e TNF- α , citotoxicidade e quanto à inibição do crescimento de <i>M. bovis</i> BCG.....	51
5.2.	Avaliação das chalconas quanto à inibição da produção de NO e citotoxicidade em macrófagos alveolares MH-S estimulados por lisado de <i>M. bovis</i> BCG.....	55
5.3.	Avaliação das chalconas quanto à inibição da produção dos mediadores inflamatórios IL-1 β e PGE ₂ em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.....	58
5.4.	Análise da atividade antioxidante das chalconas pelo método do SNP e do DPPH.....	61
5.5.	Avaliação do potencial das chalconas mais ativas na modulação da expressão enzimática da iNOS e COX-2 em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.....	65
5.6.	Avaliação das chalconas mais ativas na inibição do crescimento de cepas Mtb de diferentes níveis de virulência em cultura bacteriana.....	67
5.7.	Avaliação do efeito das chalconas mais ativas em cultura de macrófago RAW 264.7 infectado por <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	71
5.8.	Avaliação do efeito das chalconas mais ativas em associação ao fármaco rifampicina na viabilidade da cepa <i>M. tuberculosis</i> hipervirulenta.....	73
5.9.	Avaliação do efeito das chalconas mais ativas na viabilidade de bactérias extracelulares agregadas em <i>clumps</i>	75

5.10. Avaliação do efeito da chalcona 5 no crescimento bacteriano nos pulmões de camundongos infectados.....	78
5.11. Avaliação do efeito da chalcona 5 na patologia dos pulmões de camundongos infectados.....	81
5.12. Análise fenotípica das células inflamatórias nos pulmões dos camundongos infectados sob efeito do tratamento com a chalcona 5	90
5.13. Análise do perfil de citocinas produzidas <i>ex vivo</i> pelas células dos pulmões dos camundongos infectados sob efeito do tratamento com a chalcona 5	93
6. DISCUSSÃO.....	95
7. CONCLUSÕES.....	105
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
9. ANEXO.....	115

SUMÁRIO DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1.	Esquema simplificado da parede celular micobacteriana e estrutura química dos principais ácidos micólicos de <i>M. tuberculosis</i>	4
Figura 2.	Infecção pelo <i>M. tuberculosis</i> e desenvolvimento da resposta imune inata.....	6
Figura 3.	Resposta imune e patogênese da tuberculose.....	8
Figura 4.	Estrutura química dos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento convencional da tuberculose.....	11
Figura 5.	Estrutura química dos fármacos do grupo 2 utilizados no tratamento da tuberculose.....	13
Figura 6.	Estrutura química dos fármacos do grupo 3 e 4 utilizados no tratamento da tuberculose.....	13
Figura 7.	Estrutura química dos fármacos do grupo 5 utilizados no tratamento da tuberculose.....	14
Figura 8.	Estrutura química do fármaco anti-TB rifabutina.....	14
Figura 9.	Estrutura química do fármaco anti-TB bedaquilina.....	16
Figura 10.	Estrutura química dos glicocorticoides dexametasona e prednisolona.....	19
Figura 11.	Estrutura química dos AINEs aspirina e ibuprofeno.....	20
Figura 12.	Estrutura química do inibidor de fosfodiesterase-4, CC-3052 e do fármaco antileprótico talidomida.....	21
Figura 13.	Estrutura química da piridomicina.....	22
Figura 14.	Estrutura química de substâncias naturais com atividade antimicobacteriana.....	23
Figura 15.	Estrutura química de substâncias naturais com atividade antimicobacteriana.....	24
Figura 16.	Rota biossintética comum dos flavonoides.....	25
Figura 17.	Estrutura básica das chalconas.....	26
Figura 18.	Estrutura química da buteína.....	27
Figura 19.	Estrutura química das chalconas acetilênicas com atividade antimicobacteriana.....	27
Figura 20.	Estrutura química das quinolinachalconas com atividade antimicobacteriana.....	28

Figura 21.	Estrutura química da substância 2'',4''-difluorobenziloxi- 4-imidazolil-chalcona com atividade antimicobacterina <i>in vivo</i>	29
Figura 22.	Estrutura química da 3'-isopropoxichalcona.....	30
Figura 23.	Estrutura química das chalconas MBMC e 3,4,5,3',4',5'-hexametoxichalcona.....	30
Figura 24.	Estrutura química das chalconas isoliquiritigenina e 2'-hidroxichalcona.....	31
Figura 25.	Estrutura química das chalconas 3,4,3',4'-tetrametoxi-2'-hidroxichalcona e 3,4-dimetoxi-4'-dimetilaminochalcona.....	31
Figura 26.	Estrutura química das chalconas anti-inflamatórias com descrição para atividade antimicobacteriana.....	32
Figura 27.	Estrutura química de chalconas com atividade anti-inflamatória e antibacteriana.....	33

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 28.	Estrutura química do inibidor padrão de iNOS, L- <i>MMMA</i> e da indometacina, AINE inibidor da produção de prostaglandinas.....	38
Figura 29.	Estrutura química do radical livre DPPH e do complexo doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP).....	40
Figura 30.	Estrutura química do BHT e do flavonoide rutina.....	41

RESULTADOS

Figura 31.	Efeito inibitório das chalconas na produção de NO e citotoxicidade em macrófagos alveolares MH-S estimulados por lisado celular de <i>M. bovis</i> BCG.....	57
Figura 32.	Efeito das chalconas substituídas na produção de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β e PGE ₂) em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.....	60
Figura 33.	Efeito das chalconas no sequestro de radicais livres avaliados pelo método do SNP e do DPPH.....	64
Figura 34.	Efeitos das chalconas mais ativas sobre a expressão enzimática da iNOS e COX-2 em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.....	67
Figura 35.	Efeito das chalconas na inibição do crescimento de cepas <i>M. tuberculosis</i> de baixa e hipervirulência.....	70
Figura 36.	Efeito das chalconas em cultura de macrófagos RAW 264.7 infectados por <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	72
Figura 37.	Efeito da associação das chalconas mais ativas à rifampicina contra <i>M. tuberculosis</i> hipervirulenta.....	74

Figura 38.	Efeito das chalconas mais ativas na viabilidade de bactérias extracelulares agregadas em <i>clumps</i>	77
Figura 39.	Efeito do tratamento com a chalcona 5 , ibuprofeno ou rifampicina no crescimento micobacteriano intracelular nos pulmões dos camundongos infectados.....	80
Figura 40.	Efeito do tratamento com a chalcona 5 , ibuprofeno ou rifampicina na macropatologia pulmonar induzida nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados por cepa de <i>Mtb</i> hipervirulenta.....	82
Figura 41.	Análise histopatológica comparativa entre os pulmões de camundongos C57BL/6 controle e infectados por cepa <i>Mtb</i> hipervirulenta.....	84
Figura 42.	Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados (30 dias de infecção) sem tratamento ou sob tratamento por 15 dias com a chalcona 5 , ibuprofeno ou rifampicina.....	86
Figura 43.	Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados (45 dias de infecção) sem tratamento ou sob tratamento por 30 dias com a chalcona 5 , ibuprofeno ou rifampicina.....	87
Figura 44.	Análise morfométrica da área de pneumonia nos pulmões dos animais infectados sobre efeito do tratamento com a chalcona 5 , rifampicina e ibuprofeno.....	88
Figura 45.	Análise histopatológica do fígado e baço dos camundongos C57BL/6 infectados pela cepa <i>Mtb</i> M299 (30 ou 45 dias de infecção) sem tratamento e sob tratamento por 15 e 30 dias com a chalcona 5 , ibuprofeno ou rifampicina.....	89
Figura 46.	Análise fenotípica do infiltrado celular pulmonar dos animais infectados pela cepa <i>Mtb</i> hipervirulenta sobre efeito do tratamento com fármacos.....	92
Figura 47.	Análise da produção de citocinas e óxido nítrico pelas células dos pulmões dos animais infectados com cepa <i>Mtb</i> hipervirulenta sobre efeito do tratamento com fármacos.....	94

SUMÁRIO DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1.	Principais fármacos anti-TB em uso clínico e seus alvos celulares.....	17
-----------	--	----

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 2.	Estrutura representativa da chalcona não substituída e das chalconas sintetizadas com substituintes nos anéis A e B.....	37
-----------	--	----

RESULTADOS

Tabela 3.	Efeito inibitório das chalconas na produção de NO e TNF- α em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, no crescimento de <i>M. bovis</i> BCG em cultura e avaliação da citotoxicidade celular pelos métodos do LDH e MTT.....	54
Tabela 4.	Concentração mínima inibitória em μ M das chalconas em relação à produção de NO e percentual de citotoxicidade (método de LDH e MTT).	57
Tabela 5.	Concentração mínima inibitória das chalconas substituídas quanto à produção de IL-1 β e PGE ₂	61
Tabela 6.	Concentração mínima inibitória das chalconas substituídas no sequestro dos radicais livres avaliados pelo método do SNP e DPPH.	64
Tabela 7.	Concentração inibitória mínima das chalconas substituídas na inibição do crescimento micobacteriano da cepa laboratorial <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e do isolado clínico <i>M. tuberculosis</i> M299.....	70
Tabela 8.	Concentração inibitória mínima (50%) referente ao tratamento com as chalconas associadas ou não a rifampicina quanto a inibição do crescimento micobacteriano da cepa Mtb M299.....	75
Tabela 9.	Concentração inibitória mínima (50%) das chalconas na viabilidade de agregados extracelulares da cepa Mtb H37Rv e do isolado clínico M299.....	78
Tabela 10.	Efeito do tratamento com a chalcona 5 , ibuprofeno ou rifampicina no crescimento micobacteriano intracelular nos pulmões dos camundongos BALB/c infectados.	80
Tabela 11.	Número de granulomas quantificados na secção do fígado dos animais C57Bl/6 infectados pela cepa M299 sem tratamento ou sob tratamento de 15 ou 30 dias com a chalcona 5, ibuprofeno ou rifampicina.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADC - Albumina, dextrose, catalase
- AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida
- AINE - Anti-inflamatório não esteroide
- AMPc - Adenosina 3,5-monofosfato cíclica
- AP-1 - Proteína ativadora-1
- ATP - Adenosina trifosfato
- BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente
- BCG - Bacilo Calmette-Guérin
- BHT - 2,6-di-(terc-butil)-4-metilfenol
- BSA - Albumina sérica bovina
- CCL - Quimiocina CC ligante
- CFU - Unidade formadora de colônia
- CoA - Coenzima A
- COX-2 - Ciclooxigenase-2
- DAB - Diaminobenzidina
- DMEM-F12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMF - Dimetilformamida
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- DOT - Terapia diretamente observada
- DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- ELISA - Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima
- FAS - Enzima ácido graxo-sintase
- GMPc - Guanosina 3,5-monofosfato cíclica
- H&E - Hematoxilina-eosina
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana
- HO-1 - Hemeoxigenase-1
- i.p. - Intraperitoneal
- i.t. - Intratraqueal
- ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular-1
- Ig - Imunoglobulina
- IL - Interleucina
- INF- γ - Interferon gama
- iNOS - Óxido nítrico sintase induzida
- kDa - Quilodalton
- LDH - Lactato desidrogenase
- LM - Lipomananas
- L-MMMA - N^G-acetato de monometil-L-arginina

- LPS - Lipopolissacarídeo
- LTB₄ - Leucotrieno B₄
- Man-LAM - Lipoarabinomananas manosiladas
- MBMDM - Macrófagos derivados de medula-óssea murina
- MDR-TB - Tuberculose multidroga-resistente
- MIC - Concentração mínima inibitória
- MMP - Metaloproteinase
- MOI - Multiplicidade da infecção
- Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*
- MTT - 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazol
- NAD - Nicotinamida-adenina dinucleotídeo
- NF-κB - Fator nuclear kappa B
- NO - Óxido nítrico
- OADC - Ácido oléico, albumina, dextrose, catalase
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PBS - Salina tamponada fosfatada
- PBST - Salina fosfatada tamponada acrescida de Tween
- PGE₂ - Prostaglandina E₂
- PNCT- Programa Nacional de Controle da Tuberculose
- RNA - Ácido ribonucléico
- RPMI - Roswell Park Memorial Institute
- SDS - Dodecilsulfato de sódio
- SFB - Soro fetal bovino
- SNP - Nitroprussiato de sódio
- TARV - Terapia anti-retroviral
- TB - Tuberculose
- TDM - Trealose dimicolato
- Th - Célula T *helper*
- TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa
- VCAM-1 - Molécula de adesão celular e vascular-1
- XDR-TB - Tuberculose extensivamente resistente
- ZN - Ziehl-Nielsen

RESUMO

A tuberculose (TB) continua sendo um grave problema de saúde pública agravada pelo aparecimento de cepas *M. tuberculosis* (Mtb) multidroga-resistentes (MDR). O atraso no estabelecimento do tratamento, comum nos casos de MDR-TB, pode conduzir a um processo inflamatório deletério em indivíduos hiper-reativos, encorajando a utilização da terapia adjuvante com base em intervenções anti-inflamatórias, além da descoberta e utilização de novos antibióticos anti-Mtb. Diversas substâncias naturais, dentre elas, as chalconas, têm sido descritas em relação aos efeitos anti-inflamatórios e antimicobacterianos, representando uma ferramenta potencial para a descoberta de novos fármacos. A combinação destas propriedades para uma mesma substância pode proporcionar às chalconas uma vantagem importante no seu uso contra a TB, entretanto, chalconas com atividade *dual* ainda não foram identificadas. Neste estudo, uma série de 41 chalconas sintéticas foi avaliada quanto às propriedades anti-inflamatórias (inibição da ativação dos macrófagos por LPS) e propriedades antimicobacterianas (inibição do crescimento bacteriano em cultura e em macrófagos infectados). Sete chalconas inibiram fortemente a produção de NO e PGE₂ pelos macrófagos estimulados por LPS através da inibição específica da expressão de iNOS e COX-2, destacando as chalconas **4** e **5** respectivamente. Quatro amostras dentre estas sete mais ativas, foram também capazes de inibir a produção de TNF- α e IL-1 β . Oito chalconas avaliadas foram capazes de inibir o crescimento de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv em cultura bacteriana e em macrófagos infectados. Quatro destas, incluindo as chalconas **4** e **5**, foram ativas contra a cepa Mtb hipervirulenta, inibindo tanto a viabilidade bacteriana intracelular como também, o crescimento de bactérias extracelulares agregadas em *clumps*. A amostra com maior potencial para ambas as atividades (anti-inflamatória e antimicobacteriana), a chalcona **5**, foi utilizada para avaliação do efeito terapêutico no tratamento da TB severa induzida nos camundongos C57Bl/6 por cepa Mtb hipervirulenta. O tratamento com a chalcona **5** 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 e da disseminação do bacilo para o baço e fígado. Os dados obtidos demonstraram que a chalcona **5** é uma substância promissora para estudos prospectivos que visam a geração de novos fármacos anti-TB para o tratamento adjuvante da TB grave associada com inflamação exacerbada. Este foi o primeiro estudo descrevendo uma nova abordagem para o *screening* de chalconas anti-TB focando a atividade biológica *dual*, anti-inflamatória e antimicobacteriana. Em adição, esta foi a primeira descrição destas atividades para a chalcona **5**, assim como efetivo potencial no tratamento da tuberculose severa em modelo murino.

PALAVRAS-CHAVE: Chalconas, Anti-inflamatório, Antimicobacteriano, Imunopatologia e Tuberculose.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains a serious public health problem aggravated by the emergence of *M. tuberculosis* (Mtb) strains resistant to multiple drugs (MDR). Delay in TB treatment, common in the MDR-TB cases, can lead to deleterious life-threatening inflammation in hyper-reactive individuals, encouraging the use of adjunctive therapy based on anti-inflammatory interventions, in addition to the discovery of new anti-Mtb drugs. Several natural substances of different origins, among them, the chalcones, have been studied in relation of anti-inflammatory and antimycobacterial properties and represent a potential tool for the discovery of new drugs. A combination of these properties in one compound could provide an important advantage for chalcones as potential anti-tuberculosis drugs, but chalcones exhibiting both anti-inflammatory and antimycobacterial properties have not yet been identified. In this study, a series of forty synthetic chalcones (substituted compounds) was evaluated *in vitro* for their anti-inflammatory properties (inhibition of macrophage activation induced by LPS) as well as antimycobacterial properties (inhibition of bacterial growth in culture and in the infected macrophages). Seven compounds strongly inhibited NO and PGE₂ production by LPS-stimulated macrophages through the specific inhibition of iNOS and COX-2 expression, respectively, with compounds **4** and **5** standing out in this respect. These compounds were able to inhibit production of TNF- α and IL-1 β as well. Additionally, eight of the studied compounds were able to inhibit growth of the *M. bovis* BCG and Mtb H37Rv strains in bacterial cultures and in infected macrophages. Four of them, including compounds **4** and **5**, were active against a hypervirulent clinical Mtb isolate as well, inhibiting growth of the intracellular bacteria and extracellular bacterial clumps. The compound **5**, demonstrating dual activities *in vitro*, was evaluated for the therapeutic effects in C57BL/6 mice infected with hypervirulent Mtb strain. The treatment with chalcone **5** for 2 or 3 weeks led to reduction of the area of lung pathology (pneumonia) and prevented development of pulmonary necrosis. In agreement, the treatment showed significant reduction in the frequency of the lung-infiltrating cells, especially neutrophils, and decreased production of inflammatory cytokines quantified in the supernatants of lung cells cultured *ex vivo*. The treatment with chalcone **5** also reduced bacterial loads in the lungs and dissemination to spleen and liver. The obtained data demonstrate that the chalcone compound **5** is a promising agent for further studies aimed at the generation of new anti-TB drugs for the adjunctive therapy of severe TB associated with exacerbated inflammation. This is the first report describing a new approach for the screening of anti-TB chalcones focusing on dual biological activities, such as anti-inflammatory and antimycobacterial. And the first time that these both activities were described for compound **5**.

KEYWORDS: Chalcones, Anti-inflammatory, Antimycobacterial, Immunopathology and Tuberculosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Tuberculose

A tuberculose (TB) permanece como uma das doenças infecciosas com maior taxa de mortalidade no mundo. Considerada um problema de saúde pública em 1993, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), após 20 anos, em 2013, foram estimados 9 milhões de casos incidentes de TB e 1,5 milhão de mortos pela doença, dentre os quais 360.000 pessoas eram HIV-positivo e 210.000 apresentavam TB multidroga-resistente (MDR-TB) (WHO, 2014a). O Relatório Global de Tuberculose fornecido pela OMS em 2014 estimou que 60% dos casos de TB e de número de mortes ocorreram entre os homens, enquanto que 510.000 mortes ocorreram entre mulheres e 35% destas apresentando coinfeção com vírus HIV.

A maioria dos casos de TB (cerca de dois terços) é pulmonar, sendo comum a presença de tosse por mais de 2 a 3 semanas, perda de peso e febre. A TB extrapulmonar, muito presente em pacientes HIV-positivo é na maioria das vezes pleural, linfática, raquidiana ou urogenital (NUNN *et al.*, 2005).

As características da doença manifestada nos indivíduos expostos ao bacilo da tuberculose não são uniformes, há um espectro de manifestações clínicas possíveis com diferenças no tipo e extensão da patologia desenvolvida no pulmão e intensidade de progressão da doença (LOPEZ *et al.*, 2003). Em um terço da população mundial a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é latente com risco de reativação da doença em 5 a 10% dos indivíduos (KUMAR *et al.*, 2011 e PHILLIPS e ERNEST, 2012). Embora mais de 90% das pessoas infectadas sejam capazes de conter a infecção em estágio latente com lenta progressão, elas também representam um amplo reservatório para novos casos de TB ativa (OTTENHOFF e KAUFMANN, 2012).

O desenvolvimento de resistência aos fármacos utilizados no tratamento da TB é uma ameaça ao controle da doença em diversas regiões do mundo. Em 2013, entre os novos casos, 3,5% apresentavam TB multidroga-resistente e 20,5% destes foram de pessoas previamente conduzidas ao tratamento. Dos pacientes com diagnóstico de MDR-TB, 9% desenvolveram TB extensivamente resistente a drogas (XDR-TB) (WHO, 2014b). A TB multidroga-resistente está presente em nível mundial e a XDR-TB foi notificada em 100 países sendo quinze destes com 10 ou mais casos reportados (ZUMLA *et al.*, 2013 e WHO, 2014b).

Vários fatores estão relacionados ao aumento dos casos de TB além do aparecimento de cepas resistentes a medicamentos, tais como a epidemia de AIDS, a desnutrição, baixa condição socioeconômica, o tabagismo, o consumo excessivo de álcool, diabetes, poluição do ar e a migração populacional. Estudos adicionais descreveram outras complicações, como interações medicamentosas de alguns fármacos anti-TB com medicamentos utilizados no tratamento anti-HIV ou diabetes e a longa duração do tratamento (pelo menos 6 meses), conduzindo a relutância do paciente em aderir adequadamente ao tratamento ou o abandono do mesmo (KUMAR *et al.*, 2011; KOUL *et al.*, 2011 e COLE e RICCARDI, 2011).

Além disso, a ausência de acesso imediato a um tratamento efetivo e adequado, de ferramentas de diagnóstico ideais, do desenvolvimento de novos fármacos de baixa toxicidade e custo e de uma vacina amplamente eficaz; em conjunto problematizam o cenário clínico da TB (DHEDA *et al.*, 2010 e ARBEX *et al.*, 2010).

Atualmente, o incentivo científico e político para o desenvolvimento de medicamentos e uma nova abordagem de utilização para os que estão em uso mostram o esforço contínuo para superar os desafios com relação à doença, a fim de erradicar o desenvolvimento da TB resistente ao tratamento.

De acordo com a OMS, até 2050 são estimados que as substâncias descobertas a partir de novas fontes e o desenvolvimento de vacinas alcançarão estágios clínicos de pesquisa avançados.

1.2. O micro-organismo

O gênero *Mycobacterium* (Mycobacteriaceae) pertence a ordem Actinomycetes e inclui mais de 160 espécies/subespécies de bactérias. Este gênero é composto por grande número de patógenos de importância clínica, alguns causadores de doença em humanos e animais (*M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. bovis*) e outros oportunistas (*M. avium* e *M. kansasii*) (DAI *et al.*, 2011).

A TB é causada por bactérias que fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). MTBC inclui *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. caprae*, *M. orygis*, e *M. pinnipedii*. O MTBC é caracterizado por espécies com diferentes padrões de tropismos por hospedeiros, virulência, patogenicidade e resistência a fármacos, embora ocorra 99,9% de similaridade a nível de nucleotídeos (POUNDER *et al.*, 2010 e COSCOLLA *et al.*, 2013).

O principal agente etiológico da tuberculose humana é *M. tuberculosis*, que tem um tropismo exclusivo por este hospedeiro. No entanto, *M. bovis*, agente etiológico da tuberculose bovina, pode causar lesões semelhantes ao *M. tuberculosis* (5 a 20% de todos os casos de TB humana) e manifestação extrapulmonar com maior fator de risco em pacientes imunossuprimidos (KOLDITZ *et al.*, 2010 e JORDAO e VIEIRA, 2011).

M. tuberculosis é um patógeno intracelular facultativo, embora seu ciclo de vida extracelular seja menos abordado. O macrófago alveolar é a primeira célula hospedeira, fagocitando o bacilo e sendo estimulado à produção de vários mediadores químicos, apesar do patógeno ser capaz de escapar ou evitar a sua morte (PHILLIPS e ERNST, 2012 e ORME, 2013). No entanto, o bacilo permanece na fase intracelular por um breve período, se adaptando ao estado fisiológico extracelular, num segundo momento do processo da doença, no qual, de fato, passa a maior parte do seu ciclo de vida. Bacilos persistentes são quase todos extracelulares e potencialmente formam biofilmes (HUNTER *et al.*, 2006; ORME, 2011 e ORME, 2013).

O crescimento lento e a resistência à descoloração por álcool e ácidos são características relacionadas aos altos níveis de lipídeos, principalmente ácidos micólicos na parede celular micobacteriana. Os ácidos micólicos são encontrados em 3 classes principais, alfa, metoxi e ceto-micolatos (**Figura 1**), sendo responsáveis por 50% do peso seco micobacteriano e estão ligados de forma covalente a arabinogalactanos. Outros componentes da parede celular incluem lipoarabinomananas manosiladas (Man-LAM), lipomananas (LM) e manoglicoproteínas. A espessa camada de ácidos micólicos embora dificulte a entrada de nutrientes, aumenta a resistência celular a degradação enzimática e processos de descoloração (KLEINNIJENHUIS *et al.*, 2011 e KORKEGIAN *et al.*, 2014).

A variação da proporção destes componentes em diferentes espécies de micobactérias afeta a patogenicidade e a virulência. A complexidade da estrutura da parede celular é essencial para a viabilidade do organismo e é alvo de vários agentes terapêuticos (GROENEWALD *et al.*, 2013). O glicolípido micobacteriano trealose dimicolato, TDM, é um fator de virulência capaz de induzir por si só inflamação e conduzir a formação de granulomas (EHLERS e SCHAIBLE, 2013). A livre síntese de ácidos micólicos metoxilados é responsável pela formação de uma matriz extracelular rica em lipídeos ao redor dos bacilos extracelulares persistentes na necrose, possibilitando a formação dos biofilmes (ORME e BARSARABA, 2014).

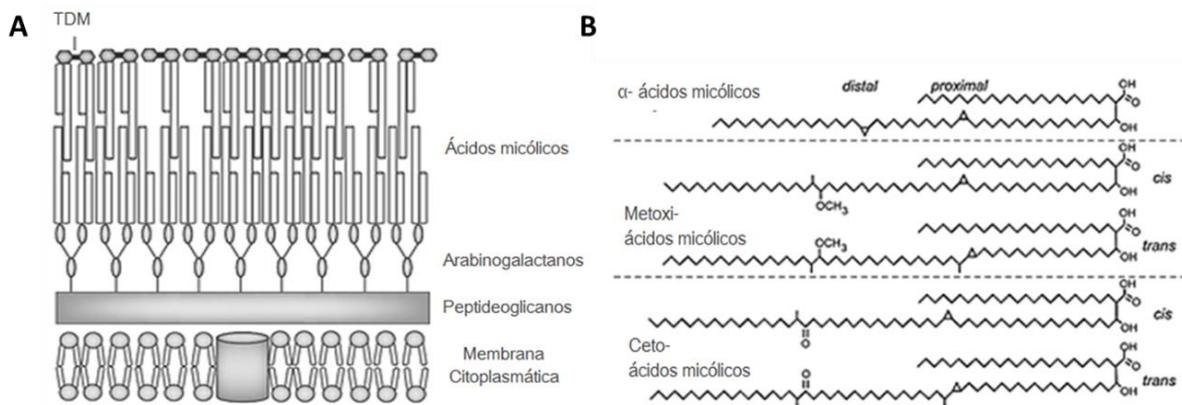


Figura 1. Esquema simplificado da parede celular micobacteriana e estrutura química dos principais ácidos micólicos de *M. tuberculosis*. **(A)** A primeira camada e mais interna compreende os peptidoglicanos, a segunda é composta por um polissacarídeo, o arabinogalactano, e a terceira é constituído por ácidos micólicos de cadeia longa (60 a 90 carbonos). Glicolípido micobacteriano trealose dimicolato (TDM) está não-covalentemente associado ao envelope celular (modificado de COLE, 2012). **(B)** Metoxi-micolatos e ceto-micolatos podem apresentar configuração *cis* e *trans* enquanto α -micolatos apresentam-se somente em configuração *cis* (modificado de GLICKMAN *et al.*, 2000).

O *locus psk* foi diretamente relacionado à formação dos biofilmes micobacterianos por contribuir com a síntese de glicolípídeos fenólicos imunomodulatórios responsáveis pela elongação da cadeia de lipídeos (ORME, 2013). Entretanto, uma variedade de genes adicionais pode contribuir para a formação e manutenção do biofilme, como o gene que codifica para a enzima 2-oxoglutarato desidrogenase, fundamental no ciclo de Krebs (OJHA *et al.*, 2008).

Além disso, minerais e sensores ambientais na membrana micobacteriana são importantes dentro deste processo, como por exemplo, o requerimento dos minerais ferro e zinco, cofatores enzimáticos essenciais na geração de CO_2 e na síntese de lipídeos micobacterianos e os sensores de histidina-quinase associados à membrana, responsáveis pela percepção de mudanças nas condições ambientais (OJHA *et al.*, 2008 e ACKART *et al.*, 2014). A tolerância dos biofilmes aos fármacos devido a mudanças na permeabilidade celular, alterações ambientais e fatores internos evidenciam o papel importante das bombas de efluxo *up*-reguladas nesta fase (BJARNSHOLT *et al.*, 2013). O desenvolvimento de novos fármacos deve considerar o processo patogênico da micobactéria no meio extracelular de forma a intervir apropriadamente na formação e maturação dos biofilmes (ORME, 2013).

A evolução de *M. tuberculosis* é expressa frente à resistência a antimicrobianos. Como *M. tuberculosis* não contém plasmídeos e a transferência horizontal de genes é considerada ausente, a resistência emerge classicamente através de alterações genéticas, tais como mutações em genes alvo. Esta forma de resistência é transmitida

hereditariamente durante a replicação e amplificada sob pressão terapêutica quando uma mutação proporciona uma vantagem que não interfira drasticamente nas funções básicas celulares. A resistência aos fármacos anti-TB também pode ser resultado de resistência fenotípica ou tolerância aos fármacos. Este tipo de resistência (não hereditária) ocorre quando células geneticamente suscetíveis adquirem resistência em virtude de processos específicos, por exemplo, a formação de biofilmes e durante a fase de latência (formas não-replicativas de bactéria), devido a adaptações metabólicas e fisiológicas (GILLESPIE, 2007; CORONA e MARTINEZ, 2013 e DARTOIS, 2014;).

Neste sentido, a tolerância aos fármacos ocorre pelo fato destes não conseguirem penetrar em concentração adequada em alguns locais, como por exemplo, nas áreas de necrose tecidual e quando bactérias extracelulares crescem em biofilmes (OJHA *et al.*, 2008; ORME 2011; ORME, 2013 e ACKART *et al.*, 2014).

1.3. Resposta imune e imunopatogenia da TB

A tuberculose é uma doença que atinge o trato respiratório na maioria dos casos. O processo de infecção inicialmente deriva da inalação de aerossol contendo bactérias individuais ou *clumps* de *M. tuberculosis* provenientes de um indivíduo infectado. O ar inalado atinge o interior do alvéolo pulmonar onde as bactérias são fagocitadas por macrófagos alveolares (DHEDA *et al.*, 2010 e ORME, 2011). A probabilidade de desenvolvimento da infecção está diretamente relacionada à duração e a intensidade da exposição (DORHOI *et al.*, 2011).

A virulência da cepa infectante, fatores genéticos do hospedeiro e algumas comorbidades se relacionam e determinam a progressão da doença e o grau de severidade do processo patológico. Cepas micobacterianas hipervirulentas diferentemente de cepas de baixa virulência promovem severa patologia pulmonar com presença de alta carga bacilar (AMARAL *et al.*, 2014). Estudos recentes sobre a influência de variações genéticas do hospedeiro na suscetibilidade a infecções micobacterianas mostraram que o polimorfismo no *locus Iti4h* (leucotrieno A4 hidrolase), responsável pelo balanço na produção de eicosanoides pró- e anti-inflamatórios, está associado com a TB. Ambos os genótipos homocigóticos corresponderam ao aumento da severidade da doença, devido à deficiência ou excesso na produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) resultando em necrose celular e crescimento extracelular do bacilo (TOBIN *et al.*, 2012).

Após infectar o hospedeiro, os bacilos podem ser eliminados pelas células do sistema imune, entrar em estado de latência ou desencadear uma infecção produtiva, caracterizada pela multiplicação bacteriana, que evolui para uma doença ativa. Severas lesões patológicas nos pulmões e outros tecidos afetados podem levar o indivíduo à morte, principalmente em casos de imunossupressão, infecção por cepas hipervirulentas ou resistentes ao tratamento (DHEDA *et al.*, 2010 e SUBBIAN *et al.*, 2011).

A resposta imune inata é inicialmente caracterizada pela interação de componentes micobacterianos com receptores (receptores Toll-like, receptor de manose, receptor *scavenger*, entre outros) na superfície de células fagocíticas locais, principalmente macrófagos alveolares. A ativação dessas células induz a produção de mediadores inflamatórios, tais como quimiocinas, citocinas (IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio responsáveis pela ativação de células endoteliais dos capilares sanguíneos adjacentes e a expressão de moléculas de adesão, o que possibilita o influxo adicional de monócitos, células dendríticas, neutrófilos e linfócitos para o local da infecção contribuindo para a formação primária dos granulomas, principal característica da resposta imune a TB (Figura 2) (DORHOI *et al.*, 2011 e PHILIPS e ERNST, 2012).

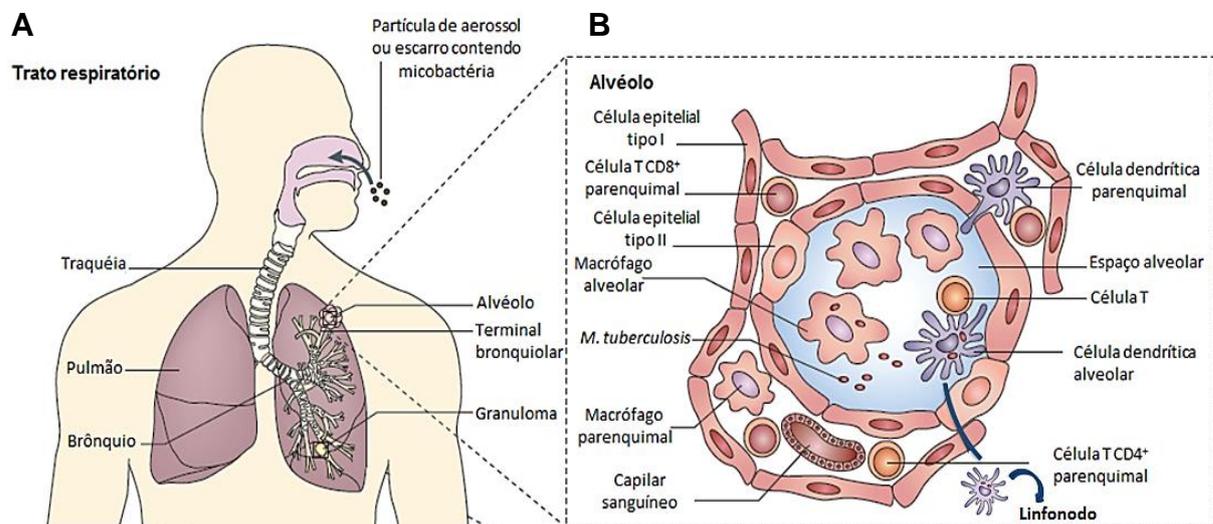


Figura 2. Infecção pelo *M. tuberculosis* e desenvolvimento da resposta imune inata. (A) A infecção por *M. tuberculosis* inicia com a inalação do (s) bacilo (s), em gotículas de aerossol gerados pela tosse de um indivíduo infectado ou como micropartículas de expectoração seca. Os bacilos adentram o espaço alveolar e nos pulmões os principais eventos da TB pulmonar se iniciam. (B) Os alvéolos são revestidos por células epiteliais tipo I e tipo II separadas pelo interstício contendo capilares pulmonares. Na cavidade alveolar, os bacilos são fagocitados por macrófagos alveolares. As células dendríticas são responsáveis pelo transporte do *M. tuberculosis* para os linfonodos torácicos, ativando a resposta imune adaptativa e tornando células T *naive* em efetoras, que são quimioatraídas até o foco inflamatório inicial (modificado de GRIFFTHS *et al.*, 2010).

Mesmo após ativação do fagócito, *M. tuberculosis* é capaz de persistir nos macrófagos inibindo a maturação do fagossoma, sua fusão com lisossomas e apoptose da célula infectada, o que permite sua ativa replicação no compartimento endossomal (JORDAO e VIEIRA, 2011 e DORHOI *et al.*, 2011).

A resposta imune inata na TB consiste de um processo dinâmico, embora o agente patogênico tenha sucesso nos mecanismos de estabelecimento da doença e evasão da resposta imune, de modo que a resposta inata apresente baixo efeito antibacteriano imediato. Entretanto, a mesma possui papel fundamental no estabelecimento de um ambiente que permita o desenvolvimento da resposta adaptativa (ERNST, 2012).

A indução da resposta adaptativa celular tem grande importância no controle da infecção micobacteriana pelo hospedeiro, no entanto verifica-se a capacidade do bacilo em retardar o início da fase adaptativa possibilitando a proliferação bacilar antes do adequado desenvolvimento da resposta imune adaptativa. A inibição ou falha na capacidade de migração das células dendríticas mieloides infectadas pelo *M. tuberculosis* tem sido relacionada a ocorrência deste retardo inicial (OTTENHOFF e KAUFMANN, 2012 e ERNST, 2012).

A produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-1 β e TNF- α) induzidas pelo *M. tuberculosis* em macrófagos e a apresentação de antígenos a células T *naive* possibilitam a diferenciação destas no subconjunto de células T CD4⁺ do subtipo *helper* 1 (Th1) e de células T CD8⁺ efetoras, produtoras de IFN- γ (ORME, 2013 e EHLERS e SCHAIBLE, 2013). Além destas, outros tipos celulares atuam na resposta imune a TB, como a subpopulação Th17. Durante a fase inicial da doença, as células Th17 atuam de forma protetora regulando o recrutamento de neutrófilos e de células Th1, contribuindo para a formação do granuloma. Entretanto também possui papel prejudicial devido ao acúmulo neutrofílico e à patologia tecidual decorrente de altas concentrações de IL-17 no pulmão (ERNST, 2012 e NUNES-ALVES *et al.*, 2014).

As células Th1 produtoras de IFN- γ e TNF- α aceleram a infiltração celular inflamatória como também tornam organizada a estrutura granulomatosa. O granuloma consiste, por conseguinte, de macrófagos infectados pelo bacilo, macrófagos espumosos lipídicos, macrófagos epitelioides e outras células fagocíticas, como os neutrófilos, rodeados por linfócitos (**Figura 3**), que em humanos estão em associação com uma capa fibrosa de colágeno e outros componentes da matriz extracelular (COOPER, 2009; TORRADO *et al.*, 2010 e EHLERS e SCHAIBLE, 2013). O desenvolvimento da necrose no granuloma está frequentemente associado com alta

carga bacteriana, virulência da cepa infectante entre outros fatores (EHLERS e SCHAIBLE, 2013).

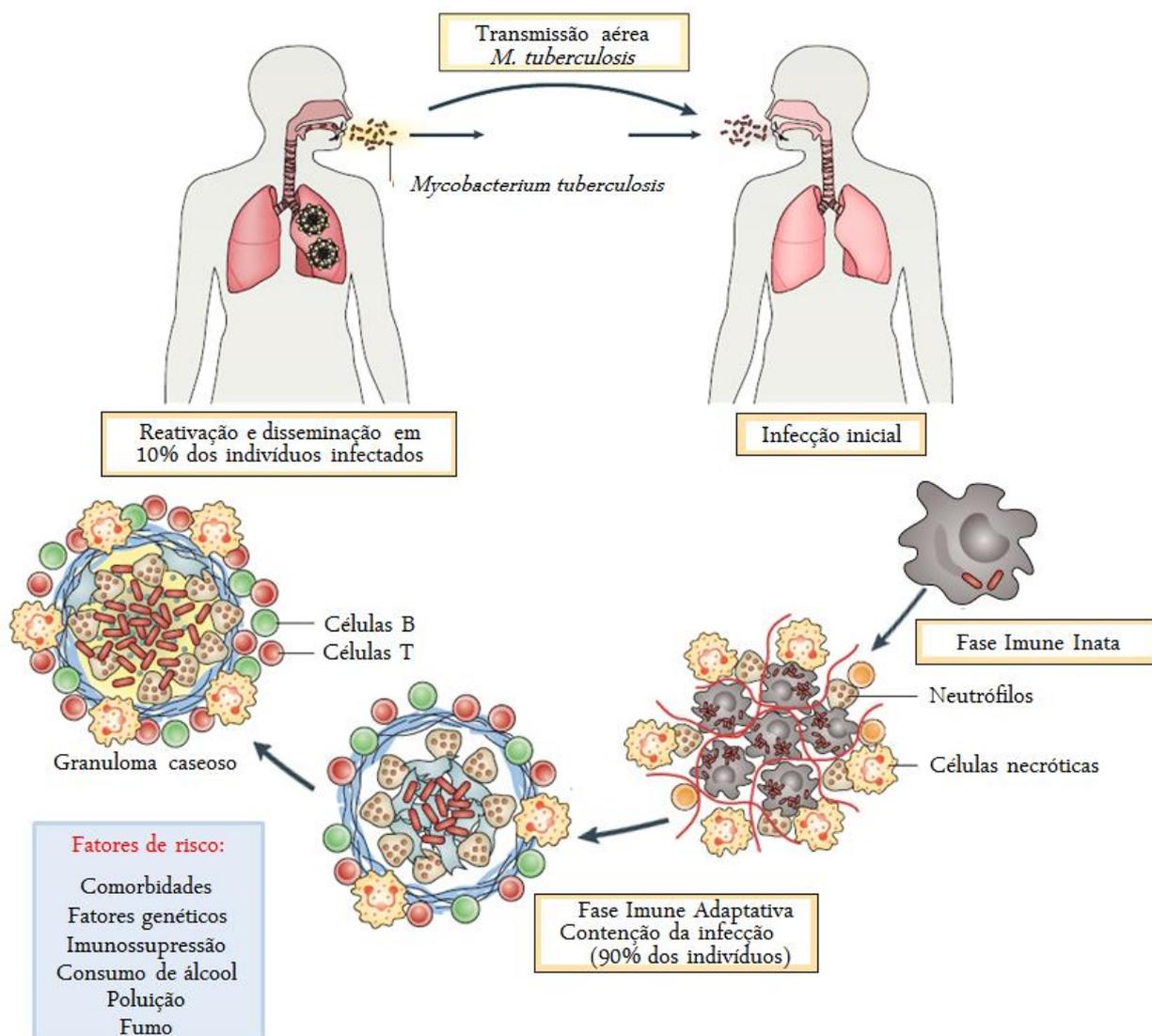


Figura 3. Resposta imune e patogênese da tuberculose. Após a inalação do aerossol contendo *M. tuberculosis*, o estágio inicial da infecção é caracterizado pela resposta imune inata, envolvendo o recrutamento de células inflamatórias para o pulmão. Após a disseminação bacteriana para os linfonodos próximos, as células T *naive* são ativadas o que provoca a expansão de células T antígeno-específicas. O recrutamento de células T e B para o pulmão, macrófagos ativados e outros leucócitos conduz a formação do granuloma. Eventualmente, um baixo percentual de indivíduos infectados possui uma progressão para doença ativa, o que possibilita a liberação de *M. tuberculosis* a partir do contato do granuloma necrótico crescente com espaços aéreos intactos, caracterizando o processo de transmissão da infecção (modificado de NUNES-ALVES *et al.*, 2014).

A replicação acelerada de micobactérias virulentas em macrófagos induz morte necrótica promovendo liberação do bacilo ou *clumps* de bacilos (PARK *et al.*, 2006). A necrose dos macrófagos favorece a disseminação da bactéria e a infecção de novas células permissíveis, induzindo novos ciclos de replicação. Além disso, resulta na

liberação do conteúdo celular contendo vários sinais de alerta, “danger signals”, tais como moléculas de adenosina trifosfato, ATP. A ligação do ATP extracelular com receptores purinérgicos, P2X7R, induz nos macrófagos uma cascata de sinalização que ativa a formação do complexo multiprotéico denominado inflamassoma, promovendo a produção de IL-1 β , induzindo morte celular e exacerbando a inflamação pulmonar (AMARAL *et al.*, 2014). A morte necrótica das células infectadas é um dos fatores que promove o recrutamento acelerado dos neutrófilos.

Uma nova visão sobre a teoria da patogênese da TB enfatiza o papel dos neutrófilos que foi subestimada anteriormente (ORME, 2013). O acúmulo dos neutrófilos, a liberação de ampla variedade de produtos microbicidas e citotóxicos (mieloperoxidases, oxigênio reativo, metaloproteinases, entre outros) secretados ou liberados durante a morte destas células, contribui para a patologia pulmonar e formação da necrose intragranulomatosa. Os neutrófilos liberam enzimas que destroem o endotélio capilar propiciando assim a necrose inicial. Além disso, a acumulação focal de células contribui para a compressão e colapso da estrutura endotelial. O dano progressivo a partir do foco necrótico inicial associa-se ao acúmulo de caseose no núcleo central necrótico onde o bacilo pode sobreviver em um estado extracelular (**Figura 3**) (TORRADO *et al.*, 2010; ORME e BARSARABA, 2014 e MARZO *et al.*, 2014).

A necrose amplia a lesão pulmonar promovendo a sobrevivência da micobactéria e sua persistência no hospedeiro após formação da resposta imune. A capacidade das células T e macrófagos, bem como dos fármacos anti-TB alcançarem os bacilos extracelulares viáveis presentes na necrose é muito dificultada e a presença de debris celulares no interior da massa necrótica possibilita a sua utilização como suporte para o desenvolvimento de biofilmes (EHLERS e SCHAIBLE, 2013 e ORME e BARSARABA, 2014). A presença de colesterol proveniente de debris das membranas celulares, principalmente de neutrófilos, assim como a acumulação de lipídeos no interior dos bacilos, via interação com macrófagos espumosos lipídicos (*foamy macrophages*) são fontes de carbono e cruciais para a persistência de *M. tuberculosis* (PEYRON *et al.*, 2008 e HUNTER *et al.*, 2011).

A formação das cavidades no pulmão é uma manifestação grave da TB observada após sua reativação. A sua formação é resultante do contato do granuloma necrótico crescente nas lesões primárias com espaços aéreos intactos possibilitando o esvaziamento dos cáseos (centro necrótico com aspecto de “queijo”) nas vias aéreas. Contudo, a principal razão para sua formação tem sido descrita em ocorrência de uma

forte resposta inflamatória (pneumonia tuberculosa lipídica), decorrente de um encontro pós- primário de macrófagos espumosos com uma micobactéria inalada ou proveniente de um sítio persistente no interior alveolar, conduzindo a uma reação necrótica rápida e violenta, mediada pela produção de produtos reativos, citocinas e metaloproteinases de matriz, incluindo colagenase (MMP-1), responsáveis pela criação da cavidade (HUNTER *et al.*, 2011; ORME e BARSARABA, 2014 e DARTOIS, 2014).

De forma geral, a produção de mediadores pró-inflamatórios é essencial para a resposta imune contra micobactérias. No entanto, nos cenários clínicos severos, um balanço entre fatores do hospedeiro e da micobactéria conduzem a excessiva, porém, inadequada ativação da resposta inflamatória, ocasionando a produção exacerbada de mediadores químicos que resulta num quadro hiperinflamatório (danos teciduais massivos, extensa necrose, pneumonia, exaustão imune e mortalidade) (LECHARTIER *et al.*, 2014; ZUMLA *et al.*, 2013 e ZUMLA *et al.*, 2014b).

Tratamentos adjuvantes a terapia anti-TB têm sido explorados neste âmbito para reduzir a resposta inflamatória destrutiva, tendo como alvo a resposta imune do hospedeiro (prevenção da necrose e diminuição da lesão pulmonar) e não diretamente a micobactéria (GARLANDA *et al.*, 2007; DORHOI *et al.*, 2011 e MARZO *et al.*, 2014).

O aprofundamento dos estudos sobre a resposta imune e imunopatologia da TB apresentam novos desafios e também revelam pontos-chaves que podem ser utilizados como múltiplos alvos de tratamento. Torna-se evidente a necessidade de combinar o tratamento antimicobacteriano a terapia adjuvante, tais como fármacos anti-inflamatórios aumentando as perspectivas de sucesso no tratamento dos casos graves de TB (ZUMLA *et al.*, 2013 e ZUMLA *et al.*, 2014b).

A utilização de modelos animais, principalmente camundongos, tem sido extremamente útil no estudo da imunologia assim como da patogenia da TB, embora o modelo experimental murino não reproduza fielmente todos os tipos de lesões patológicas observadas em humanos, como por exemplo, a necrose pulmonar. Estudos associados à avaliação de novas estratégias terapêuticas implicadas na prevenção da necrose pulmonar e diminuição da severidade da TB necessitam de modelos murinos adequados que reproduzam satisfatoriamente este processo.

O modelo experimental utilizando camundongos das linhagens C57Bl/6 e BALB/c infectados por cepas laboratoriais de Mtb (o modelo mais utilizado para estudos da TB) não reproduz as lesões necróticas no pulmão (DORHOI *et al.*, 2011 e ORME, 2013).

O desenvolvimento da necrose foi observado somente em camundongos de linhagens imunodeficientes ou hipersensíveis a TB (RADAEVA *et al.*, 2008) que não são adequadas para estudos da patogenia em hospedeiro imunocompetente e relativamente resistente a TB (como ocorre na maioria dos casos da TB humana).

Recentemente, em nosso laboratório foi estabelecido um modelo de infecção utilizando camundongos da linhagem C57Bl/6 inoculados com baixa dose de Mtb hipervirulenta que reproduz várias manifestações patológicas das formas clínicas severas da TB humana, incluindo pneumonia tuberculosa com áreas de necrose e disseminação miliar para o baço e o fígado (AMARAL *et al.*, 2014). Este modelo pode ser utilizado para estudo dos efeitos de fármacos na redução das lesões necróticas.

1.4. Tratamento atual da TB e desenvolvimento de novos fármacos

A terapia padrão para a tuberculose está bem estabelecida pela OMS, consistindo no uso de pirazinamida, isoniazida, etambutol e rifampicina (**Figura 4**), por 2 meses de terapia diretamente observada e intensiva (DOT), seguido por 4 meses de tratamento com isoniazida e rifampicina, conhecido como tratamento de primeira linha (Grupo 1) (ORME, 2011; COLE e RICCARDI, 2011). A OMS destaca a importância da adequação e qualidade na terapia padrão da TB como a melhor forma de prevenção contra o surgimento e propagação da TB resistente.

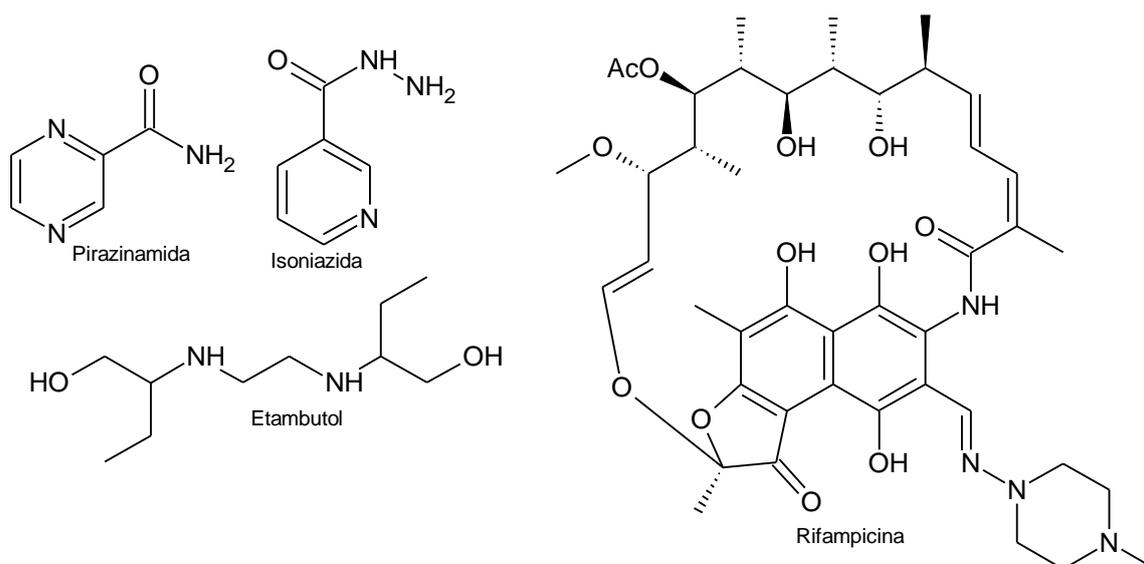


Figura 4. Estrutura química dos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento convencional da tuberculose.

No Brasil, o sistema de tratamento da TB foi modificado para indivíduos com 10 anos ou mais, em 2009, de acordo com a Nota Técnica do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) do Ministério da Saúde. As mudanças no tratamento consistiram na introdução do etambutol na fase intensiva do tratamento, após quase 30 anos de esquema tríplice (pirazinamida, isoniazida e rifampicina) e na introdução de comprimidos com dose fixa combinada dos 4 fármacos, reduzindo as doses de pirazinamida e isoniazida, devido ao aumento de resistência a estes fármacos. A redução no número de comprimidos a serem ingeridos e a impossibilidade de tomada isolada dos medicamentos proporciona maior conforto ao paciente além da simplificação da gestão farmacêutica em todos os níveis (Ministério da Saúde, 2009).

Em 95% dos casos de TB desenvolvida pela primeira vez não se observa resistência a fármacos incluídos no tratamento padrão, obtendo uma taxa de sucesso de 86% (WHO, 2014b). Independentemente da presença de comorbidades tais como HIV, este regime de tratamento é estabelecido para TB pulmonar e a maioria dos casos de TB extrapulmonar (ZUMLA *et al.*, 2013).

No entanto, embora este regime de tratamento seja altamente eficaz quando a adesão do paciente é totalmente apropriada, em condições experimentais e na vida real, os resultados se afastam do ideal (ZUMLA *et al.*, 2014a).

A falta de êxito na terapia com medicamentos pertencentes ao regime de primeira linha conduz ao tratamento com fármacos de segunda e terceira linha classificados em quatro grupos (Grupo 2 - 5) de acordo com a eficácia, potência e experiência de uso. O grupo 2 é formado por aminoglicosídeos (estreptomicina, canamicina e amicacina) e polipeptídeos injetáveis (viomicina e capreomicina) (**Figura 5**) (ZUMLA *et al.*, 2013).

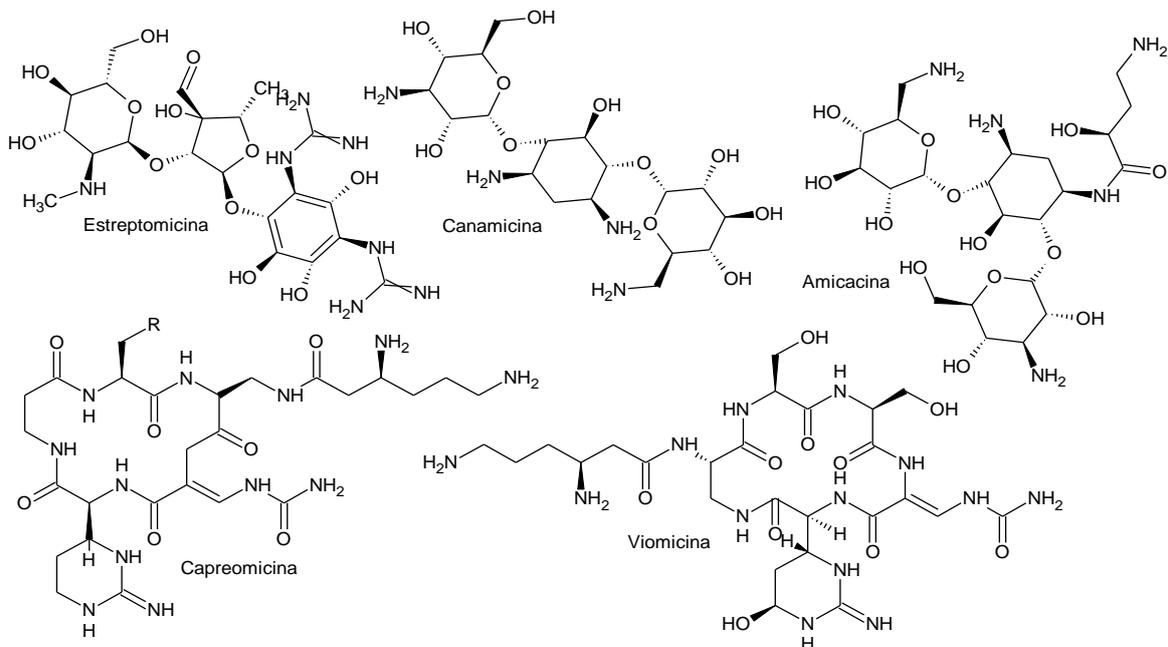


Figura 5. Estrutura química dos fármacos do grupo 2 utilizados no tratamento da tuberculose.

O grupo 3 consiste de fluoroquinolonas orais e injetáveis (ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, ofloxacina e gatifloxacina) e o grupo 4, de bacteriostáticos orais (ácido *p*-aminosalicílico, cicloserina, terizidona, etionamida, protionamida, tioacetazona e linezolida) (**Figura 6**) (ZUMLA *et al.*, 2013; SHIM e JO, 2013 e CHAN *et al.*, 2013).

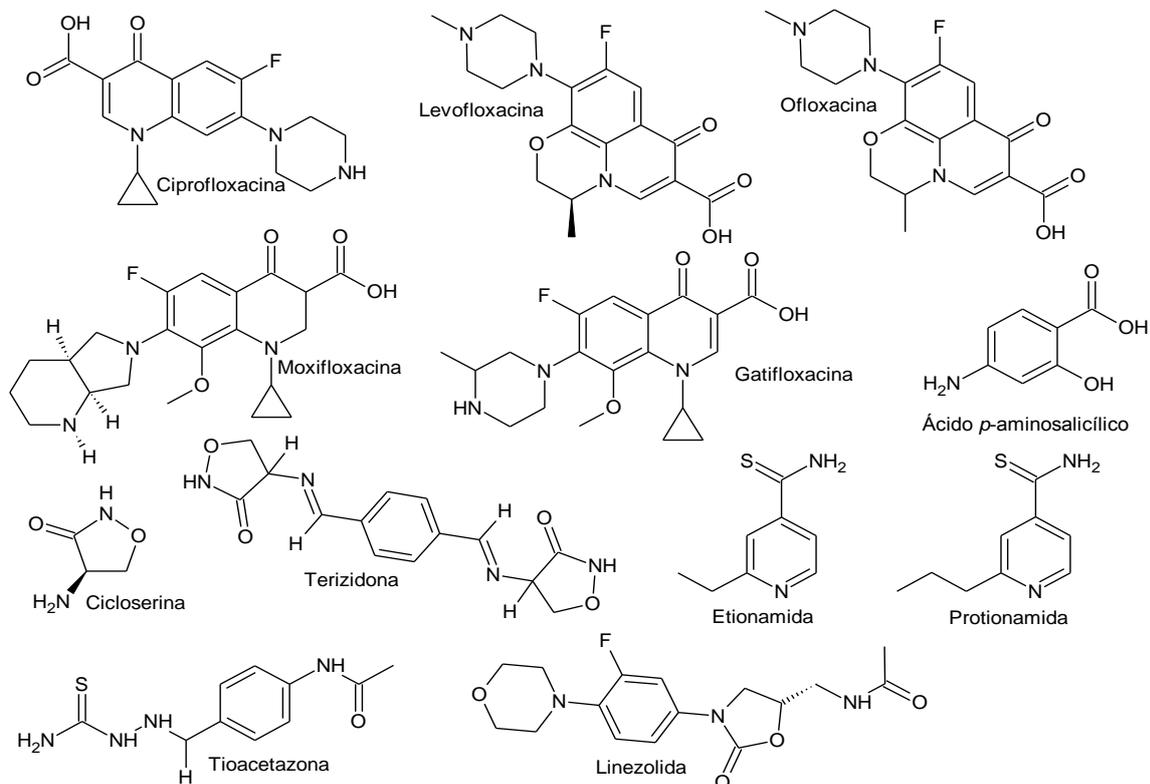


Figura 6. Estrutura química dos fármacos do grupo 3 e 4 utilizados no tratamento da tuberculose.

O grupo 5 inclui fármacos de eficácia moderada que representam a terceira linha de medicamentos anti-TB (clofazimina, amoxicilina/ clavulanato e imipenem /cilastatina) (ORME, 2011; ZUMLA *et al.*, 2013 e SHIM e JO, 2013). Os fármacos pertencentes a este grupo não são recomendados para uso de rotina no tratamento da TB resistente, devido à falta de evidência clínica conclusiva e clareza na atuação para estes casos, dificultando a sua recomendação. Apenas são utilizados quando o tratamento realizado com os grupos 1 a 4 foi insuficiente e na tentativa de dificultar o desenvolvimento da TB multidroga-resistente (**Figura 7**) (CHAN *et al.*, 2013 e KWON *et al.*, 2014).

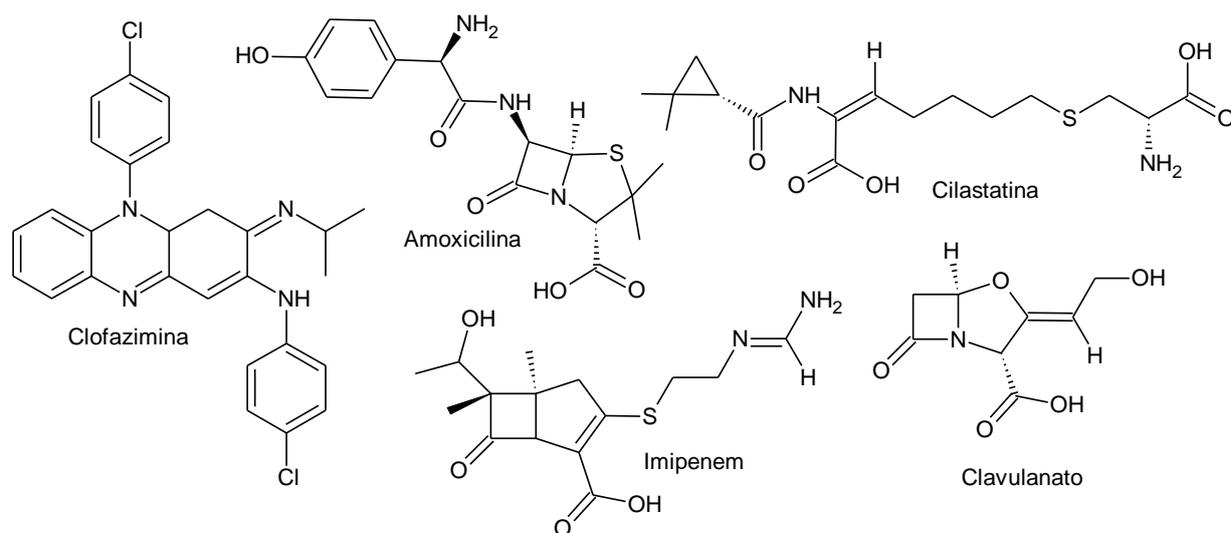


Figura 7. Estrutura química dos fármacos do grupo 5 utilizados no tratamento da tuberculose.

A primeira linha de agentes orais, tais como, pirazinamida, etambutol e rifabutina, nova geração de rifamicinas (**Figura 8**), também pode ser utilizada na ocorrência de bacilos resistentes ao tratamento (CHAN *et al.*, 2013). A rifabutina é utilizada na composição do esquema básico, nos casos de coinfeção TB/HIV onde o uso da rifampicina é incompatível com a terapia retroviral (Ministério da Saúde, 2009).

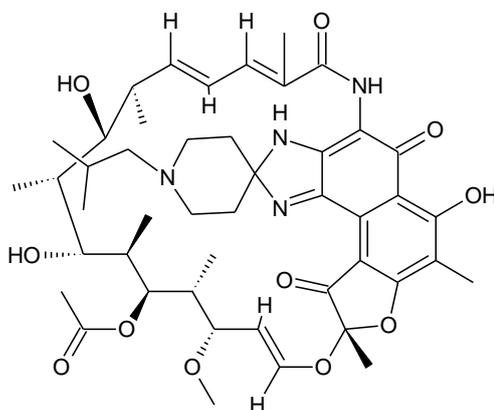


Figura 8. Estrutura química do fármaco anti-TB rifabutina.

A MDR-TB é definida como a TB resistente a isoniazida e a rifampicina, os fármacos mais potentes de primeira linha utilizados no tratamento da doença. Esta resistência pode ser devida à infecção primária com bactérias resistentes, condições de tratamento inadequadas e abandono do tratamento. A tuberculose extensivamente resistente a drogas, XDR-TB, é a resistência não apenas à isoniazida e à rifampicina, mas também a qualquer fluoroquinolona e pelo menos um medicamento injetável de segunda linha. As taxas de sucesso do tratamento e de cura são muito baixas, envolvem a utilização dos grupos de 1 a 5, requerem medicamentos caros e mais tóxicos, além da duração da terapia ser de pelo menos 18 a 24 meses (JORDAO e VIEIRA, 2011 e KOUL *et al.*, 2011).

Vale ressaltar, no contexto específico de obtenção de novos fármacos ou para o regime padrão utilizado; a avaliação da eficácia do fármaco nos distintos estados fisiológicos e de replicação do *M. tuberculosis* (ORME, 2011 e COLE e RICCARDI, 2011). Além disso, substâncias mais eficazes são necessárias para o encurtamento do período de tratamento favorecendo a conclusão do mesmo, reduzindo o risco de resistência e o custo. A análise do perfil de segurança dos fármacos também é fundamental para possibilitar o aumento da tolerância para o paciente, assim como deve ser observada a compatibilidade com a terapia anti-retroviral e com o tratamento do diabetes e a ausência de atividade antagônica a outros medicamentos anti-TB (KOUL *et al.*, 2011 e ZUMLA *et al.*, 2013).

O processo de desenvolvimento de um novo medicamento ou uma nova abordagem de uso de um fármaco já estabelecido é um processo dispendioso e de longa duração. Muitos fatores contribuem para o longo período de tempo sem a introdução de novos fármacos anti-TB em estágios avançados de desenvolvimento, uma vez que o candidato a fármaco é avaliado de acordo com a sua potência, eficácia e eficiência durante sua obtenção e experimentação científica. A afinidade do fármaco ao alvo e a atividade intrínseca estão relacionadas com a estrutura química, enquanto a potência associa-se à quantidade necessária do fármaco para obtenção do efeito esperado. A eficácia diz respeito à capacidade do fármaco produzir o efeito esperado, incluindo o monitoramento adequado por pelo menos 2 anos para avaliação de recorrência e a eficiência analisa os efeitos colaterais e adversos ocasionados pelo tratamento com o fármaco (COLE e RICCARDI, 2011 e MORONEY, 2014). Atualmente existem mais substâncias em estudo avaliadas quanto ao potencial antimicobacteriano (DHEDA *et al.*, 2010 e COLE e RICCARDI, 2011).

A descoberta de novos fármacos pode apresentar duas principais metodologias: fármaco-alvo ou alvo-fármaco. A predominância da abordagem fármaco-alvo é evidente, tendo em vista que todos os medicamentos em uso atualmente, os candidatos em ensaio clínico e a descoberta de fármacos anti-TB de origem natural massivamente foram obtidos a partir deste método envolvendo *screening* contra o patógeno (LECHARTIER *et al.*, 2014). Esta estratégia reconhece a interação fármaco-alvo e permite avaliar concentrações inibitórias mínimas (MIC), demonstrando sua importância, ainda que o conhecimento sobre o mecanismo de ação permaneça em grande parte ausente (KOUL *et al.*, 2011).

O sequenciamento do genoma do *M. tuberculosis* e novas ferramentas pós-genômicas têm possibilitado estudos de novos candidatos a fármacos por via alvo-fármaco. Embora a validação do alvo em potencial esteja presente, geralmente esta abordagem não avalia o MIC e incorre na incapacidade do fármaco obtido adentrar a complexa estrutura celular micobacteriana para alcançar o alvo, devido à ação de bombas de efluxo ou inativação. Além disso, para muitos alvos essenciais, não foram identificados inibidores específicos com propriedades medicamentosas (COLE e RICCARDI, 2011 e LECHARTIER *et al.*, 2014).

O incentivo para o desenvolvimento de fármacos promissores para o tratamento da TB resistente surgiu ao longo dos últimos 10 anos a partir de investimentos feitos por cientistas, órgãos de financiamento, organizações e de departamentos desenvolvidos pela OMS (ZUMLA *et al.*, 2013). Um dos programas desenvolvidos pela Organização Internacional STOP TB, o *Global Drug Facility*, elevou de 10 para 19, a base de segunda linha de fármacos anti-TB entre 2009 e 2014 e, conseqüentemente, reduziu o custo dos medicamentos envolvidos na terapia. No período de 2013-2014, a OMS implementou o uso da bedaquilina (**Figura 9**) no tratamento da MDR-TB após 50 anos de descoberta da rifampicina, obtida através da triagem de 70.000 substâncias contra *M. smegmatis* e recomendada como parte do tratamento para TB multidroga-resistente quando alternativas não forem eficazes e disponíveis (CHAN *et al.*, 2013; WHO, 2014a e ZUMLA *et al.*, 2014b).

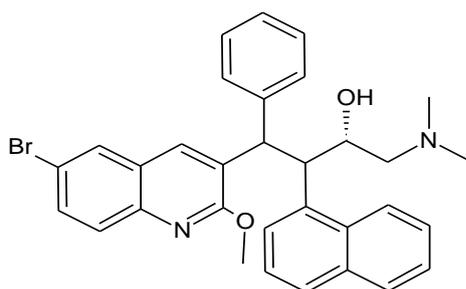


Figura 9. Estrutura química do fármaco anti-TB bedaquilina.

As características e aspectos relevantes dos principais fármacos utilizados atualmente no tratamento da TB foram listados de forma sucinta na **Tabela 1**.

Tabela 1. Principais fármacos anti-TB em uso clínico e seus alvos celulares.

Fármaco	Alvo	Referências
Rifampicina e Rifabutina	Subunidade β da RNA polimerase-DNA dependente (Inibe transcrição)	COLE e RICCARDI, 2011 ZUMLA <i>et al.</i> , 2013
Isoniazida	Enoil-ACP redutase (inibe síntese de ácidos micólicos)	JANIN <i>et al.</i> , 2007 ZUMLA <i>et al.</i> , 2013 e 2014a
Etambutol	Arabinosil transferase (Inibe síntese de arabinogalactanos)	ZUMLA <i>et al.</i> , 2013
Pirazinamida	Componente S1 da subunidade 30S ribossomal (Inibe tradução e acidificação intracelular)	ZUMLA <i>et al.</i> , 2013 e 2014a
Estreptomicina, Canamicina e Amicacina	Subunidade 30S ribossomal (Inibe síntese protéica)	ZUMLA <i>et al.</i> , 2013
Capreomicina	Subunidade B2a ribossomal (Inibe tradução)	ZUMLA <i>et al.</i> , 2013
Viomicina	Subunidade B2a ribossomal (inibe tradução)	LY <i>et al.</i> , 2010
Fluoroquinolonas	Enzima DNA girase e DNA topoisomerase (Inibe síntese de DNA)	ZUMLA <i>et al.</i> , 2013 KWON <i>et al.</i> , 2014
Ácido <i>p</i>-aminosalicílico	Enzima diidropteroato sintase (Inibe biossíntese de folato)	ZUMLA <i>et al.</i> , 2013
Cicloserina	D-alanina racemase e ligase (Inibe síntese de peptideoglicanos)	ZUMLA <i>et al.</i> , 2013
Protionamida	Enoil-ACP redutase (inibe síntese de ácidos micólicos)	JANIN <i>et al.</i> , 2007
Terizidona	D-alanina racemase e ligase (Inibe síntese de peptideoglicanos)	ARBEX <i>et al.</i> , 2010
Etionamida	Enoil-ACP redutase (inibe síntese de ácidos micólicos)	ZUMLA <i>et al.</i> , 2013
Linezolida	Componente 23S da subunidade 50S ribossomal (Inibe síntese protéica)	COLE e RICCARDI, 2011 KWON <i>et al.</i> , 2014
Clofazimina	Cadeia transportadora de elétrons	LU <i>et al.</i> , 2011
Imipenem / Cilastatina Amoxicillina/ Clavulanato	β -lactamases (Inibe síntese de parede celular)	ZUMLA <i>et al.</i> , 2013 CASSIR <i>et al.</i> , 2014
Tioacetazona	Ciclopropanação da cadeia meromicolato (altera síntese de ácidos micólicos)	ALAHARI <i>et al.</i> , 2007
Bedaquilina	Subunidade c da ATP sintase (inibe ATP sintase micobacteriana)	CHAN <i>et al.</i> , 2013 STEHR <i>et al.</i> , 2014

1.4.1. Tratamento adjuvante direcionado à inflamação

Vários estudos têm avaliado abordagens de imunoterapias adjuvantes ao tratamento da TB resistente a fármacos com evidência científica substancial. O tratamento adjuvante consiste na combinação de imunomoduladores à terapia anti-TB. Possui como alvo pontos-chaves celulares relevantes objetivando aumentar a capacidade de eliminação ou contenção do *M. tuberculosis* através da redução do dano tecidual envolvido na resposta inflamatória excessiva (em casos clínicos severos) induzida pelo próprio bacilo, aumentando assim o sucesso do tratamento (KAUFMANN *et al.*, 2014).

Por conseguinte, a terapia adjuvante direcionada à inflamação visa diretamente a resposta imune do hospedeiro, embora não esteja restrita ou mutuamente exclua sua ação no controle da proliferação e eliminação do bacilo. A estratégia imunoterapêutica frequentemente foca na resposta imune celular (inata ou adaptativa), contudo outros alvos viáveis incluem a ação sobre a produção de peptídeos antimicrobianos do hospedeiro (KAUFMANN *et al.*, 2014). Esta estratégia terapêutica está associada a chances de redução do período de tratamento, como também no número de fármacos necessários a terapia convencional anti-TB, simplificação no tratamento da TB resistente, melhorando a eficácia dos fármacos de segunda linha, além da preservação da função pulmonar (HAWN *et al.*, 2013).

A utilização desta abordagem requer análise e métodos clínicos cuidadosamente avaliados. Deste modo, além da averiguação do grau de severidade em decorrência do desenvolvimento da imunopatologia, o período de intervenção deve ser essencialmente considerado, além da resposta do paciente ao tratamento monitorado, de modo que a intervenção no processo inflamatório desencadeado não afete as respostas anti-TB destinadas à eliminação do agente patogênico (ZUMLA *et al.*, 2014b; LECHARTIER *et al.*, 2014).

Estratégias imunomoduladoras descritas incluem a utilização de células estromais mesenquimais do próprio paciente para diminuição de danos teciduais pulmonares em pacientes infectados por TB resistente. A análise dos resultados obtidos na fase 1 mostrou perfil de utilização segura (SKRAHIN *et al.*, 2014). Em adição, uma ampla variedade de citocinas e seus inibidores, imunomoduladores químicos e biológicos têm sido avaliados quanto ao potencial para limitar a resposta inflamatória excessiva em casos graves da doença (ZUMLA *et al.*, 2014a).

Uma nova abordagem de utilização de fármacos com ação clínica estabelecida em processos inflamatórios diversos (glicocorticoides e anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs)) têm sido avaliada para o tratamento adjuvante da TB em diferentes modelos experimentais e na terapia humana (KAUFMANN *et al.*, 2014).

Descrições literárias mostram que o tratamento da TB do sistema nervoso central com glicocorticoides, dexametasona e prednisolona (**Figura 10**) reduz o déficit neurológico residual, diminui as concentrações de metaloproteinase-9 (MMP-9) e do fator de crescimento do endotélio vascular no fluido cerebrospinal, embora não previna disfunções neuronais nos casos de meningite tuberculosa, forma grave de TB extrapulmonar. O ensaio clínico foi conduzido em pacientes HIV-negativo apresentando meningite tuberculosa, necessitando de avaliação quanto à atuação destes fármacos nos casos de coinfeção. Além disso, efeitos adversos foram observados embora discretos e tratáveis (BUONSENSO *et al.*, 2010; PRASAD e SINGH, 2008). O aumento da sobrevida em pacientes com tuberculose HIV-positivo, sem manifestação dos sintomas da AIDS, pode ser obtido com a iniciação precoce da terapia anti-retroviral (TARV), exceto nos casos de meningite tuberculosa, embora a TARV afete a quantidade e qualidade da resposta imune a *M. tuberculosis* (KAUFMANN *et al.*, 2014).

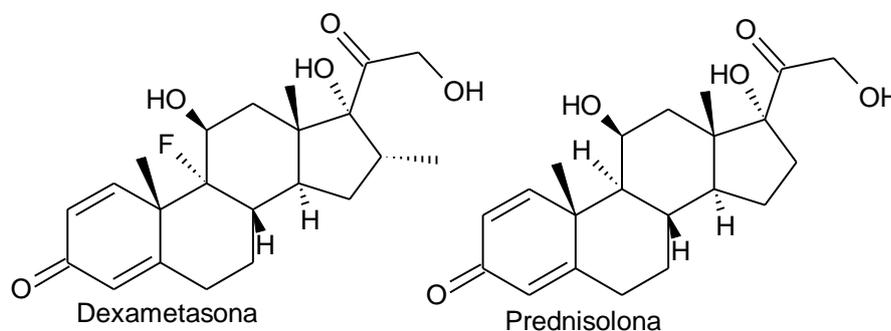


Figura 10. Estrutura química dos glicocorticoides dexametasona e prednisolona.

Além dos glicocorticoides, a utilização dos AINEs no tratamento adjuvante anti-TB em modelos murinos têm sido crescente, uma vez que os efeitos adversos dos glicocorticoides limitam severamente seu uso embora os AINEs também os apresentem. Camundongos BALB/c infectados com *M. tuberculosis* H37Rv e tratados oralmente com aspirina ou ibuprofeno (**Figura 11**) em combinação com fármaco anti-TB pirazinamida exibiram aumento na ação bactericida deste último, ainda que os efeitos adversos dos AINEs no tratamento a longo prazo e suas implicações clínicas

necessitem de investigações mais profundas (BYRNE *et al.*, 2007). Interessantemente, ensaios *in vitro* utilizando o ibuprofeno contra *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG e cepas multidroga-resistentes mostraram sua capacidade antimicobacteriana (GUZMAN *et al.*, 2013). Esta descrição científica corrobora os resultados obtidos na administração oral exclusiva de ibuprofeno no modelo experimental murino de tuberculose C3HeB/FeJ, reduzindo significativamente o tamanho e número de lesões pulmonares, bem como a carga bacteriana além de elevar a taxa de sobrevivência (VILAPLANA *et al.*, 2013).

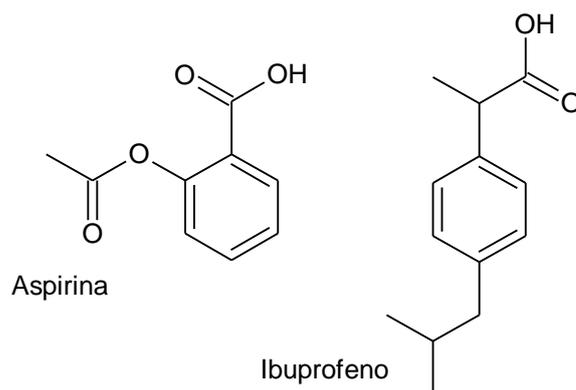


Figura 11. Estrutura química dos AINEs aspirina e ibuprofeno.

O fármaco de primeira-linha no tratamento da TB, pirazinamida, foi recentemente descrito quanto à atividade anti-inflamatória no tratamento de cultura de monócitos como também em modelo murino B6D2F1 infectados com *M. tuberculosis*, sendo responsável pela regulação negativa da resposta inflamatória mediada por TNF- α , IL-1 β e a quimiocina CCL2, o que demonstra importante ação *dual* na imunopatologia da TB (MANCA *et al.*, 2013).

A utilização do inibidor de fosfodiesterase-4, CC-3052, análogo à talidomida (fármaco antileprótico) (**Figura 12**) foi descrita positivamente no tratamento de coelhos infectados com *M. tuberculosis* aumentando a resposta ao tratamento anti-TB com isoniazida e eficaz na inibição da produção de TNF- α (SUBBIAN *et al.*, 2011). Inibidores de fosfodiesterase do tipo 3 e 5 também têm sido associados à redução do dano tecidual e carga bacteriana na TB (LECHARTIER *et al.*, 2014). As fosfodiesterases são membros de uma família de enzima que hidrolisam AMP cíclico (AMPc) e GMP cíclico (GMPc). O AMPc é um importante mensageiro intracelular secundário que em níveis aumentados possui efeito anti-inflamatório (KOO *et al.*, 2011).

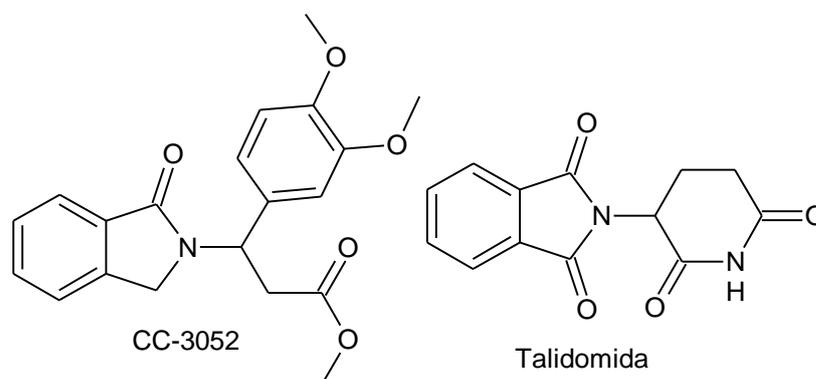


Figura 12. Estrutura química do inibidor de fosfodiesterase-4, CC-3052 e do fármaco antileprótico talidomida.

1.5. Produtos naturais no tratamento da TB

Segundo a OMS, 80% da população de países em desenvolvimento se utilizam de práticas tradicionais na atenção primária à saúde e, desse total, 85% fazem uso de plantas medicinais (uso etnobotânico). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais (CRAGG *et al.*, 2014).

Das 20 classes de antibacterianos, 70% dos antibióticos administrados na terapia de doenças são produtos naturais ou derivados dos mesmos, o que ressalta sua importância (DASHTI *et al.*, 2014).

Produtos naturais provenientes de plantas e micro-organismos fornecem uma ampla fonte de substâncias que exibem propriedades medicamentosas e inúmeras atividades biológicas, dentre elas, antimicobacteriana. A primeira substância capaz de inibir *in vitro* o crescimento de *M. tuberculosis* obtida de fonte natural foi a actinomicina. Dos fármacos utilizados atualmente no tratamento da TB, a estreptomicina, isolado de *Streptomyces griseus*, foi o primeiro produto natural, com eficaz efeito bactericida utilizado no tratamento da TB (ZUMLA *et al.*, 2014a). Outros fármacos anti-TB também são derivados de produtos naturais, tais como, a rifampicina, isoniazida, pirazinamida, amicacina, canamicina, capreomicina, cicloserina, ácido *p*-aminosalicílico e viomicina (**Figura 4-6**) (SALOMON e SCHMIDT, 2012 e DASHTI *et al.*, 2014).

Os produtos naturais possuem presença notável na terapia de infecções bacterianas, apesar da dormência científica no tratamento da tuberculose até 2012 (LECHARTIER *et al.*, 2014). Recentemente, o modo de ação da piridomicina (**Figura 13**) foi descrito, atuando através de um mecanismo similar ao da isoniazida, contudo a

piridomicina liga-se diretamente a InhA, uma proteína redutase transportadora de enoil-acil. Isto supera os problemas de resistência observados para a isoniazida, pró-fármaco que depende da enzima bacteriana KatG (catalase-peroxidase) para gerar uma forma ativa que se liga ao cofator NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo), formando um complexo que inativa InhA (HARTKOORN *et al.*, 2012). A piridomicina foi isolada inicialmente em 1953 a partir de *Streptomyces pyridomyceticus* e mais tarde mostrou-se também ser produzida por *Dactylosporangium fulvum* (CRAGG *et al.*, 2014) e tem sido chamada de isoniazida da natureza, estimulando recentes estudos acerca do seu potencial (GARCÍA *et al.*, 2012).

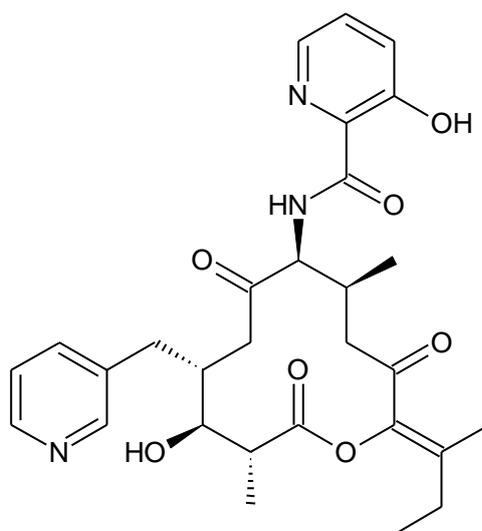


Figura 13. Estrutura química da piridomicina.

Diversas dificuldades estão associadas à descoberta de fármacos a partir de fontes naturais, envolvendo o paradigma dominante do processo de descoberta em grandes indústrias farmacêuticas, o apoio reduzido aos centros de pesquisa e a proposição de parcerias de estudo. A identificação de novas substâncias com atividade desejável possuem limitações técnicas superadas pela inserção de novas tecnologias e estratégias, como a geração de diversidade molecular a partir de fontes naturais e metodologias combinatórias. Além disso, ferramentas químicas e biológicas têm sido utilizadas para elucidação do alvo e da estrutura química dos princípios ativos, contribuindo para o uso de quantidades de amostra cada vez menores. Os empecilhos associados ao suprimento material de amostras e questões ambientais têm sido contornados com alternativas eficientes e economicamente viáveis para as fases mais avançadas da pesquisa (LI e VEREDAS, 2009 e SALOMON e SCHMIDT, 2012).

O estudo antimicrobiano de produtos naturais foi descrito em inúmeras revisões de literatura revelando promissora atividade anti-TB *in vitro* em culturas de *M.*

tuberculosis assim como em cultura de macrófagos infectados pelo mesmo. A avaliação do potencial *in vivo* em modelos animais tem sido crescente.

Salomon e Schmidt (2012) descreveram em sua revisão artigos publicados entre 2006-2009 abordando a atividade de produtos naturais na inibição do crescimento do *M. tuberculosis* e outras micobactérias patogênicas. Seis substâncias apresentaram MIC <1 µg/mL. Pseudopironina B, isolada do bacilo gram-negativo *Pseudomonas fluorescens* apresentou MIC 0,78 µg/mL. O tiopeptídeo nocarditicona isolado a partir de *Nocardia pseudobrasilienses* exibiu MIC entre 0,025-1,56 µg/mL e o peptídeo cíclico, lariatina A, isolado de *Rhodococcus jostii*, MIC 0,39 µg/mL. O análogo dihidrogenado de uma nova ditiodicetopiperazina isolado de *Menisporopsis theobromae* obteve MIC 0,8 µg/mL enquanto dois alcaloides isolados de *Allium stipitatum*, *N*-óxido-2-(metil-di-tio)piridina e *N*-óxido-2-[(metil-tioetil)di-tio]piridina apresentaram MIC de 0,1 µg/mL (**Figura 14**).

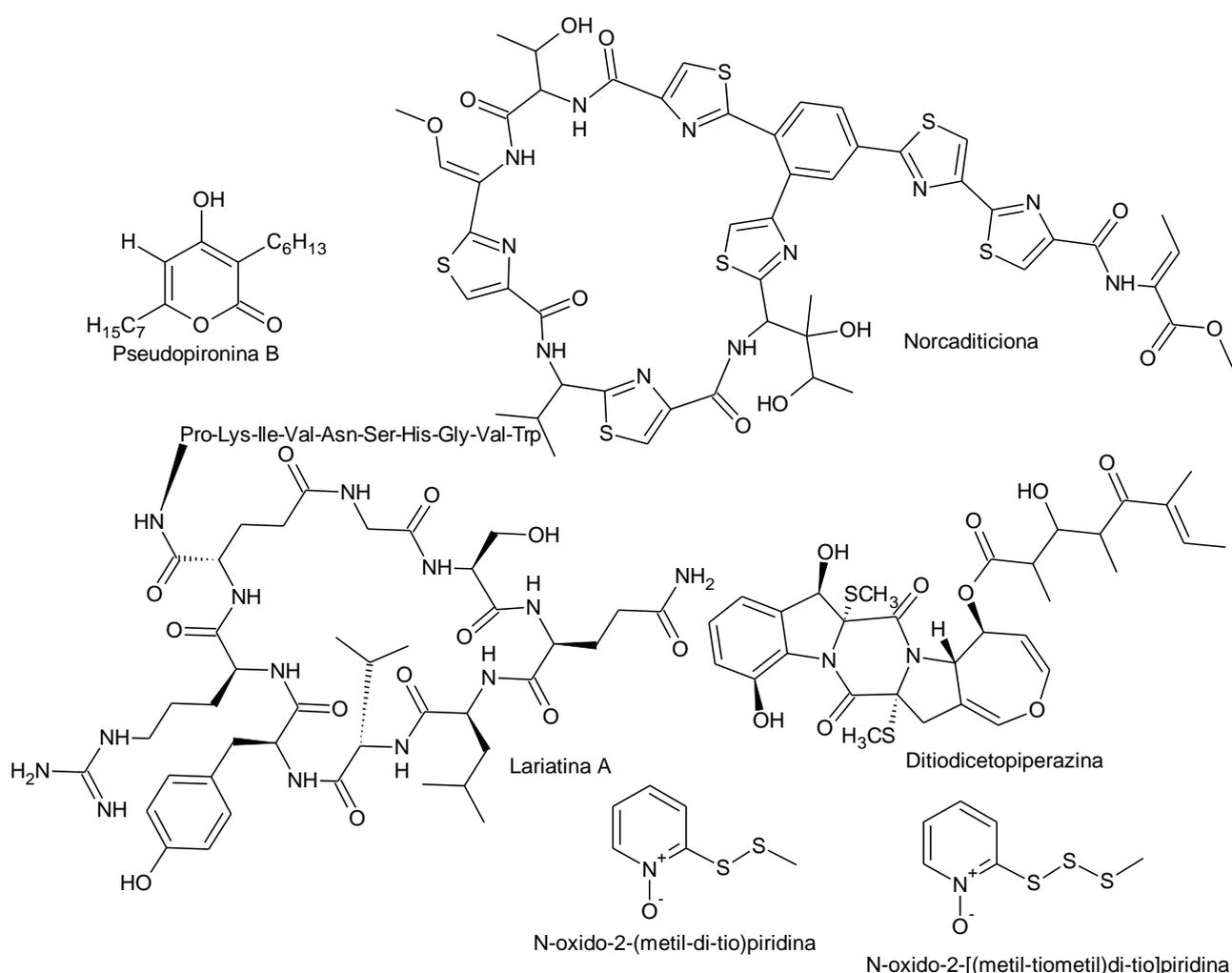


Figura 14. Estrutura química de substâncias naturais com atividade antimicobacteriana.

Santosh e Suriyanarayanan (2014) descreveram em sua revisão 127 substâncias naturais com atividade antimicrobacteriana de diferentes classes, das quais 27 apresentavam MIC <10 µg/mL. Destacando o terpeno farnesol capaz de inibir bombas de efluxo, e outras substâncias, como o flavonoide (2S)-5,7,2'-trihidroxi-flavanona, a quinona 7-metiljuglona e o terpeno ácido oleanólico capazes de atuar de forma sinérgica a agentes anti-TB convencionais (**Figura 15**).

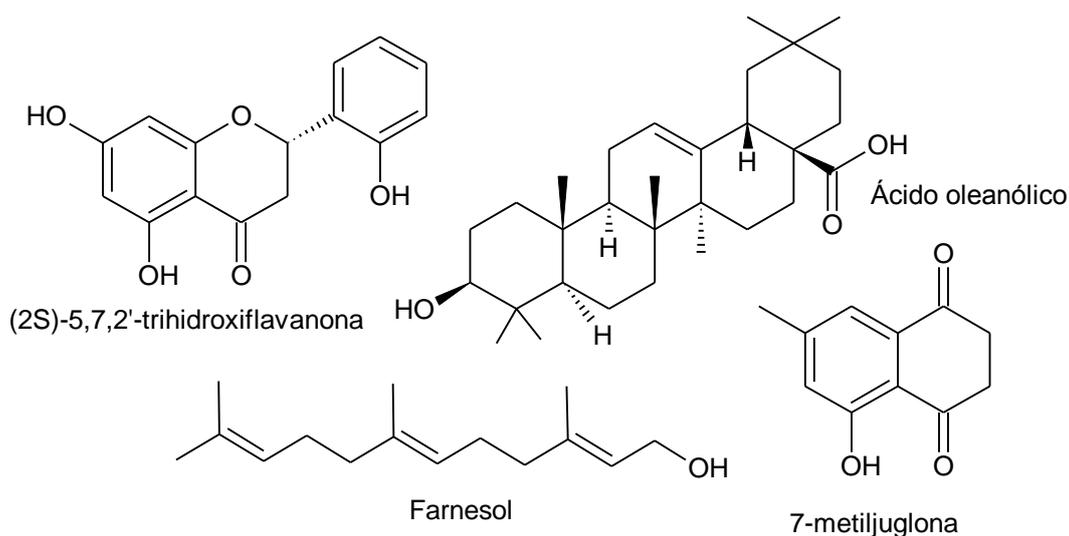


Figura 15. Estrutura química de substâncias naturais com atividade antimicrobacteriana.

Com atenção exclusiva aos produtos naturais com atividade *dual*, antimicrobacteriana e anti-inflamatória foram avaliados 200 peptídeos sintetizados a partir da informação genômica de micobacteriófagos. A substância PK34 (patente Nº CN 102241748 B), um polipeptídeo de cadeia linear com estrutura primária contendo 34 resíduos de aminoácidos apresentou MIC de 50 µg/mL em ensaios *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Rv e exibiu eficácia *in vivo* na eliminação de *M. tuberculosis* comparável a rifampicina em modelo murino BALB/c infectado por via intravenosa por *M. tuberculosis* H37Rv. A capacidade anti-inflamatória de PK34 foi demonstrada pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, sendo um candidato anti-TB promissor e estratégico para o tratamento *dual* em casos graves da TB (WEI *et al.*, 2013).

Os flavonoides, polifenóis sintetizados em relativa abundância por vegetais, têm sido descritos por exibirem notável atividade inibidora no crescimento de *M. tuberculosis*. Dentre os flavonoides, as chalconas possuem inúmeras descrições demonstrando seu potencial promissor no processo de descoberta de novos fármacos anti-TB (SINGH *et al.*, 2014).

1.6. A classe das chalconas e seu potencial anti-TB

As chalconas (1,3-diaril-2-propen-1-onas) são moléculas precursoras de flavonas, flavonóis e isoflavonas, amplamente distribuídas nos vegetais e tem despertado grande interesse quanto ao potencial farmacológico a elas relacionado (NOWAKOWSKA, 2007; RAHMAN, 2011). Sua estrutura básica é resultado da rota biossintética mista entre a via do ácido chiquímico e a do acetato. O ácido chiquímico é o precursor do composto inicial da rota biossintética, a fenilalanina. Este aminoácido aromático sofre diversas modificações estruturais catalisadas por enzimas específicas até a formação do *p*-cumaroil-CoA. Posteriormente, este reage com três moléculas de malonil-CoA, sob ação da enzima chalcona sintase, originando a estrutura básica das chalconas (LUSSIER *et al.*, 2013) (**Figura 16**).

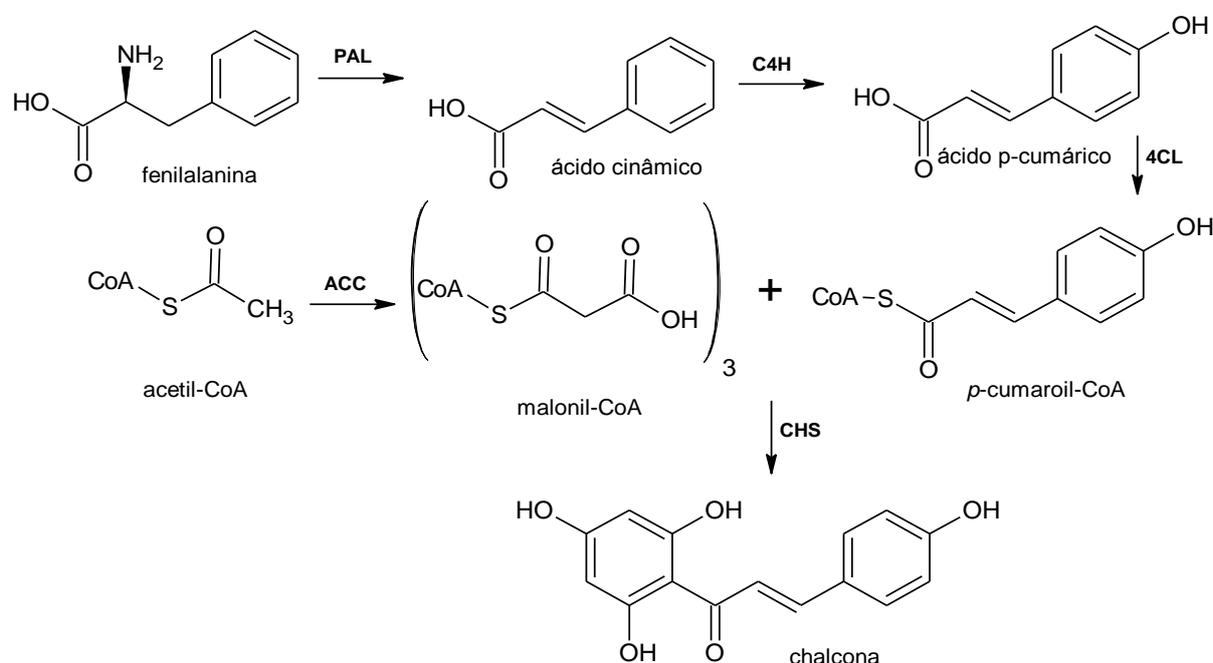


Figura 16. Rota biossintética comum dos flavonoides. PAL- fenilalanina amônia-liase, C4H-cinamato-4-hidroxilase; 4CL- 4-cumaroil-CoA ligase; ACC- acetil-CoA carboxilase; CHS- chalcona sintase (modificado de LUSSIER *et al.*, 2013).

Quimicamente são conhecidas como cetonas aromáticas α - β insaturadas, por consistirem de dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia aberta de três átomos de carbono, no qual o carbono 3 possui uma instauração, além de poderem apresentar uma gama de substituintes nos anéis aromáticos (NOWAKOWSKA, 2007; RAHMAN, 2011). Na classe das chalconas, diferentemente do observado para as demais classes de flavonoides, o núcleo aromático próximo a carbonila é numerado com números ordinários seguidos de uma linha (') e o núcleo aromático distante da mesma com

números ordinários somente (**Figura 17**). Isto ocorre devido ao fato de que as primeiras chalconas identificadas foram comparadas às acetofenonas onde é empregado este sistema de numeração (SIMÕES *et al.*, 2010).

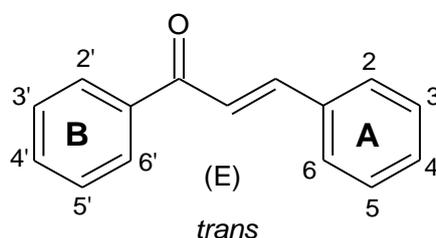


Figura 17. Estrutura básica das chalconas (NOWAKOWSKA, 2007).

Naturalmente as chalconas podem ser encontradas em caules, raízes, folhas, frutos e sementes de plantas e exibem substituintes comuns nos anéis aromáticos, como hidroxilas, metoxilas, *O*- e *C*- glicosilações e *C*-alquilas distribuídos nas posições *orto*, *meta* e *para* (SIMÕES *et al.*, 2010).

O advento da síntese orgânica das chalconas tem acelerado o processo de descoberta de novos fármacos além de oferecer a vantagem da rápida produção de um número considerável de substâncias potencialmente ativas com diversos padrões de substituições (BANDGAR e GAWANDE, 2010). A introdução de substituintes nos dois anéis aromáticos tem sido muito utilizada, conduzindo estudos relacionando a estrutura-atividade com o potencial farmacológico das chalconas possibilitando a seleção de protótipos promissores para o desenvolvimento de novos agentes antituberculose (GARCÍA *et al.*, 2012).

A obtenção das chalconas ocorre através da reação de condensação de aldeídos aromáticos e acetofenonas na presença de catalisadores (BUKHARI *et al.*, 2013a; BUKHARI *et al.*, 2013b e RAHMAN, 2011).

Inúmeras técnicas têm sido descritas para síntese de chalconas, dentre estas se destaca o método de Claisen-Schmidt, na presença de bases como catalisadores, como Ba(OH)₂, LiOH ou irradiação por micro-ondas e ultrassom. O método de Claisen-Schmidt consiste na reação de um derivado escolhido de acetofenona com os aldeídos aromáticos apropriados (BUKHARI *et al.*, 2013b), um método fácil, simples, versátil, de baixo custo (RAHMAN, 2011) e com rendimentos muito variados, de 5% a 90% (GO *et al.*, 2005).

A classe das chalconas, obtidas de fontes naturais ou sintéticas, possui diversas descrições de atividade biológica incluindo atividade antimicobacteriana (NOWAKOWSKA, 2007; BANDGAR e GAWANDE, 2010 e SINGH *et al.*, 2014).

Com atenção específica às chalconas obtidas de fontes naturais, foram descritas 22 substâncias com elevado potencial antimicobacteriano, em ensaios utilizando diferentes métodos de avaliação, assim como diferentes cepas de *Mycobacterium*, contudo o mecanismo de ação para as substâncias avaliadas foi descrito somente em um estudo no qual a chalcona buteína (**Figura 18**) foi a mais ativa contra *M. bovis* BCG, *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* H37Ra (MIC₉₉ 43 µg/mL). A inibição do crescimento micobacteriano foi associada à inibição da biossíntese de ácidos graxos e micólicos, especificamente a via FAS-II (BROWN *et al.*, 2007 e BUKHARI *et al.*, 2013a).

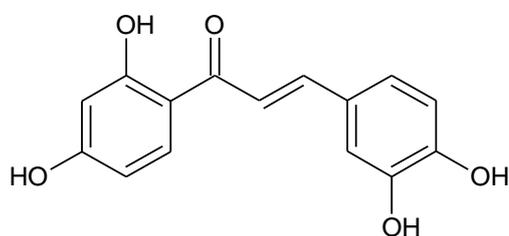


Figura 18. Estrutura química da buteína.

No âmbito das chalconas obtidas por síntese orgânica, 53 substâncias foram descritas como ativas quanto à atividade antimicobacteriana. O aprofundamento dos estudos de relação estrutura-atividade também se faz presente, embora o mecanismo de ação permaneça pouco explorado. Duas chalconas acetilênicas, 2-eteniloxi-2',4'-dimetoxichalcona e 3-eteniloxi-2',3',4'-trimetoxichalcona (**Figura 19**), foram capazes de inibir o crescimento de culturas de *M. tuberculosis* em estágio não-replicante (MIC 14,9 µM e 13,1 µM respectivamente). O aumento no número de metoxilações juntamente a presença do grupo acetilênico foi associado à atividade inibitória contra cultura micobacteriana não-replicante (HANS *et al.*, 2010).

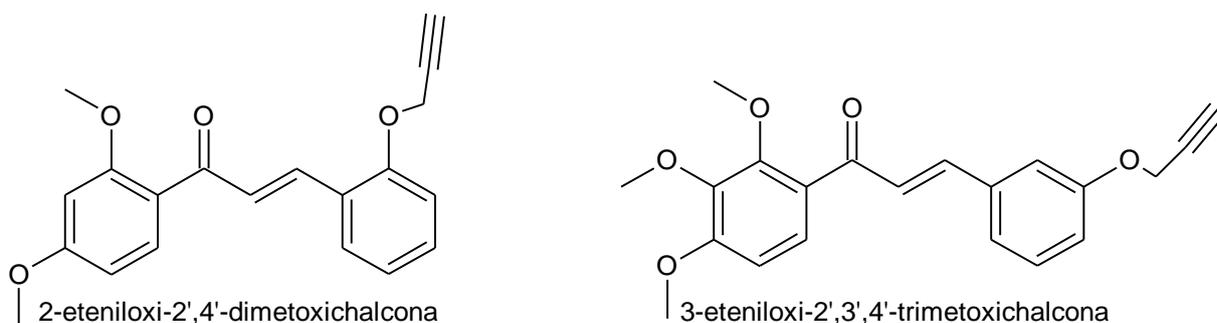


Figura 19. Estrutura química das chalconas acetilênicas com atividade antimicobacteriana.

As chalconas contendo em sua estrutura padrão a inserção do substituinte aromático quinolina no anel B através de amino-ligações e de 2,3- e 2,5-dimetoxifenil no anel A (**Figura 20**) exibiram atividade contra *M. tuberculosis* H37Rv (MIC 3,12 µg/mL para ambas) e em comparação com a pirazinamida (MIC 50 µg/mL), as quinolinachalconas foram mais potentes. Além disso, estas mostraram ser não-tóxicas e portanto seletivas nos ensaios de citotoxicidade efetuados em linhagem celular VERO e macrófagos MBMDM (macrófagos derivados de medula-óssea murina) (SHARMA *et al.*, 2009).

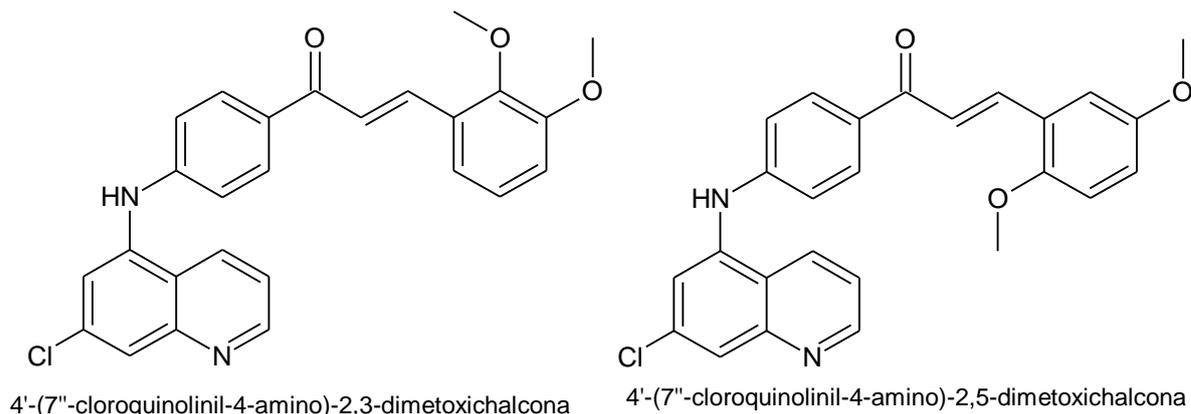


Figura 20. Estrutura química das quinolinachalconas com atividade antimicobacteriana.

O potencial anti-TB *in vivo* para a classe das chalconas foi descrito somente no estudo de Marrapu *et al.* (2011) utilizando moléculas híbridas de chalconas com inserção do grupo azol. A substância 2'',4''-difluorobenziloxi-4-imidazolil-chalcona (**Figura 21**) foi ativa contra uma suspensão da cultura de *M. tuberculosis* H37Rv (10^5 bacilos), com MIC de 1,56 µg/mL e atóxica para cultura celular de VERO e MBMDM (IS ≥ 10). Além disso, a mesma foi capaz de inibir o crescimento intracelular micobacteriano em 71% em modelo MBMDM infectados por *M. tuberculosis* H37Rv). O potencial *in vivo* da chalcona foi avaliado em modelo de camundongos suíços infectados pelo *M. tuberculosis* H37Rv (10^7 CFU/animal, i.v.) e tratados oralmente com a mesma (100 mg/kg) durante 28 dias, mostrando moderado efeito inibitório (40%) contra o crescimento micobacteriano.

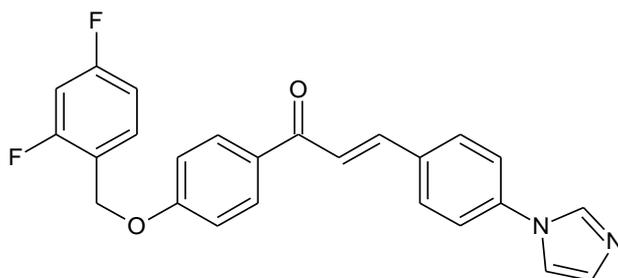


Figura 21. Estrutura química da substância 2',4'-difluorobenziloxi- 4-imidazolil-chalcona com atividade antimicobacterina *in vivo*.

1.7. Chalconas anti-inflamatórias e promissoras contribuições para o tratamento adjuvante da TB

Tendo em vista, os efeitos adversos observados não somente no tratamento anti-inflamatório convencional, como também na utilização dos glicocorticoides e AINEs, na terapia adjuvante no tratamento da TB, tornou-se prioridade a busca por novas substâncias com maior potencial de atividade e minimização dos efeitos tóxicos e possíveis interações medicamentosas.

Diversas substâncias pertencentes à classe das chalconas foram descritas com capacidade de inibir a produção de mediadores químicos, assim como a expressão de genes relacionados ao processo inflamatório (BUKHARI *et al.*, 2013c). Este potencial é importante uma vez que macrófagos alveolares de pacientes com infecção micobacteriana exibem expressão aumentada de iNOS (óxido nítrico sintase induzida) e excessiva produção de TNF- α (GUZIK *et al.*, 2003).

Vários alvos importantes envolvidos na progressão exacerbada da resposta inflamatória têm sido avaliados no estudo da classe das chalconas. As descrições de chalconas com atividade anti-inflamatória estão implicadas com alvos relacionados à peroxidação lipídica, indução de heme-oxigenase-1 (HO-1), inibição da produção de PGE₂, TNF- α , NO, dentre outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão celular, além da inibição da expressão gênica da iNOS, COX-2 e NF- κ B e outros genes expressos durante o processo inflamatório (KONTOGIORGIS *et al.*, 2008; BUKHARI *et al.*, 2013c).

A substância 3'-isopropoxichalcona (**Figura 22**) foi descrita por inibir a atuação de neutrófilos em respostas inflamatórias, através da inibição da degranulação e da liberação de ânions superóxido e elastase. Além disso, esta chalcona foi capaz de aumentar os níveis de AMPc por inibir a atividade da fosfodiesterase específica para o

mesmo, suprimindo a ativação neutrofílica (HWANG *et al.*, 2006; BUKHARI *et al.*, 2013c).

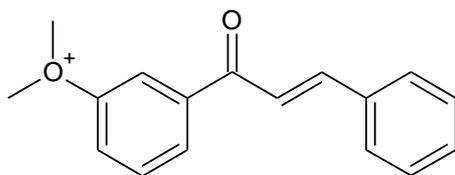


Figura 22. Estrutura química da 3'-isopropoxichalcona.

A substância 2'-metoxi-4',6'-bis(metoximetoxi)chalcona, MBMC (**Figura 23**), mostrou-se capaz de inibir a expressão enzimática da iNOS e consequente produção de óxido nítrico através da regulação negativa de vias inflamatórias (NF- κ B, p38 e JNK) em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Além disso, foram capazes de induzir a enzima citoprotetora HO-1, essencial em várias atividades protetoras do endotélio vascular quando em situações de stress oxidativo, prevenindo ou minimizando o dano oxidativo endotelial em condições hiperinflamatórias (JIN *et al.*, 2009). A substância 3,4,5,3',4',5'-hexametoxichalcona (**Figura 23**) entre outras chalconas metoxiladas também apresentaram capacidade de induzir a enzima HO-1 e inibir a produção de NO e TNF- α e a expressão de iNOS (SAWLE *et al.*, 2008).

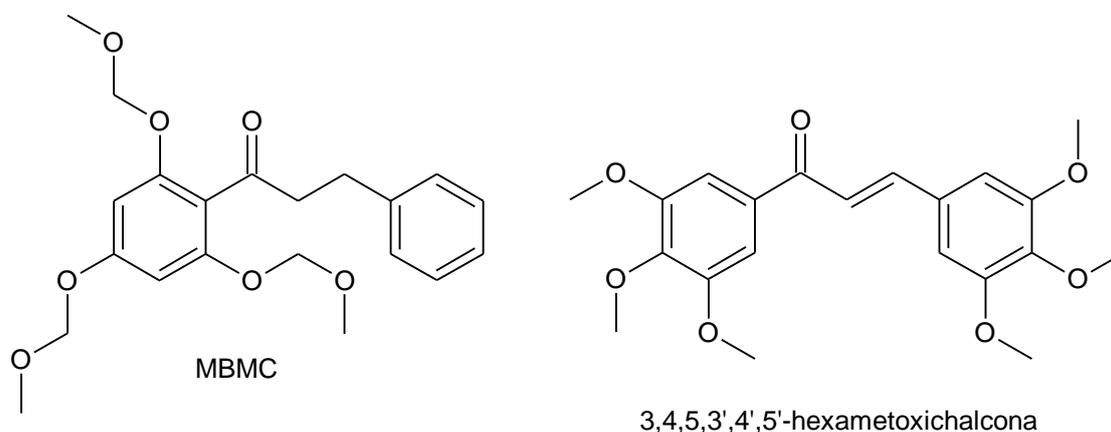


Figura 23. Estrutura química das chalconas MBMC e 3,4,5,3',4',5'-hexametoxichalcona.

A inibição da expressão de moléculas de adesão celular também é um alvo importante para o controle da migração celular exacerbada ao foco inflamatório. A isoliquiritigenina demonstrou capacidade de diminuir os níveis de expressão de VCAM-1 e ICAM-1 inibindo a migração celular periférica, assim como a 2'-hidroxichalcona,

sendo esta última capaz de inibir também a expressão de E-selectina (**Figura 24**) (BUKHARI *et al.*, 2013c).

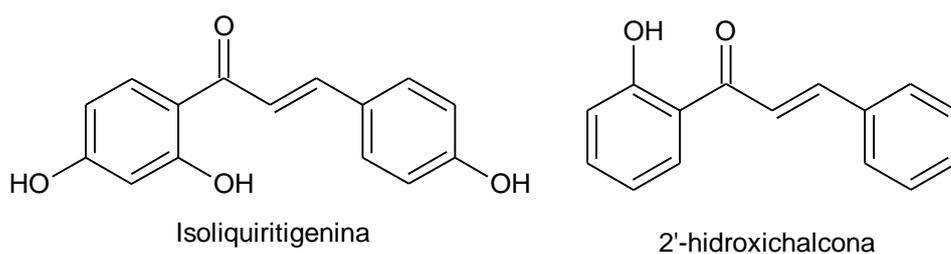


Figura 24. Estrutura química das chalconas isoliquiritigenina e 2'-hidroxichalcona.

As chalconas 3,4,3',4'-tetrametoxi-2'-hidroxi-chalcona e 3,4-dimetoxi-4'-dimetilaminochalcona (**Figura 25**) foram descritas por serem capazes de inibir a produção de LTB_4 , em neutrófilos humanos (KONTOGIORGIS *et al.*, 2008). No estado hiperinflamatório, a produção excessiva de leucotrieno B_4 (LTB_4) foi associado à susceptibilidade a infecções micobacterianas, devido conduzir a produção elevada de $TNF-\alpha$ e consequente necrose em macrófagos (TOBIN *et al.*, 2012).

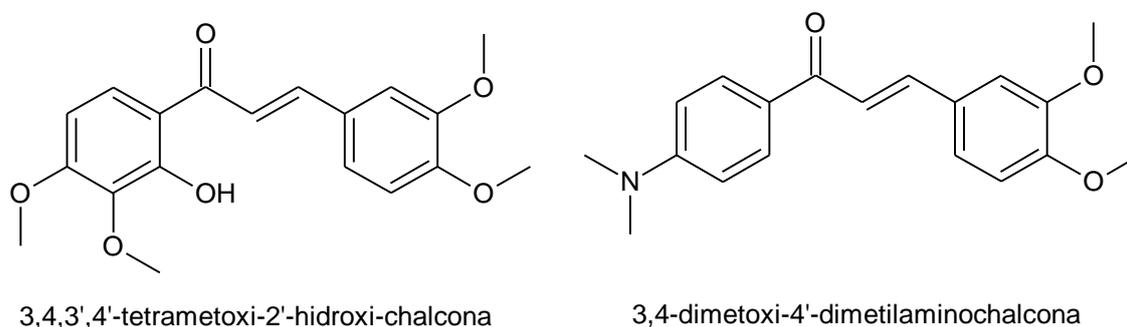


Figura 25. Estrutura química das chalconas 3,4,3',4'-tetrametoxi-2'-hidroxi-chalcona e 3,4-dimetoxi-4'-dimetilaminochalcona.

Na literatura têm sido descritas características funcionais associadas à propriedade anti-inflamatória das chalconas, tais como presença de grupos metoxilas nas posições 3, 4 e 5 de ambos os anéis da estrutura padrão, de grupo hidrofóbico (posição 2) e grupo hidroxil (posição 6) do anel A, grupo 2-OH ou 4-azida no anel A e 4'-metil no anel B (NOWAKOWSKA, 2007; revisado por BUKHARI *et al.*, 2013c.).

Em adição ao número de descrições literárias relacionadas à capacidade anti-inflamatória encontrada para a classe das chalconas, também são observadas chalconas com atividade antimicobacteriana, muitas vezes similares, embora o número de chalconas descritas para esta última seja menor quando comparado à primeira. Os

estudos majoritariamente enfocam tais atividades de forma mutuamente exclusivas. Entretanto, a presença da dupla atividade para uma mesma substância natural é interessante e almejada para os quadros graves de TB, visando à redução do número de fármacos a serem administrados e atuação em ambos os pontos-chaves, controle da proliferação do bacilo e na resposta imune inflamatória excessiva.

Recentemente, derivados de azochalconas foram avaliados *in vitro* num mesmo trabalho quanto à atividade anti-inflamatória, antimicobacteriana e antioxidante. As amostras mais ativas para estas atividades avaliadas não tiveram o amplo potencial inter-relacionado (ROHINI *et al.*, 2015). Vale ressaltar que a abordagem de tratamento *dual* para a TB advém de conhecimentos contemporâneos sobre a imunopatologia da doença para casos graves de infecção por cepas hipervirulentas.

Para as chalconas que apresentam descrição literária antimicobacteriana e são encontrados estudos demonstrando atividade anti-inflamatória, podem ser citadas a chalcona natural buteína (**Figura 18**), a isoliquiritigenina (**Figura 24**), a chalcona prenilada xantoumol, a licochalcona A, a isobavachalcona e 4-hidroxilonchocarpina (**Figura 26**) (YADAV *et al.*, 2011). Deste modo, diversas chalconas podem ter seu potencial adjuvante direcionado à inflamação na TB e sua capacidade antimicobacteriana explorados intrinsecamente em estudos *in vitro* e *in vivo* adequados.

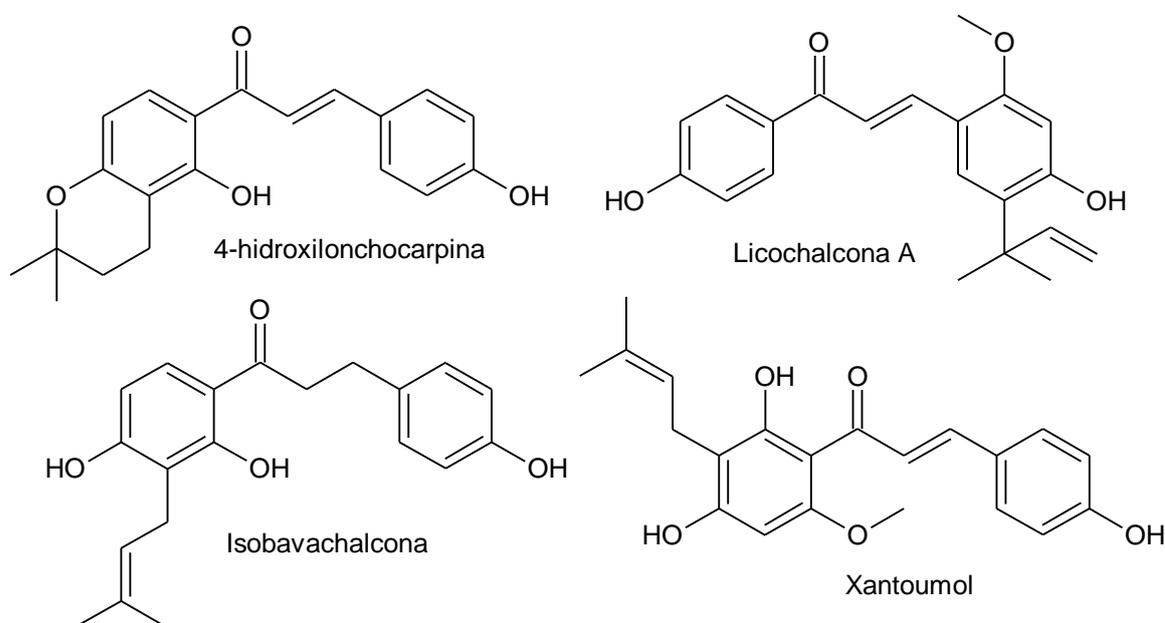


Figura 26. Estrutura química de chalconas anti-inflamatórias com descrição para atividade antimicobacteriana.

Para a classe das chalconas pode ser encontrado o enfoque de atividade anti-inflamatória conjuntamente a atividade antibacteriana (FELDMAN *et al.*, 2011;

BONIFAIT *et al.*, 2014). A isopenteniloxichalcona, 4-hidroxicordoína, metabólito natural obtido de *Lonchocarpus neuroscapha* Benth. (Fabaceae) foi capaz de reduzir a ativação do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), da proteína ativadora-1 (AP-1) e a expressão de MMP-9, além de inibir de forma seletiva e em baixas concentrações de uso, o crescimento de bactérias periodontais associados à resistência a fármacos e inflamação crônica (FELDMAN *et al.*, 2011). Bonifait *et al.* (2014) demonstraram em seu trabalho, a síntese da 2,6-dihidroxi-4-isopenteniloxichalcona e sua capacidade de inibir a produção de IL-8, a quimiocina CCL5 e a metaproteinase MMP-2, além do seu efeito em patógenos bacterianos orais resistentes. Estes estudos demonstraram que as chalconas além de serem capazes de atuar em populações bacterianas resistentes também minimizavam os danos teciduais provenientes da resposta inflamatória à infecção (**Figura 27**).

Entretanto, a abordagem de utilização das chalconas num âmbito específico de tratamento *dual* para o gênero *Mycobacterium* permanece não explorada.

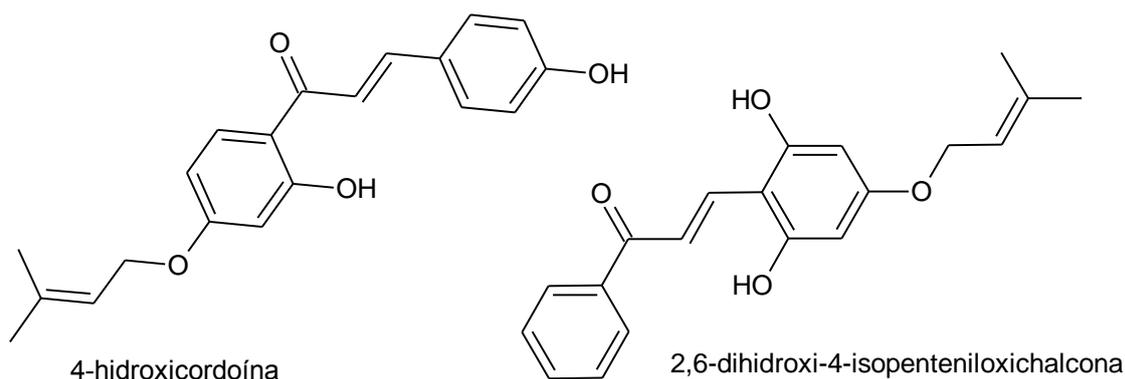


Figura 27. Estrutura química de chalconas com atividade anti-inflamatória e antibacteriana.

2. JUSTIFICATIVA

O aumento na prevalência de cepas *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a múltiplas drogas (MDR) ou extensivamente resistentes (XDR) representa uma ameaça ao controle da tuberculose (TB) (ZUMLA *et al.*, 2013). Existe uma necessidade urgente de se buscar novas substâncias que possibilitem um tratamento anti-TB eficaz, especialmente para as formas graves e disseminadas da doença, tais como meningite e pericardite, frequentemente associadas com uma resposta inflamatória exacerbada (GARLANDA *et al.*, 2007).

Dados recentes demonstram que a resposta inflamatória excessiva contribui para a severidade da patologia pulmonar, conduzindo à necrose tecidual, formação de cavidades e promoção da disseminação micobacteriana (ORME, 2013 e AMARAL *et al.*, 2014). Neste contexto, a utilização de fármacos anti-inflamatórios para o tratamento adjuvante da TB têm apresentado efeitos benéficos substanciais. Sob este prisma, também se ressalta a importância do desenvolvimento de novas substâncias com atividade *dual*, antimicobacteriana e anti-inflamatória, visando à redução do número de fármacos a serem administrados e atuação no controle da proliferação do bacilo e prevenção ou minimização dos danos teciduais.

As chalconas são metabólitos secundários encontrados em diversas plantas podendo também ser sintetizadas e são conhecidas por exibir uma vasta gama de atividades farmacológicas incluindo ações anti-inflamatória e antituberculose (BUKHARI *et al.*, 2013a; BUKHARI *et al.*, 2013c e SANTOSH e SURIYANARAYANAN, 2014).

Neste trabalho, analisamos uma série de chalconas substituídas quanto a propriedades anti-inflamatórias, avaliando os seus efeitos imunomoduladores sobre macrófagos estimulados com LPS, assim como, suas propriedades antimicobacterianas, avaliando os efeitos inibitórios sobre o crescimento de cepas avirulentas e virulentas em cultura bacteriana ou em macrófagos infectados. A chalcona mais ativa, exibindo atividade *dual in vitro* foi utilizada para tratamento de camundongos C57Bl/6 infectados por cepa *M. tuberculosis* hipervirulenta, para avaliação do efeito do tratamento na imunopatologia da doença e no controle do crescimento bacteriano.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar o potencial de 41 chalconas sintéticas quanto à capacidade anti-inflamatória e antimicobacteriana e seu impacto na imunopatologia induzida em camundongos por cepas Mtb hipervirulentas focando uma abordagem *dual* de tratamento anti-TB.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade anti-inflamatória das chalconas em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS quanto à capacidade de inibir a produção dos mediadores pró-inflamatórios NO, IL-1 β e PGE₂ e TNF- α e aprofundamento desta avaliação com macrófagos alveolares MH-S estimulados com lisado de *M. bovis* BCG.

- Avaliar as chalconas quanto à citotoxicidade celular através da análise da liberação de lactato desidrogenase e funcionamento mitocondrial;

- Investigar o mecanismo de ação das chalconas ativas em inibir a produção de NO através da verificação do potencial antioxidante dessas no sequestro do radical NO e de radicais livres de forma geral como também na expressão enzimática da iNOS e da COX-2 envolvidas no processo inflamatório;

- Avaliar os efeitos inibitórios das chalconas no crescimento de cepas micobacterianas avirulentas e virulentas em cultura bacteriana e em macrófagos infectados;

- Comparar os efeitos antimicobacterianos das chalconas associadas ao fármaco padrão rifampicina frente ao crescimento de cepa Mtb virulenta em cultura bacteriana e na viabilidade de bactérias extracelulares agregadas em clumps;

- Avaliar os efeitos terapêuticos da chalcona mais ativa, com atividade *dual*, (selecionada em experimentos *in vitro*) em modelo murino de tuberculose 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

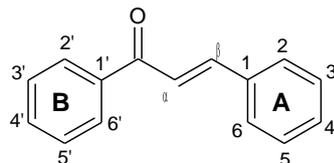
4.1. Síntese e caracterização das chalconas e preparação de uso

As chalconas (**2-41**) foram obtidas através de uma parceria entre o Laboratório de Biologia do Reconhecer/UENF e o Laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Rodrigo Otavio de Souza do Instituto de Química/UFRJ. A estratégia de síntese foi baseada na reação de Claisen-Schmidt entre aldeídos aromáticos apropriadamente substituídos com acetofenonas em etanol absoluto a temperatura ambiente. As chalconas foram purificadas através de recristalização com etanol aquecido. A chalcona sintética 1,3-difenil-2-propenona (**1**) foi obtida comercialmente (Sigma Aldrich, MO, USA). As estruturas das 41 chalconas estão apresentadas na **Tabela 2** (p. 37). A caracterização estrutural para as chalconas **2-41** foram apresentados em Ventura *et al.*, 2015 (anexo). As amostras das chalconas obtidas foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich), na concentração estoque de 20 mg/mL e filtradas em membrana de nylon estéril 0,22 µm (Corning Inc., PA, USA) para esterilização e mantidas no freezer - 20°C até sua utilização.

4.2. Cultivo celular

As linhagens murinas de macrófagos peritoneais RAW 264.7 e macrófagos alveolares MH-S obtidas da ATCC (VA, USA) foram cultivadas em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina (20 µg/mL) (Gibco/Invitrogen, NY, USA) a 37°C e 5% de CO₂. Quando em experimentação, as células RAW 264.7 (5x10⁵ células/mL) foram plaqueadas em placa de 96 poços com DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB, na presença ou ausência das chalconas (100, 20, 4 e 0,8 µg/mL) e/ou LPS (1 µg/mL, Sigma Aldrich, proveniente do sorotipo 0111:B4 de *Escherichia coli*). Macrófagos MH-S foram cultivados à semelhança dos macrófagos RAW 264.7 e o processo de experimentação diferiu somente na utilização do lisado celular de *M. bovis* BCG (1,5 µg/mL) como estímulo celular. Em ambos os experimentos, a placa foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ e após 24 h, o sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação dos parâmetros inflamatórios e citotoxicidez.

Tabela 2. Estrutura representativa da chalcona não substituída e das chalconas sintetizadas com substituintes nos anéis A e B.



Chalcona	Anel B			Anel A		
	2'	3'	4'	2	3	4
1	H	H	H	H	H	H
2	H	H	H	H	H	F
3	H	H	H	H	H	Cl
4	H	H	H	H	H	N(CH ₃) ₂
5	H	H	H	H	-O(CH ₂)O-	
6	H	H	H	H	H	OCH ₃
7	H	H	H	N (anel piridínico)	H	H
8	H	H	Br	H	H	H
9	H	H	Br	H	H	F
10	H	H	Br	H	H	Cl
11	H	H	Br	H	H	N(CH ₃) ₂
12	H	H	Br	H	-O(CH ₂)O-	
13	H	H	Br	H	H	OCH ₃
14	H	H	Br	H	OCH ₃	OCH ₃
15	H	H	Br	Cl	H	H
16	H	H	CH ₃	H	H	H
17	H	H	CH ₃	H	H	F
18	H	H	CH ₃	H	H	Cl
19	H	H	CH ₃	H	H	N(CH ₃) ₂
20	H	H	CH ₃	H	-O(CH ₂)O-	
21	H	H	CH ₃	H	H	OCH ₃
22	H	H	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
23	H	H	CH ₃	Cl	H	H
24	H	H	OCH ₃	H	H	H
25	H	H	OCH ₃	H	H	F
26	H	H	OCH ₃	H	H	Cl
27	H	H	OCH ₃	H	H	N(CH ₃) ₂
28	H	H	OCH ₃	H	-O(CH ₂)O-	
29	H	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃
30	H	H	OCH ₃	Cl	H	H
31	Cl	H	H	H	H	H
32	Cl	H	H	H	H	F
33	Cl	H	H	H	H	Cl
34	Cl	H	H	H	H	OCH ₃
35	Cl	H	H	H	-O(CH ₂)O-	
36	Cl	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃
37	H	H	H	H	H	NO ₂
38	H	H	Br	H	H	NO ₂
39	H	H	CH ₃	H	H	NO ₂
40	H	H	OCH ₃	H	H	NO ₂
41	Cl	H	H	H	H	NO ₂

4.2.1. Quantificação de citocinas e mediadores inflamatórios

As citocinas TNF- α , IL-1 β e o mediador inflamatório lipídico PGE₂ foram quantificados separadamente no sobrenadante da cultura celular obtido conforme descrito no item 4.2. Para a análise, foram adquiridos kits comerciais de ELISA (ensaio de imunoabsorção ligado à enzima) tipo sanduíche (TNF- α e IL-1 β (BD Biosciences, CA, USA) e PGE₂ (R&D Systems, MN, USA)) e a execução experimental ocorreu segundo o protocolo do fabricante. No ensaio de quantificação da produção de PGE₂ foi utilizado como controle positivo, o fármaco indometacina (Sigma Aldrich), um AINE inibidor da produção de prostaglandinas (**Figura 28**), nas concentrações de 0,2 μ g/mL, 0,04 μ g/mL, 0,004 μ g/mL e 0,0004 μ g/mL padronizadas de acordo com Chang *et al.*, 2006, enquanto as chalconas foram diluídas na concentração de 100, 20 e 4 μ g/mL. A quantificação de IL-10 foi realizada para os experimentos *ex vivo* envolvendo as células pulmonares obtidas conforme descrito no item 4.9.2 através de kit comercial de ELISA tipo sanduíche (BD Biosciences). A produção de NO foi estimada indiretamente, medindo-se a concentração de nitrito. Cinquenta microlitros dos sobrenadantes (obtido 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 (Dynatech MR5000). A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada em μ M usando como referência uma curva de nitrito de sódio decrescida do valor obtido com os aditivos sem células (GRIESS, 1984). O fármaco padrão, L-MMMA, acetato de N^G-metil-L-arginina (Sigma Aldrich), **Figura 28**, conhecido pela inibição da iNOS, foi utilizado para comparação do potencial inibitório com as chalconas (IC₅₀ 78,3 \pm 6,5).

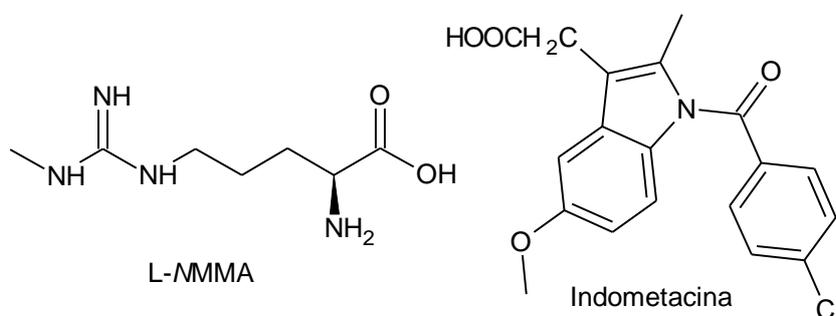


Figura 28. Estrutura química do inibidor padrão de iNOS, L-MMMA e da indometacina, AINE inibidor da produção de prostaglandinas. (VALLANCE *et al.*, 2002; RAO *et al.*, 2008).

4.2.2. Avaliação da morte celular em macrófagos (método do LDH e do MTT)

Os métodos utilizados para avaliar a citotoxicidade celular foram: a quantificação da liberação específica da lactato desidrogenase (LDH), enzima citoplasmática importante na rota metabólica celular, e a verificação da capacidade de redução da substância 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazol (MTT) a formazan, relacionado a funcionalidade mitocondrial. O método do MTT avalia em sua essência a viabilidade celular e, por conseguinte, os dados obtidos foram convertidos em percentuais de citotoxicidade utilizando como referência os valores obtidos nos controles. Os cálculos utilizados para conversão foram: Percentual de citotoxicidade = $100 - ((\text{percentual de viabilidade da amostra} - \text{mínimo de viabilidade}) \times 100) / \text{máximo de viabilidade} - \text{mínimo de viabilidade}$). No método, a cultura celular foi estimulada e tratada conforme item 4.2. Após 24 h de incubação, foi adicionado 10 μL /poço de MTT (5 mg/mL, Sigma Aldrich) e novamente incubada por 2 h a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, o sobrenadante da cultura foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados em HCl (4 mM) adicionado de 80 mL de isopropanol (Vetec Chemical, Brasil). A leitura foi feita por espectrofotômetro de placa (Dynatech MR5000) a 570 nm (RASO *et al.*, 2001). Para o método do LDH, o sobrenadante da cultura celular (obtido segundo item 4.2) foi avaliado através da utilização de kit comercial (Doles, GO, Brazil) conforme protocolo do fabricante. A leitura foi mensurada em espectrofotômetro de placa (Dynatech MR5000) a 492 nm (VENTURA *et al.*, 2015). Os cálculos utilizados para obtenção do percentual de inibição foram: percentual de liberação de LDH = $100 \times (\text{liberação LDH amostra} - \text{liberação espontânea}) / (\text{máximo da liberação} - \text{liberação espontânea})$. Como controles, para o máximo de liberação de LDH (mínimo de viabilidade) utilizou-se cultura de macrófagos estimulados e não tratados, acrescida de 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma Aldrich) e para a liberação espontânea de LDH (máximo de viabilidade) foram utilizados cultura de macrófagos somente acrescida do estímulo celular.

4.3. Avaliação da atividade antioxidante (método do DPPH e do SNP)

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método do DPPH, baseado no sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e o método do SNP, baseado no sequestro do radical NO proveniente da solução de nitroprussiato de sódio (SNP) (**Figura 29**).

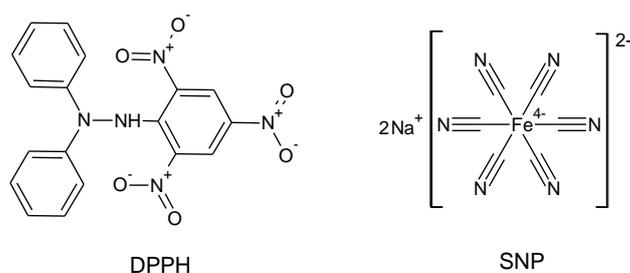


Figura 29. Estrutura química do radical livre DPPH e do complexo doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP).

Para o método do DPPH, 1 mL da amostra das chalconas nas mesmas concentrações utilizadas no tratamento da cultura celular (100-0,8 µg/mL) foi acrescida de 1 mL de solução etanólica de DPPH (0,1 mM, Sigma Aldrich) por 1 h à temperatura ambiente. A absorção do DPPH foi verificada em espectrofotômetro a 515 nm (Biochrom, modelo Libra s6). O DPPH é um radical livre e estável quando em solução, permitindo a avaliação da atividade antioxidante das substâncias acrescidas a mesma. As substâncias que possibilitam a origem da forma reduzida do DPPH (alteração da coloração violeta para amarelo) apresentam atividade antioxidante. A atividade sequestradora de radicais livres de cada amostra foi expressa pela relação da absorção de DPPH, baseado na solução de DPPH ausente das amostras (controle negativo) em relação à solução de DPPH acrescida das chalconas nas concentrações de 100, 20, 4, 0,8 µg/mL. A solução da substância aromática padrão, o 2,6-di-(*terc*-butila)-4-metilfenol (BHT - Sigma Aldrich) foi utilizada como referência de potencial antioxidante (**Figura 30**). O percentual de atividade sequestradora do radical DPPH foi calculado através da fórmula: $100 \times (\text{absorbância do controle negativo} - \text{absorbância da amostra}) / \text{absorbância do controle negativo}$.

Para o método do SNP utilizou-se o nitroprussiato de sódio, um composto nitroso inorgânico, que em meio aquoso libera o radical NO que por sua vez pode reagir com o O₂ formando dióxido de nitrogênio (entre outras reações), sendo relativamente estável. Para este modelo experimental, a concentração da solução de SNP acrescida ao meio de cultura (sem aditivo celular) e o tempo de exposição das chalconas a este foram padronizados de forma a simular a quantidade em micromolar de NO produzido pelos macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS no ensaio celular. Uma solução estoque de SNP a 100 mM em PBS (salina tamponada fosfatada) foi preparada e a concentração de 10 mM e tempo de incubação de 1,5 h foram utilizados (VENTURA, 2011). A solução de SNP (5 µL) foi adicionada a 45 µL do meio de cultura DMEM-F12 contendo as chalconas ou rutina (Sigma Aldrich), flavonoide conhecido por

sua capacidade sequestradora de NO (**Figura 30**), nas concentrações de 100, 20, 4, 0,8 µg/mL. Após 1,5 h de incubação à temperatura ambiente, realizou-se o ensaio de Griess (item 4.2.1) e a concentração de nitrito foi determinada em µM (ZHAI *et al.*, 2009).

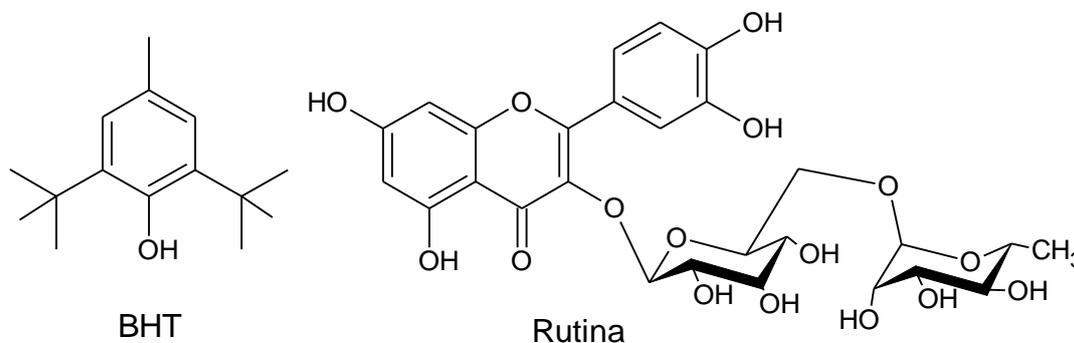


Figura 30. Estrutura química do BHT e do flavonoide rutina (RANG *et al.*, 2007; COUTINHO *et al.*, 2009).

4.4. Avaliação do potencial de inibição da expressão enzimática da iNOS e COX-2

Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados na concentração de 2×10^7 células/mL em placas de petri e incubados por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, os macrófagos confluentes foram tratados com 1 µg/mL de LPS e duas concentrações das chalconas mais ativas, 20 e 4 µg/mL, (devido a não interferência da citotoxicidade e a presença do potencial de inibição da produção dos mediadores inflamatórios NO e PGE₂) por mais 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Para confirmação da presença do estímulo celular, o sobrenadante da cultura após o período de 24 h foi coletado e o método de Griess realizado antes do processamento das células para obtenção do lisado celular. Cada placa de petri foi então lavada com PBS 1X e a monocamada celular foi removida com *cell scraper* e transferida para microtubos e centrifugada (1200 rpm, 5') para obtenção do *pellet* celular. Estes foram lisados 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 – Sigma Aldrich). A concentração de proteínas foi estimada pelo método de Bradford. Para eletroforese, 60 µg 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 foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando tampão fosfato (Amersham Hybond- ECL, GE-Healthcare). A membrana foi bloqueada com 2,5% de albumina

sérica bovina (BSA) dissolvida em PBS acrescido de Tween 0,05% (PBST), overnight a 4°C, e posteriormente lavadas 3X com PBST 0,05% e incubadas com anticorpo primário anti-iNOS policlonal (Santa Cruz Biotechnology), 1:1000, ou com anticorpo monoclonal anti-COX-2 (BD Transduction Laboratories), 1:500, ambos diluídos em PBST 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 incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit IgG-peroxidase ou anti-mouse IgG-peroxidase respectivamente (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology) em PBST 0,05% por 1 h, a temperatura ambiente. Após, a membrana foi lavada extensivamente com PBST 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 protéicas 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.

4.5. Obtenção e preparo do cultivo micobacteriano

Três cepas micobacterianas de diferentes níveis de virulência foram utilizadas no estudo: *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG), avirulenta, proveniente da vacina onco-BCG, linhagem Moreau (Copenhagem SEED# julho de 1978, cedida pelo Instituto Butantan/SP) e duas cepas de *Mycobacterium tuberculosis*: H37Rv (ATCC 27294) e a cepa *Beijing* M299, isolada de pacientes com TB em Moçambique, caracterizada previamente pela hipervirulência (RIBEIRO *et al.*, 2014), gentilmente cedida pelo Dr. Philip Suffys/ FIOCRUZ, Brasil. As cepas foram crescidas em meio de cultivo Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI) contendo 10% de ADC (albumina-dextrose-catalase - Difco Laboratories), 0,5% de glicerol e 0,05% Tween 80 a 37°C sob condições de NB3, durante 7 dias com agitação diária, e congeladas em alíquotas de 1mL (10^7 a 10^8 bactérias) em freezer -70°C. A densidade óptica das culturas micobacterianas foi mensurada por espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra s6) a 600 nm e a concentração correspondente foi determinada para cada cepa através da diluição seriada em placas de ágar contendo meio de cultivo Middlebrook 7H10 (Difco, Detroit, MI) suplementado com 10% de OADC (ácido oleico- albumina-dextrose-

catalase - Difco Laboratories) e 0,5% de glicerol. Toda manipulação e cultivo micobacteriano obedeceu às normas de biossegurança.

4.5.1. Avaliação da atividade antimicobacteriana

As culturas micobacterianas em suspensão foram crescidas por 7 dias e agitadas em vórtex e sonicadas em banho de ultrassom (Ultrasonic Maxi cleaner 800–UNIQUE) por 1 min para dispersão dos grumos. O ajuste da concentração bacteriana utilizada nos experimentos foi realizado através da leitura prévia de 1 mL da suspensão das culturas a 600 nm em espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra s6), subtraído da densidade óptica do meio de cultura 7H9 suplementado. A diluição da suspensão bacteriana obedeceu ao critério de relação da densidade óptica *versus* número de bacilos. Para o estudo da atividade antimicobacteriana das chalconas, a suspensão bacteriana foi plaqueada (1×10^6 CFU/poço em placa de 96 poços) e incubadas na presença das chalconas nas concentrações de 100, 20, 4 e 0,8 µg/mL ou rifampicina, (concentrações de 0,0011 a 0,03 µg/mL para *M. bovis* BCG; de 0,00032 a 1 µg/mL para Mtb H37Rv e de 0,008 a 10 µg/mL para o isolado clínico de Mtb M299). As placas foram seladas e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 7 dias para *M. bovis* BCG ou 5 dias para as cepas de *M. tuberculosis*. Após este período, a cultura bacteriana foi acrescida de 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) e incubada por 3 h para quantificação do crescimento micobacteriano (MOODLEY *et al.*, 2014). Posteriormente, foi utilizado o tampão de lise (20% p/v SDS / 50% dimetilformamida - DMF em água destilada, pH 4.7) por 18 h. A densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro a 570 nm. A suspensão da cultura bacteriana não tratada foi utilizada como controle do crescimento bacteriano espontâneo.

4.6. Infecção de cultura de macrófagos e quantificação do crescimento micobacteriano intracelular

Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados (5×10^5 células/mL) em placas de 96 poços com meio DMEM-F12 sem antibiótico e suplementado com 10% SFB por 24 h. Antes da infecção, a suspensão micobacteriana foi agitada e sonicada conforme item 4.5 e a densidade óptica ajustada para 0,1. A cultura de macrófagos foi infectada na razão MOI (Multiplicidade da infecção) 1:1 (macrófago/bactéria). A fagocitose foi permitida por 3 h, e logo após, as micobactérias extracelulares foram removidas por

lavagem com PBS. Posteriormente, a monocamada celular infectada foi tratada por 4 dias com as chalconas ou rifampicina, nas concentrações citadas no item 4.2. A viabilidade da cultura de macrófagos foi monitorada através do método de LDH (item 4.2.2) e foi superior a 80% durante todo o experimento, excluindo a hipótese da redução do CFU estar vinculada a morte celular dos macrófagos. No quarto dia após infecção, as células foram lisadas com saponina 1% (Sigma Aldrich) para liberar as bactérias intracelulares. As alíquotas do lisado celular foram diluídas em série de 10 vezes em PBS e plaqueadas em triplicata em placas de ágar 7H10 suplementadas. Após 21 dias de incubação a 37°C, a contagem das unidades formadoras de colônias (CFU) foi determinada.

4.7. Avaliação do potencial inibitório da associação das chalconas mais ativas ao fármaco rifampicina

As chalconas mais ativas em cultura micobacteriana e em macrófagos RAW 264.7 infectados foram selecionadas para verificação do potencial inibitório quando em associação com o fármaco padrão rifampicina. O isolado clínico de Mtb M299 foi cultivado e diluído segundo item 4.5 e plaqueado em placa de 96 poços (1×10^7 CFU/mL). A suspensão micobacteriana foi tratada com cada chalcona nas concentrações de 100, 20, 4, 0,8 µg/mL associadas à rifampicina, numa concentração previamente estabelecida onde o potencial inibitório da mesma foi de no máximo 30% (0,04 µg/mL). A placa foi incubada a 37 °C por 5 dias. A quantificação do potencial inibitório foi realizada pelo método do MTT, conforme descrito no item 4.5.1. Os resultados obtidos foram comparados ao efeito inibitório observado para as chalconas quando em tratamento exclusivo contra o isolado clínico *M. tuberculosis* M299, conforme descrito no item 4.5.1.

4.8. Avaliação da capacidade inibitória das chalconas mais ativas na viabilidade de bactérias extracelulares agregadas em *clumps*

Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados (5×10^5 células/mL) em placas de 96 poços com meio DMEM-F12 sem antibiótico e suplementado com 10% SFB por 24 h. Antes da infecção, a suspensão micobacteriana foi agitada e sonicada conforme item 4.5 e a densidade óptica ajustada para 0,1. A cultura de macrófagos foi infectada na razão MOI 10:1 (bactéria/macrófago) com Mtb H37Rv ou com o isolado clínico M299. A

fagocitose foi permitida por 3 h, e logo após, as micobactérias extracelulares foram removidas por lavagem com PBS. Posteriormente, a monocamada celular infectada foi acrescida de meio DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB e incubada durante 12 dias. Durante este período, a cultura de RAW 264.7 infectada foi observada para acompanhamento da morte celular necrótica dos macrófagos e liberação dos agregados micobacterianos (*clumps*). No décimo segundo dia, ambas as placas contendo a monocamada celular infectada foram acrescidas de saponina 1% para garantir o rompimento total dos macrófagos. A estas culturas foram adicionados as chalconas mais ativas nas concentrações descritas no item 4.5.1 e incubou-se a 37°C por 5 dias. A avaliação da viabilidade micobacteriana foi efetuada através do método bacteriológico do CFU. Antes da execução da diluição seriada, a suspensão bacteriana foi coletada para ependorfes e homogeneizados por 3 vezes no vórtex intercalados por 3 vezes no banho de ultrassom por 1 min. As diluições seriadas e a disposição nas placas de petri contendo meio de cultivo Middlebrook 7H10 suplementado com OADC seguiram o descrito no item 4.6.

4.9. Infecção experimental dos camundongos

Camundongos da linhagem C57Bl/6, livres de germes, 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-18/12, 2012) e pela Comissão de Ética em Uso Animal, CEUA, da UENF (protocolo nº 198/2012). Antes do procedimento de infecção experimental foi efetuada a preparação do inóculo. A cepa *Beijing* M299 foi previamente cultivada e a densidade óptica mensurada de acordo com o item 4.5. A mesma foi escolhida por estar associada à 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 60 µL foi adequada para cada animal e confirmada por contagem de CFU em placas de ágar 7H10 suplementadas plaqueadas com o mesmo volume de inóculo instilado na traqueia do animal. No procedimento de infecção experimental, os animais foram inicialmente anestesiados

por via intraperitoneal (i.p.), pela aplicação de numa 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 60 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 controle receberam 60 μL de PBS estéril. Logo após a infecção intratraqueal (i.t.), a incisão foi suturada. Os animais infectados foram separados em quatro grupos com cinco animais cada 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. Camundongos BALB/c posteriormente também foram utilizados, seguindo similar protocolo de infecção realizado para o modelo murino C57Bl/6.

4.9.1. 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 os períodos pré-determinados de 15 e 30 dias de tratamento. Visando a avaliação da terapia dual, anti-inflamatória e antimicobacteriana, e para fins de comparação do efeito potencial da chalcona nos dois âmbitos, além do tratamento com a chalcona codificada com nº 5, os fármacos ibuprofeno e rifampicina (Sigma Aldrich), conhecidos nestas respectivas abordagens terapêuticas foram inseridos no delineamento experimental. Todas as substâncias tiveram a dose de tratamento/animal calculadas e foram diluídas em DMSO. Deste modo, os animais infectados foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de 5 animais cada. Dois grupos experimentais de animais não infectados foram inseridos (5 animais cada), de acordo com o protocolo a que foram submetidos:

Grupo 1- Animais não infectados e inoculados por via i. t. com PBS estéril receberam aplicação intraperitoneal diária de 20 μL de PBS estéril.

Grupo 2- Animais não infectados e inoculados por via i. t. com PBS estéril receberam aplicação intraperitoneal diária de 20 µL de chalcona 5 (20 mg/Kg).

Grupo 3- Animais somente infectados por Mtb e não tratados.

Grupo 4- Animais infectados por Mtb receberam aplicação intraperitoneal diária de 20 µL de chalcona 5 (20 mg/Kg).

Grupo 5- Animais infectados por Mtb receberam aplicação intraperitoneal diária de 20 µL de rifampicina (10 mg/Kg).

Grupo 6- Animais infectados por Mtb receberam aplicação intraperitoneal diária de 20 µL de ibuprofeno (40 mg/Kg). Os animais BALB/c infectados não foram tratados com ibuprofeno.

Após o período de tratamento de 15 dias (30 dias de infecção) e 30 dias (45 dias de infecção) os animais foram sacrificados 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), fígado e baço (histopatologia), relação entre o peso dos pulmões e o número de células contabilizados, produção de citocinas *ex vivo* a partir das células pulmonares, análise fenotípica do infiltrado celular no pulmões por citometria de fluxo.

4.9.2. Obtenção de células pulmonares e dos bacilos

Para a obtenção das células pulmonares foi coletado o lóbulo esquerdo dos pulmões dos camundongos infectados ou não, os quais foram pesados e adicionados à placa de petri (JProlab, 21 cm²) com 2 mL de meio de cultura RPMI (Gibco/Invitrogen, NY, USA). Com o auxílio de pinças curvas, o órgão foi macerado e mantido acondicionado no gelo. A seguir foram adicionados 3 mL de solução de digestão tecidual (1µg/mL de liberase Blendzyme 2 (Roche) e 0,1µg/mL de DNase de pâncreas bovino (Sigma Aldrich)) foram acrescentadas e incubadas 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 plaqueamento em placa de ágar 7H10 suplementada. As placas foram lacradas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C e 5% CO₂ por 21 dias e o CFU quantificado. 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 e ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 0,05 mg/mL de gentamicina e mantidas no gelo. Uma alíquota desta suspensão foi tratada com 0,1 % de azida sódica por 20 minutos para contagem celular (RIBEIRO *et al.*, 2014). Após a quantificação e ajuste da concentração celular (5x10⁵ células/mL), as células foram plaqueadas e cultivadas *ex vivo* por 48 h para quantificação da produção espontânea de citocinas (TNF- α , IL-10, IL-1 β) e do radical NO pelo método de ELISA tipo sanduíche e reação de Griess respectivamente (item 4.2.1).

4.9.3. Análise macroscópica e histopatológica do pulmão, baço e fígado

A avaliação da macro e micropatologia foi realizada para os órgãos pulmão, baço e fígado nos dias 30 e 45 após a infecção. Os lóbulos superior direito, mediano, inferior direito e pós-caval do pulmão foram selecionados para a análise histológica e, portanto fixados 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 e após a fixação, o lóbulo superior 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).

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

O lóbulo superior direito dos pulmões dos camundongos infectados foi retirado para análises histopatológicas 30 e 45 dias após a infecção. Após a fixação, 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 4-5µm, colocado em banho-maria e posicionados em lâmina. As lâminas contendo os cortes foram embebidas em duas baterias de xilol por 3 minutos cada, logo banhadas 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 Permount.

4.9.3.2. Método de Ziehl-Neelsen

Os órgãos foram fixados, clivados e emblocados como descrito no item 4.9.2.1. A lâmina contendo o corte do tecido foi imersa em solução aquecida de carboxifuccina por 30 minutos. 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 minutos, com posterior imersão em azul de metileno (10 mL da solução estoque (4 mM de azul de metileno em álcool etílico 95%) acrescido de 90 mL de água destilada). Os cortes foram submetidos à fixação permanente com Permount e analisados por microscopia óptica (microscópio Zeiss-Axioplan). As técnicas de coloração com H&E e Ziehl Neelsen foram realizadas 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.

4.9.3.3. Análise morfométrica do tecido pulmonar

Os cortes corados com H&E foram analisados por microscopia óptica (microscópio Axioplan 2, Carl Zeiss, Inc.) e as imagens de 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-controle não infectados, camundongos somente

infectados e cada um dos diferentes grupos infectados e tratados, 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.

4.10. Análise fenotípica do infiltrado celular pulmonar

A partir do homogenato celular obtido conforme descrito no item 4.9.2. foi quantificado e ajustado a concentração celular em 2×10^5 células/mL para cada amostra a ser analisada. As células foram centrifugadas (1200 rpm, 5 min, 4 °C) e ressuspendidas em solução de PBS suplementado com 1% de SFB no qual foi diluído 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 PBS acrescido de 1% de SFB 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). Os histogramas de intensidade de fluorescência dos respectivos fluorocromos foram obtidos e a frequência de células relacionada a cada gate de interesse foi mostrada em percentual referente ao gate de origem.

4.11. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 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} e MIC foram calculadas por análise de regressão não linear do log [concentração]/ curvas de inibição de três experimentos diferentes usando o GraphPad Prism 4 .

5. RESULTADOS

5.1. *Screening* das chalconas quanto à capacidade de inibição da produção de NO e TNF- α , citotoxicidade e o crescimento de *M. bovis* BCG

A produção da citocina pró-inflamatória TNF- α e do radical NO pelos macrófagos alveolares está intimamente envolvida na resposta inflamatória e embora exibam efeitos protetores, em altas concentrações possuem efeitos deletérios (BALKWILL *et al.*, 2001). Em alta concentração, o NO é responsável pela angiogênese, hiperpermeabilidade vascular e severo dano oxidativo na vasculatura local e o TNF- α pode causar degranulação de neutrófilos, acompanhado de liberação de enzimas proteolíticas associadas à injúria tecidual (GUZIK *et al.*, 2003; ORME, 2013).

O estudo do potencial anti-inflamatório das 41 chalconas iniciou-se pela investigação da capacidade destas em inibir a produção de NO e TNF- α em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, utilizando os métodos de Griess e o ensaio de ELISA tipo sanduíche, respectivamente. Além disso, o efeito citotóxico foi avaliado para permitir a seleção de chalconas exibindo baixa ou nenhuma interferência da toxidez. Deste modo, os níveis da enzima citoplasmática lactato desidrogenase presente no sobrenadante da cultura tratada com as amostras foi quantificado, assim como foi verificada a capacidade das células em reduzir a substância MTT ao cristal de formazan, o que está relacionado à funcionalidade mitocondrial. Este critério foi estabelecido de modo que pudessem ser selecionadas chalconas capazes de inibir a produção de NO e TNF- α sem aparente interferência deste potencial pelo índice de morte celular. Para cada amostra foi obtida uma curva de concentração-resposta e desta foi calculada a concentração necessária para inibir 50% da atividade estudada, IC₅₀, como exibido na **Tabela 3**.

A fim de proporcionar um grau de comparação apurado, no que diz respeito à modulação da produção de óxido nítrico, utilizou-se a substância padrão, L-NMMA (N^G-acetato de monometil-L-arginina), inibidor conhecido da produção de NO. O potencial de inibição obtido pelas chalconas foi comparado ao apresentado pelo L-NMMA (IC₅₀ 78,3 \pm 6,5 μ M).

Com atenção nos valores de IC₅₀ obtidos, de forma geral, as chalconas (**1 a 41**) foram mais potentes em inibir a produção de NO do que TNF- α , tendo em vista que apenas cinco substâncias foram capazes de inibir a produção deste último.

Ao comparar o potencial exibido para cada chalcona nos testes realizados, estas puderam ser agrupadas de acordo com a presença ou não da capacidade inibitória como também pelo grau de atividade demonstrado.

Dez chalconas (**2, 6, 7, 9, 16, 22, 23, 32, 34 e 38**) não foram capazes de inibir a produção de ambos os mediadores inflamatórios avaliados, tendo em vista o valor de IC_{50} apresentado por estas ter sido superior a maior concentração utilizada. Em contrapartida, algumas amostras inibiram moderadamente a produção de NO, como as chalconas **18, 35, 36 e 39**, com potencial muito inferior a chalcona não substituída e em alta concentração de tratamento, exibindo IC_{50} entre 100 a 200 μM , enquanto as amostras **10, 14 e 37** apresentaram atividade inibitória pouco maior (IC_{50} aproximado de 60mM), contudo também menos ativas que a chalcona não substituída (IC_{50} 41,6 \pm 2,0 μM). Comparado ao potencial inibitório do L-MMMA somente as chalconas **14 e 37** foram mais ativas. Para essas amostras apenas a chalcona **10** exibiu elevada citotoxicidade celular (**Tab. 3**).

A maior parte das amostras apresentou elevada atividade inibitória da produção de NO. As chalconas **3, 8, 11, 13, 15, 17, 20, 21, 25 e 27** mostraram potencial inibitório similar a chalcona não substituída ($p > 0,05$), enquanto as chalconas **19, 26 e 30** exibiram maior potencial de atividade ($p < 0,001$). Dentre estas, as amostras **3 e 8** também foram capazes de inibir a produção de TNF- α (IC_{50} 60,5 \pm 4,7 μM e 66,9 \pm 4,5 μM respectivamente). Com relação à citotoxicidade celular, o tratamento com a chalcona **8** exibiu maior toxicidade enquanto as amostras **11 e 30** mostraram altos níveis de liberação da enzima lactato desidrogenase intracelular e reduzida funcionalidade mitocondrial para conversão do MTT a formazan (**Tab. 3**).

A capacidade inibitória da produção de NO com maior destaque foi apresentada pelas chalconas **4, 5, 12, 24, 28, 29, 31, 33, 40 e 41**, com valor de IC_{50} inferior a 21 μM . A atividade da chalcona **5** foi particularmente notável (IC_{50} 2,1 \pm 0,7 μM). A atividade inibitória observada para estas amostras foi maior do que para a chalcona não substituída e para o L-MMMA (IC_{50} 78,3 \pm 6,5 μM). As chalconas **4, 5, 24 e 41** também foram capazes de inibir a produção de TNF- α . Dentre estas, a chalcona **5** foi a mais potente em inibir a produção de ambos os mediadores inflamatórios avaliados ($p > 0,05$) quando comparado as demais chalconas. Dentre estas, a chalcona **29** também apresentou elevada citotoxicidade celular e, portanto foi excluída das análises subsequentes (**Tab. 3**).

Como parte inicial da estratégia de *screening*, as chalconas **1-41** foram avaliadas quanto à sua atividade antimicrobacteriana em cultura de *M. bovis* BCG, visto

ser essencial a busca por novas substâncias antituberculose ativas e menos tóxicas. Esta cepa proveniente da vacina foi utilizada para os experimentos de triagem considerando razões de biossegurança. A inibição do crescimento do bacilo pelas chalconas diretamente em cultura foi quantificada através do método do MTT e os resultados foram apresentados na **Tabela 3** como MIC₅₀ e MIC₉₀.

Quinze chalconas (**2, 6, 13, 14, 16, 20, 22, 23, 27, 28, 32, 34, 35, 36 e 37**) não inibiram o crescimento de *M. bovis* BCG mesmo na maior concentração utilizada, o que em sua maioria coincidiu com a ausência de atividade imunomodulatória, com exceção, das amostras **20, 27 e 28** capazes de inibir a produção de NO. Em adição, as chalconas **12, 18, 26, 31 e 38** demonstraram baixo potencial para inibir o crescimento micobacteriano, e o MIC₅₀ permaneceu acima de 80 µM.

As chalconas **3, 4, 7, 9, 15, 17, 19, 21, 24, 25, 33, 39, 40 e 41** apresentaram capacidade de inibir 50% do crescimento de *M. bovis* BCG em concentração abaixo de 60 µM, destacando as chalconas **3, 4, 15, 25 e 40** com reduzido valor de MIC₅₀ (< 20 µM). Entretanto, a inibição de 90% do crescimento micobacteriano (MIC₉₀) exigiu a utilização de concentrações maiores (**Tab. 3**).

Embora as chalconas **10, 11, 29 e 30** tenham mostrado boa capacidade de inibir o crescimento bacilar, a atividade não foi seletiva, visto a toxidez na cultura celular de macrófagos (principal célula hospedeira do bacilo).

O efeito inibidor mais potente foi observado para as chalconas **5 e 8** que apresentaram baixos valores de MIC₅₀ associados aos menores valores de MIC₉₀ (14,5 ± 6,1 e 75,3 ± 8,4 µM para **5**; 13,4 ± 4,0 e 33,7 ± 4,6 µM para **8**). Nota-se que nenhuma das substâncias testadas foi mais ativa do que a rifampicina, fármaco anti-TB padrão utilizado como um controle positivo (**Tab. 3**).

Tabela 3. Efeito inibitório das chalconas na produção de NO e TNF- α em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, no crescimento de *M. bovis* BCG em cultura e avaliação da citotoxicidade celular pelos métodos do LDH e MTT.

Chalcona	IC ₅₀ (μ M)				MIC ₅₀ (μ M)	MIC ₉₀ (μ M)
	NO	TNF- α	LDH	MTT	<i>M. bovis</i> BCG	
1	41,6 \pm 2,0	>480,2	177,3 \pm 9,5	199,5 \pm 6,2	137,3 \pm 4,7	383,2 \pm 9,1
2	>442,0	>442,0	>442,0	302,5 \pm 6,9	>442,0	>442,0
3	31,9 \pm 4,6	60,5 \pm 4,7	399,7 \pm 4,9	317,7 \pm 5,5	20,7 \pm 6,4	169,9 \pm 5,4
4	12,0 \pm 2,2	66,9 \pm 4,3	348,4 \pm 5,1	298,0 \pm 5,0	14,3 \pm 5,8	137,3 \pm 7,9
5	2,1 \pm 2,7	48,1 \pm 7,6	>396,4	> 396,4	14,5 \pm 6,1	75,3 \pm 8,4
6	>419,7	>419,7	>419,7	> 419,7	255,9 \pm 4,8	249,2 \pm 6,2
7	>477,9	>477,9	>477,9	> 477,9	35,8 \pm 7,2	440,8 \pm 9,5
8	46,4 \pm 2,3	66,9 \pm 4,5	191,0 \pm 5,2	205,4 \pm 4,4	13,4 \pm 4,0	33,7 \pm 4,6
9	>327,7	>327,7	>327,7	286,1 \pm 4,6	35,8 \pm 3,9	308,8 \pm 5,3
10	68,9 \pm 4,3	>310,9	113,4 \pm 0,5	53,5 \pm 4,1	22,3 \pm 6,3	287,8 \pm 3,2
11	41,3 \pm 3,5	>302,8	132,0 \pm 2,9	71,9 \pm 9,8	67,8 \pm 3,8	242,1 \pm 2,6
12	19,6 \pm 3,3	>302,0	>302,0	223,1 \pm 3,9	84,9 \pm 4,7	229,6 \pm 2,2
13	52,9 \pm 3,6	>315,3	>315,3	290,3 \pm 4,8	220,6 \pm 3,6	>315,3
14	58,9 \pm 6,8	>288,0	>288,0	248,2 \pm 3,1	>288,0	>288,0
15	36,7 \pm 3,8	>311,0	256,0 \pm 3,8	199,8 \pm 3,8	13,8 \pm 4,4	265,1 \pm 4,5
16	>449,9	>449,9	>449,9	> 449,8	>449,9	>449,9
17	30,8 \pm 4,5	>416,2	289,5 \pm 4,3	291,4 \pm 3,6	61,5 \pm 7,6	388,4 \pm 7,3
18	150,3 \pm 3,8	>389,5	304,3 \pm 4,2	164,2 \pm 5,8	71,3 \pm 4,8	323,2 \pm 7,1
19	27,8 \pm 3,8	>376,9	>376,9	301,2 \pm 5,5	56,4 \pm 4,4	322,7 \pm 1,7
20	30,1 \pm 1,2	>375,5	>375,5	> 375,5	>375,5	>375,5
21	30,6 \pm 4,7	>396,3	>396,3	308,0 \pm 6,0	33,3 \pm 5,4	362,2 \pm 5,9
22	>354,2	>354,2	>354,2	> 354,2	>354,2	>354,2
23	>389,5	>389,5	>389,5	> 389,5	>389,5	>389,5
24	21,3 \pm 4,5	78,8 \pm 6,5	244,8 \pm 4,5	319,7 \pm 0,3	31,5 \pm 5,9	399,1 \pm 6,9
25	41,2 \pm 4,6	>390,2	>390,2	349,2 \pm 12,1	15,8 \pm 5,2	228,3 \pm 5,8
26	25,3 \pm 3,9	>366,7	>366,7	279,4 \pm 5,1	91,2 \pm 5,0	286,7 \pm 7,8
27	44,6 \pm 5,2	>355,4	226,4 \pm 3,5	252,2 \pm 5,4	308,8 \pm 5,0	>355,4
28	14,9 \pm 4,1	>354,2	>354,2	308,2 \pm 3,8	>354,2	>354,2
29	13,1 \pm 4,2	>372,7	93,9 \pm 4,9	27,99 \pm 6,22	32,5 \pm 5,4	339,5 \pm 3,2
30	23,9 \pm 4,8	>366,7	100,0 \pm 5,1	29,73 \pm 5,3	37,8 \pm 6,4	328,7 \pm 3,6
31	8,4 \pm 6,8	>412,0	267,0 \pm 4,5	320,3 \pm 2,7	90,9 \pm 5,5	330,2 \pm 4,2
32	>383,6	>383,6	>383,6	169,6 \pm 6,3	>383,6	>383,6
33	3,1 \pm 0,1	165,5 \pm 5,2	351,2 \pm 5,0	287,2 \pm 10,3	45,7 \pm 5,4	>360,8
34	>366,7	>366,7	>366,7	343,1 \pm 5,3	>366,7	>366,7
35	160,3 \pm 4,7	>348,8	>348,8	> 348,8	>348,8	>348,8
36	187,8 \pm 4,1	>330,3	>330,3	> 330,3	269,6 \pm 3,9	>330,3
37	58,6 \pm 4,5	>394,9	>394,9	> 394,8	>394,9	>394,9
38	>301,1	>301,1	>301,1	> 301,1	97,4 \pm 4,2	220,7 \pm 5,6
39	113,7 \pm 4,8	>373,2	328,6 \pm 3,9	151,6 \pm 5,4	28,1 \pm 5,4	344,1 \pm 6,3
40	13,5 \pm 5,5	>353,0	>353,0	> 353,0	14,5 \pm 3,1	>353,0
41	11,2 \pm 5,0	68,5 \pm 3,3	>347,6	> 347,6	30,5 \pm 4,7	246,9 \pm 7,2
L-NMMA ¹	78,3 \pm 6,5	XX	XX	XX	XX	XX
Rifampicina ²	XX	XX	XX	XX	0,01 \pm 0,03	0,2 \pm 0,01

¹ Inibidor padrão de NO; ² fármaco anti-TB padrão; Valores de média \pm DP; n=3; XX- não definido.

5.2. Avaliação das chalconas quanto à inibição da produção de NO e citotoxicidade em macrófagos alveolares MH-S estimulados por lisado de *M. bovis* BCG

A partir do *screening* inicial das 41 chalconas no modelo celular de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS (1 µg/mL) foram selecionadas as chalconas mais ativas para avaliação em outro modelo celular (macrófagos alveolares MH-S estimulados por lisado celular de *M. bovis* BCG) utilizando as mesmas concentrações das chalconas utilizadas anteriormente. Além disso, foi avaliado a citotoxicidade pelos métodos de LDH e MTT. A utilização deste modelo celular para o estudo das chalconas mais ativas permitiu à aproximação com o microambiente pulmonar e a doença tuberculose, assim como possibilitou maior consolidação da avaliação do potencial das chalconas testadas.

Foram testadas as amostras **3, 4, 5, 8, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 28, 31, 33, 37, 40 e 41** selecionadas a partir do ensaio anterior. A substância padrão L-MMMA e a chalcona não substituída (**1**) também foram verificadas conjuntamente com as demais chalconas.

Os resultados obtidos no modelo celular de macrófagos alveolares demonstraram perfil similar ao padrão de capacidade inibitória da produção de NO e de citotoxicidade observado nos testes com o modelo de macrófagos RAW 264.7 estimulado por LPS ($p > 0,05$) (**Tabela 3**).

A chalcona **37** foi a menos potente em relação à inibição da produção de NO, apresentando capacidade de inibição somente na maior concentração testada ($88,0 \pm 1,4\%$), embora nenhuma ou baixa toxicidez tenha sido observada em ambos os métodos utilizados. Comparada a chalcona não substituída, a amostra foi menos ativa ($IC_{50} 63,9 \pm 3,4 \mu M$), contudo seu efeito não diferiu significativamente da substância L-MMMA ($p > 0,05$) (**Fig. 31, Tab. 4**).

Dentre as amostras testadas, as chalconas **3, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 24, 25, 26 e 28** mostraram alta capacidade de inibir a produção de NO. O percentual inibitório variou de 70-100% nas maiores concentrações utilizadas na ausência ou com baixo efeito citotóxico. Na maior concentração testada, somente a chalcona **20** exibiu efeito inibitório seletivo ($95,6 \pm 2,1\%$), com baixa ou nenhuma interferência da citotoxicidade celular. Para as demais chalconas, observou-se maior percentual de liberação da enzima lactato desidrogenase na concentração de 100 µg/mL, com exceção da chalcona **19 e 21**, onde os índices foram baixos. Embora, todas as amostras, nesta concentração, exibiram menor capacidade de redução do MTT a formazan indicando

que a funcionalidade mitocondrial foi afetada. Nas menores concentrações testadas, o percentual de inibição da produção de NO alcançou no máximo 35%. Em comparação com a chalcona não substituída, as amostras apresentaram similar potencial inibitório para a produção de NO ($p > 0,05$), porém duas vezes mais ativas do que o inibidor padrão L-MMMA ($p < 0,001$) (**Fig.31, Tab. 4**).

As chalconas **4**, **31**, **40** e **41** exibiram alto percentual de inibição da produção de NO, maior do que 50%, destacando a chalcona **4** e **31** ($94,1 \pm 0,3\%$ e $81,5 \pm 0,6\%$ respectivamente). Dentre estas amostras, a chalcona **40** foi a única com baixo a moderado efeito citotóxico na maior concentração testada, as demais demonstraram maior índice de liberação de LDH assim como reduzida funcionalidade mitocondrial. Contudo, em menores concentrações, todas mantiveram sua capacidade inibitória com baixa ou nenhuma interferência da citotoxicidade celular. Na menor concentração testada, $0,8 \mu\text{g/mL}$, o efeito inibitório não foi mantido. Quando comparado o IC_{50} destas amostras à chalcona não substituída e ao L-MMMA as amostras foram cerca de duas a cinco vezes mais potentes (**Fig. 31, Tab. 4**).

A chalcona **8** foi ativa nas maiores concentrações testadas (100 , 20 e $4 \mu\text{g/mL}$), com o percentual de inibição em torno de 70%. Na menor concentração, a capacidade de inibir a produção de NO alcançou 40%. Entretanto, o potencial inibitório a 100 e $20 \mu\text{g/mL}$ foi aparente devido ao efeito citotóxico observado em ambos os métodos de avaliação utilizados. Ressalta-se que a amostra foi ativa nas menores concentrações testadas na ausência de citotoxicidade celular. A chalcona **8** mostrou atividade inibitória similar a chalcona não substituída ($\text{IC}_{50} 44,1 \pm 1,3 \mu\text{M}$) e foi mais ativa do que o inibidor padrão L-MMMA ($p < 0,001$) (**Fig. 31, Tab. 4**).

As amostras mais ativas foram as chalconas **5** ($\text{IC}_{50} 3,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$) e **33** ($\text{IC}_{50} 4,2 \pm 1,9 \mu\text{M}$) mostrando capacidade inibitória da produção de NO em torno de 50%, na menor concentração testada. Na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, foi observado efeito citotóxico em ambos os métodos utilizados, sendo este mais proeminente para a chalcona **33**. As amostras foram cerca de oito vezes mais potentes do que a chalcona não substituída enquanto a diferença em relação a capacidade de inibição do L-MMMA foi de dezesseis vezes (**Fig. 31, Tab. 4**).

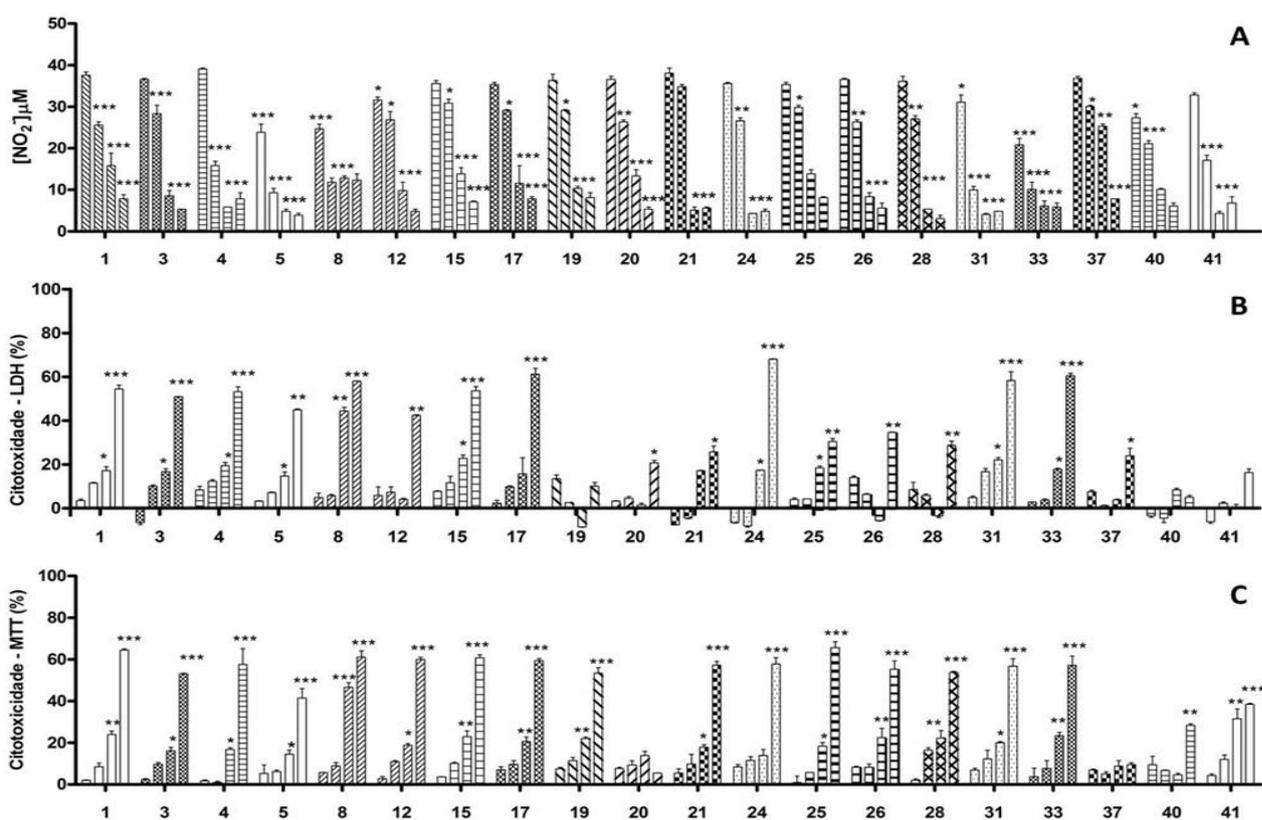


Figura 31. Efeito inibitório das chalconas na produção de NO e citotoxicidade em macrófagos alveolares MH-S estimulados por lisado celular de *M. bovis* BCG. Macrófagos alveolares MH-S foram estimulados com lisado celular de *M. bovis* BCG (1,5 µg/mL) e tratados com as chalconas nas concentrações de 100, 20, 4 e 0,8 µg/mL. As quatro barras para cada chalcona são referentes às concentrações testadas em ordem crescente. **(A)** A concentração de NO em µM foi obtida por comparação ao controle positivo, macrófagos somente estimulados com lisado celular (47,0 ± 0,4 µM) e ao negativo, macrófagos não tratados (0,3 ± 0,1 µM). O percentual de liberação de LDH **(B)** e o percentual de citotoxicidade obtido pelo método de redução do MTT **(C)** foram comparados aos do controle negativo, macrófagos somente estimulados pelo lisado celular (1,2 ± 0,1%/ 4,6 ± 1,9% respectivamente) e do controle positivo, macrófagos estimulados pelo lisado celular e tratados com 1% (v/v) de Triton X-100 (100,7 ± 1,3%/ 99,8 ± 1,3%). Os valores são média ± desvio padrão. p < 0,05 (*), p < 0,01 (**) e p < 0,001 (***) (n=3).

Tabela 4. Concentração mínima inibitória em µM das chalconas em relação à produção de NO e percentual de citotoxicidade (método de LDH e MTT).

Chalcona	NO	LDH	MTT	Chalcona	NO	LDH	MTT
1	35,1 ± 1,4	179,9 ± 1,8	198,9 ± 2,2	24	21,1 ± 2,1	253,1 ± 0,4	329,7 ± 1,7
3	29,1 ± 1,6	389,5 ± 3,3	330,0 ± 1,6	25	41,8 ± 2,6	> 390,2	332,2 ± 1,1
4	12,0 ± 2,6	372,3 ± 1,5	307,1 ± 0,8	26	22,8 ± 2,4	>366,6	291,6 ± 2,2
5	3,6 ± 0,8	> 396,4	> 396,4	28	19,6 ± 1,3	>354,2	306,3 ± 1,5
8	44,1 ± 1,3	190,9 ± 0,6	201,6 ± 1,5	31	12,7 ± 3,3	271,9 ± 2,9	319,6 ± 0,5
12	21,4 ± 1,9	> 301,9	211,6 ± 3,2	33	4,2 ± 1,9	318,6 ± 1,6	293,1 ± 0,6
15	34,2 ± 3,5	266,6 ± 2,4	201,1 ± 2,9	37	63,9 ± 3,4	> 394,8	> 394,8
17	36,9 ± 4,5	291,9 ± 1,9	291,3 ± 0,9	40	17,7 ± 1,7	> 353,0	> 353,0
19	31,1 ± 0,8	> 376,8	229,6 ± 1,9	41	12,6 ± 1,3	> 347,6	> 347,6
20	31,0 ± 3,8	> 375,5	> 375,5	L-NMMA	71,5 ± 1,3	XX	XX
21	31,3 ± 3,9	> 396,3	306,2 ± 0,9				

Valores de média ± DP; n=3; XX- não definido.

5.3. Avaliação das chalconas quanto à inibição da produção dos mediadores inflamatórios IL-1 β e PGE $_2$ em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS

A IL-1 β possui importante papel no direcionamento e sustentação da inflamação crônica associada a uma série de doenças autoimunes e desordens metabólicas. A presença de níveis sistêmicos elevados de IL-1 β durante a infecção por *M. tuberculosis* têm sido associada à extensa necrose no fígado e aumentada mortalidade (GARLANDA *et al.*, 2007). Devido à participação da IL-1 β nos processos inflamatórios, o estudo do potencial inibitório das chalconas se estendeu à avaliação da capacidade de inibir a produção de IL-1 β .

Dezoito amostras (**3, 4, 5, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 28, 31, 33, 37, 40 e 41**) foram avaliadas e a maioria das amostras ativas em inibir a produção de NO não foi igualmente capaz de inibir a produção de IL-1 β ou com similar potência (**Figura 32A**), embora quando comparado à capacidade de inibir a produção de TNF- α existiram correlações (**Tab.3**).

As chalconas **12, 15, 17, 20, 21, 25, 26, 28 e 31** não foram capazes de inibir a produção de IL-1 β em nenhuma das concentrações testadas (**Fig. 32A**).

As chalconas **19, 33 e 40** exibiram aparente potencial inibitório, na maior concentração testada, visto o efeito citotóxico exibidos nos métodos de LDH e MTT, realizados anteriormente (**Fig. 31 e Tab. 4**) e a atividade inibitória não foi mantida nas menores concentrações testadas (**Fig. 32A**). A chalcona **37** inibiu a produção de IL-1 β na maior concentração testada, com baixa ou nenhuma interferência citotóxica embora o potencial não tenha sido mantido nas menores concentrações (**Fig. 32A**).

A capacidade de inibição da produção de IL-1 β foi elevada para cinco chalconas: **3, 4, 5, 24 e 41**. O potencial de inibição verificado na maior concentração utilizada mostrou interferência do efeito citotóxico para todas as amostras citadas e, portanto o efeito nas demais concentrações foi analisado.

A chalcona mais ativa quanto à inibição da produção da IL-1 β foi a **41**. Na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, a mesma exibiu $91,5 \pm 0,2\%$ de potencial inibitório e a 4 $\mu\text{g/mL}$, foi observado $61,4 \pm 1,7\%$. Na menor concentração testada, a atividade inibitória não foi mantida (**Fig. 32A**). O valor de IC $_{50}$ foi de $13,5 \pm 3,9 \mu\text{M}$ (**Tab. 5**). O potencial inibitório demonstrado para a produção de IL-1 β foi maior do que para a produção de TNF- α ($p < 0,001$).

As chalconas **3, 4, 5 e 24** inibiram a produção de IL-1 β , a 20 $\mu\text{g/mL}$, em respectivos $67,3 \pm 1,8\%$, $46,7 \pm 0,9\%$, $69,5 \pm 2,9\%$ e $67,3 \pm 4,6\%$, exibindo IC $_{50}$ de 46,6

$\pm 4,6 \mu\text{M}$, $115,6 \pm 5,5 \mu\text{M}$, $57,9 \pm 4,9 \mu\text{M}$ e $56,6 \pm 3,5 \mu\text{M}$ (**Fig. 32A e Tab. 5**). Destas somente a chalcona **3** foi capaz de manter seu potencial de inibição a $4 \mu\text{g/mL}$. Comparando o potencial destas substâncias na inibição da produção de IL-1 β e TNF- α , apenas a chalcona **4** não apresentou similar potencial para ambas as citocinas ($p < 0,001$), enquanto as demais não diferiram significativamente do mesmo ($p > 0,05$) (**Tab. 3 e 5**).

Adicionalmente, estas chalconas também foram verificadas quanto a capacidade de inibir a produção de PGE₂ em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS através do ensaio de ELISA tipo sanduíche. O mediador inflamatório lipídico, PGE₂, pertence à classe de prostanoídes derivado do ácido araquidônico, que uma vez liberado da membrana fosfolipídica pela ação de fosfolipases é metabolizado em PGE₂ pela ação das cicloxigenases. A produção aumentada de PGE₂ é observada em diversas condições patológicas decorrentes de excessiva resposta inflamatória (FOSSLIEN, 2001).

O fármaco padrão, indometacina, na maior concentração testada apresentou $97,3 \pm 1,4\%$ de inibição da produção de PGE₂, contudo a mesma foi aparente tendo em vista elevado efeito tóxico nos métodos de LDH e MTT. Na concentração de $0,04 \mu\text{g/mL}$, a capacidade de inibição da produção de PGE₂ foi de $60,6 \pm 0,7\%$, em concentrações menores ($0,004$ e $0,0004 \mu\text{g/mL}$) o potencial inibitório não foi mantido, exibindo em torno de 37% e 12% respectivos (**Fig. 32B**). O IC₅₀ calculado foi de $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (**Tab. 5**).

A maioria das chalconas testadas mostrou capacidade em modular a produção de PGE₂ quando comparado à capacidade inibitória da produção de IL-1 β e TNF- α .

As chalconas **17**, **19** e **40**, embora capazes de inibir a produção de NO não apresentaram potencial inibitório para a produção de PGE₂, assim como ocorrido nas análises de inibição da produção de IL-1 β e TNF- α . As chalconas **20** e **37** mostraram capacidade de inibição somente na maior concentração testada, em torno de 60% , não mantendo este potencial nas menores concentrações utilizadas, apresentado alto valor de IC₅₀, embora a interferência da toxicidade tenha sido ausente ou baixa (**Fig. 32B e Tab. 5**).

Nove amostras (**4**, **12**, **15**, **21**, **24**, **25**, **26**, **33** e **41**) exibiram capacidade de inibir a produção de PGE₂, embora o potencial inibitório obtido na maior concentração testada tenha apresentado interferência da citotoxicidade celular. Na concentração de $20 \mu\text{g/mL}$, estas amostras inibiram em torno de $50-75\%$ da produção de PGE₂, e somente a chalcona **15** foi capaz de inibir $41,5 \pm 0,9\%$ na menor concentração testada (IC₅₀ de

32,8 ± 3,7 µM) (**Fig. 32B e C**). Comparando o potencial de inibição destas amostras em quanto a produção de NO e PGE₂, apenas as chalconas **15** e **25** mantiveram similar capacidade inibitória (p > 0,05) as demais foram menos ativas em inibir a produção de PGE₂ (p < 0,001) (**Tab. 3 e 5**).

As chalconas de maior potencial na inibição da produção de PGE₂ foram as amostras **3**, **5**, **28** e **31**, com IC₅₀ < 22 µM. Na concentração de 20 µg/mL, as amostras apresentaram 75-90% de capacidade de inibição e de 40-65%, quando na menor concentração testada. Destaca-se a chalcona **31**, com valor de IC₅₀ de 10,2 ± 0,5 µM (**Fig. 32B e C**). O potencial observado na inibição da produção de PGE₂ foi similar ao obtido na inibição da produção de NO, para as amostras **3**, **28** e **31** (p > 0,05), enquanto para a chalcona **5**, o potencial foi diferente significativamente (p < 0,05), demonstrando ter sido pouco menos ativo (**Tab. 3 e 5**).

Em relação ao potencial inibitório da indometacina, as amostras testadas foram menos ativas na inibição da produção de PGE₂.

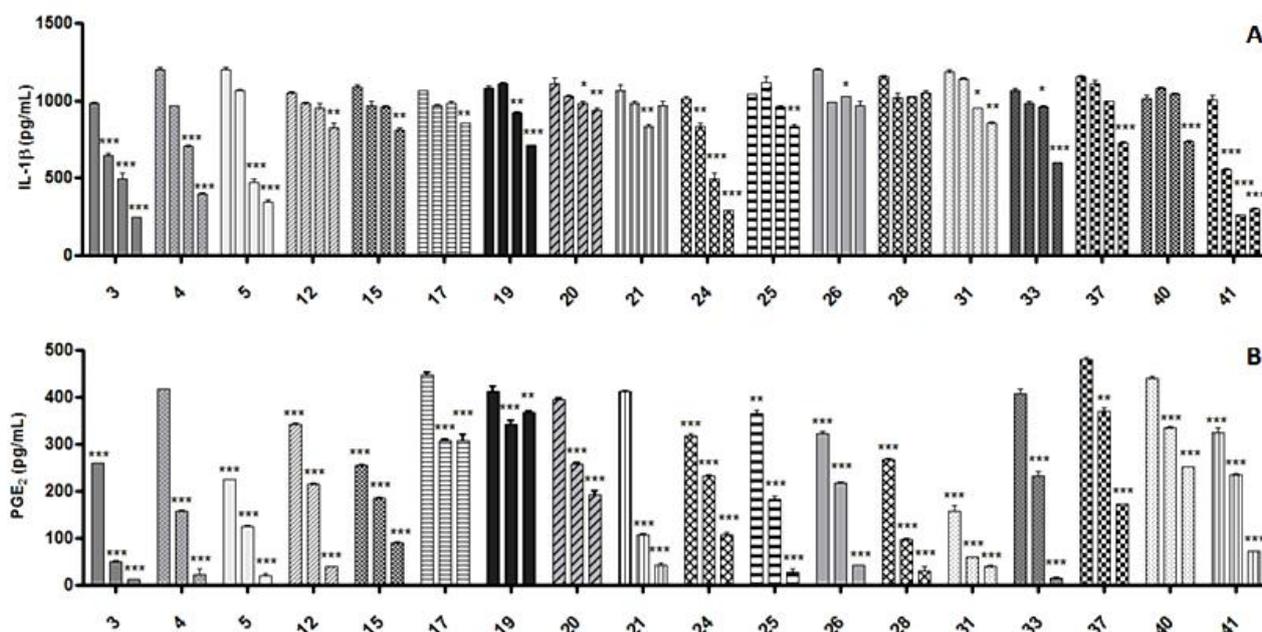


Figura 32. Efeito das chalconas substituídas na produção de mediadores pró-inflamatórios (IL-1β e PGE₂) em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Células RAW 264.7 foram tratadas com LPS (1 µg/mL) na presença das chalconas (100, 20, 4 e 0,8 µg/mL, a menor concentração não foi utilizada no ensaio de PGE₂) durante 24 h. Os sobrenadantes da cultura foram coletados e testados por ELISA tipo sanduíche para IL-1β (**A**) e PGE₂ (**B**). No teste de IL-1β, os valores obtidos para cada amostra foram comparados a cultura de macrófagos não tratada e tratada somente com LPS (0,03 ± 0,1 pg/mL e 922,0 ± 4,6 pg/mL, respectivamente) (**A**). No teste de PGE₂, os valores obtidos para cada amostra foram comparados à cultura de macrófagos não tratada e tratada somente com LPS (0,05 ± 0,1 pg/mL e 436,0 ± 5,8 pg/mL, respectivamente). O fármaco padrão indometacina foi utilizado como controle positivo, nas concentrações de 0,2, 0,04, 0,004 e 0,0004 µg/mL e os valores de prostaglandina obtidos foram 11,8 ± 1,9; 171,8 ± 1,2; 271,6 ± 2,6 e 340,7 ± 1,1 respectivamente (**B**). As barras para cada chalcona referem-se às concentrações testadas em ordem ascendente. Valores são reportados como média ± desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com p < 0,001 (***) e p < 0,01 (**), p < 0,05 (*).

Tabela 5. Concentração mínima inibitória das chalconas substituídas quanto à produção de IL-1 β e PGE₂

Chalcona	IC ₅₀ (μ M)		Chalcona	IC ₅₀ (μ M)	
	IL-1 β	PGE ₂		IL-1 β	PGE ₂
3	46,6 \pm 4,6 ^a	19,9 \pm 2,6 ^a	24	56,6 \pm 3,5 ^a	90,0 \pm 3,4
4	115,6 \pm 5,5 ^c	61,2 \pm 0,5 ^b	25	> 390,2	57,5 \pm 2,1 ^{bd}
5	57,9 \pm 4,9 ^a	23,1 \pm 2,4 ^a	26	>366,7	57,7 \pm 1,9 ^a
12	> 301,9	50,3 \pm 0,3 ^{bd}	28	>354,2	22,1 \pm 0,6 ^a
15	> 310,9	32,8 \pm 3,7 ^c	31	> 412,3	10,2 \pm 0,5 ^a
17	> 416,2	> 416,9	33	287,4 \pm 3,6 ^d	75,1 \pm 3,5 ^e
19	> 376,9	> 376,8	37	> 394,8	321,7 \pm 3,7
20	> 375,5	147,4 \pm 1,2	40	> 353,0	> 412,7
21	> 396,3	50,1 \pm 1,0 ^{bd}	41	13,5 \pm 3,9 ^b	67,4 \pm 2,2 ^{be}

Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas (a–e) são significativamente diferentes ($p < 0,05$ ou $p < 0,001$).

5.4. Análise da atividade antioxidante das chalconas pelo método do SNP e do DPPH

O metabolismo basal das células produz continuamente radicais livres e espécies reativas através da respiração e outras atividades metabólicas. A neutralização destes é um mecanismo utilizado para se manter a integridade estrutural e funcional do organismo (AZADMEHR *et al.*, 2009). No entanto, ao decorrer do processo inflamatório a produção de radicais livres de oxigênio e de nitrogênio pode-se tornar exacerbada, e apesar de exercerem funções importantes relacionadas à eliminação do agente invasivo, também são responsáveis pela lesão tecidual e o agravamento da patologia (GUZIK *et al.*, 2003).

A fim de avaliar o potencial antioxidante das chalconas mais ativas e aprofundar os estudos quanto ao mecanismo de ação destas na inibição da produção de NO foram utilizados os métodos do SNP e do DPPH, verificando se a capacidade inibitória estava associada ao sequestro do radical NO ou de forma mais expressiva a modulação da expressão enzimática da iNOS.

O flavonoide rutina, conhecido pela sua atividade sequestradora de NO apresentou percentual de sequestro em torno de 60-80% nas maiores concentrações, mantendo em 60,1 \pm 0,9% a atividade sequestradora na concentração de 4 μ g/mL e na menor concentração utilizada em torno de 40% (**Fig. 33A**). O valor de IC₅₀ foi de 26,5 \pm 0,9 μ M (**Fig. 3 e Tab. 6**).

As chalconas **3, 4, 5, 8, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 28, 31, 33, 37** e **41** foram selecionadas devido a presença da capacidade de inibição da produção de NO e verificadas nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio celular (100, 20, 4 e 0,8 µg/mL).

A maioria das chalconas avaliadas no método do SNP apresentaram nenhuma ou baixa capacidade de sequestrar o radical NO liberado em solução pelo mesmo. Na maior concentração testada, as chalconas **3, 12, 15, 21, 24, 28, 31, 33** e **41** exibiram percentual de sequestro de somente 10%, e para as chalconas **4, 5** e **17** este percentual alcançou 25%, todas apresentaram elevado valor de IC₅₀ (**Fig. 33A e C**). A chalcona **40** também exibiu alto valor de IC₅₀ e nas maiores concentrações testadas à capacidade antioxidante foi de 25-30%. Em relação à chalcona não substituída, estas amostras mostraram menor potencial antioxidante e com exceção das chalconas **4, 17** e **40**, o percentual de sequestro das chalconas na maior concentração utilizada foi significativamente diferente ($p < 0,001$ ou $p < 0,05$) do exibido pelo flavonoide rutina na menor concentração testada (**Fig. 33A e Tab. 6**).

Seis chalconas (**8, 19, 20, 25, 26** e **37**) demonstraram maior atividade sequestradora do radical NO. As chalconas **8, 20, 25** e **26**, exibiram 50-65% de atividade antioxidante na maior concentração testada e a 20 µg/mL, de 35-50%, destas apenas a chalcona **26** manteve seu potencial de sequestro do radical NO nas menores concentrações (**Fig. 33A**). O valor de IC₅₀ foi de respectivos $156,1 \pm 0,6$ µM, $281,3 \pm 3,1$ µM, $78,3 \pm 1,6$ µM e $111,9 \pm 1,4$ µM. As chalconas **19** e **37** foram as mais ativas, com IC₅₀ de $68,0 \pm 2,4$ µM e $70,4 \pm 1,7$ µM, sendo similares em potência ($p > 0,05$). Na menor concentração testada, o percentual de sequestro foi cerca de 40%.

Comparado a chalcona não substituída, as amostras foram similares ou mais potentes em desempenhar a atividade antioxidante enquanto em relação à rutina, as amostras exibiram menor potencial sequestrador ($p < 0,001$) (**Fig. 33A e Tab. 6**).

Adicionalmente, o método do DPPH também foi realizado para as mesmas amostras avaliadas no método do SNP, permitindo a comparação dos resultados obtidos em ambos os ensaios.

O BHT, substância aromática utilizado como controle positivo apresentou percentual de sequestro em torno de 90-95% nas maiores concentrações e de $80,8 \pm 1,3\%$ na concentração de 4 µg/mL. Mesmo na menor concentração utilizada o BHT sequestrou em torno de 70% (**Fig. 33B**). O valor de IC₅₀ foi de $9,9 \pm 0,6$ µM (**Tab. 6**). O BHT apresentou maior capacidade de sequestrar o radical DPPH do que as chalconas testadas.

Comparando os dados obtidos a partir dos métodos utilizados foi observado que as chalconas **3, 4, 5, 12, 15, 17, 21, 24, 28, 31, 33, 40** e **41** mantiveram baixa capacidade de sequestrar o radical livre DPPH (**Fig. 33B**), embora de acordo com o valor de IC₅₀ a chalcona **40** tenha apresentado maior capacidade de sequestrar o radical DPPH ($p < 0,001$).

As chalconas **1, 8, 19, 20, 25, 26** e **37** apresentaram elevada capacidade antioxidante, e com exceção das chalconas **20** e **25**, este potencial foi ainda maior em sequestrar o radical DPPH ($p < 0,001$) (**Fig. 33B**). A chalcona **19** mostrou maior potencial antioxidante do que a chalcona não substituída, enquanto as chalconas **26** e **37** exibiram similar potencial ($p > 0,05$); as demais foram menos potentes ($p < 0,001$) (**Tab. 6**). Devido aos diferentes tipos de radicais livres, suas diferentes formas de atuação e estabilidade em solução, as substâncias podem apresentar diferenças na capacidade antioxidante.

Para as chalconas **8, 19, 20, 25, 26** e **37** a capacidade de inibição da produção de NO, observada nos ensaios celulares está associada de forma mais expressiva ao sequestro do radical NO produzido, enquanto para as demais amostras, o potencial inibitório da produção de NO não foi justificado substancialmente pelo sequestro deste radical, sugerindo a atuação de outro mecanismo de ação, como a redução da expressão ou modulação da atividade enzimática da óxido nítrico sintase induzida – iNOS, enzima responsável pela produção de NO em decorrência do estímulo inflamatório.

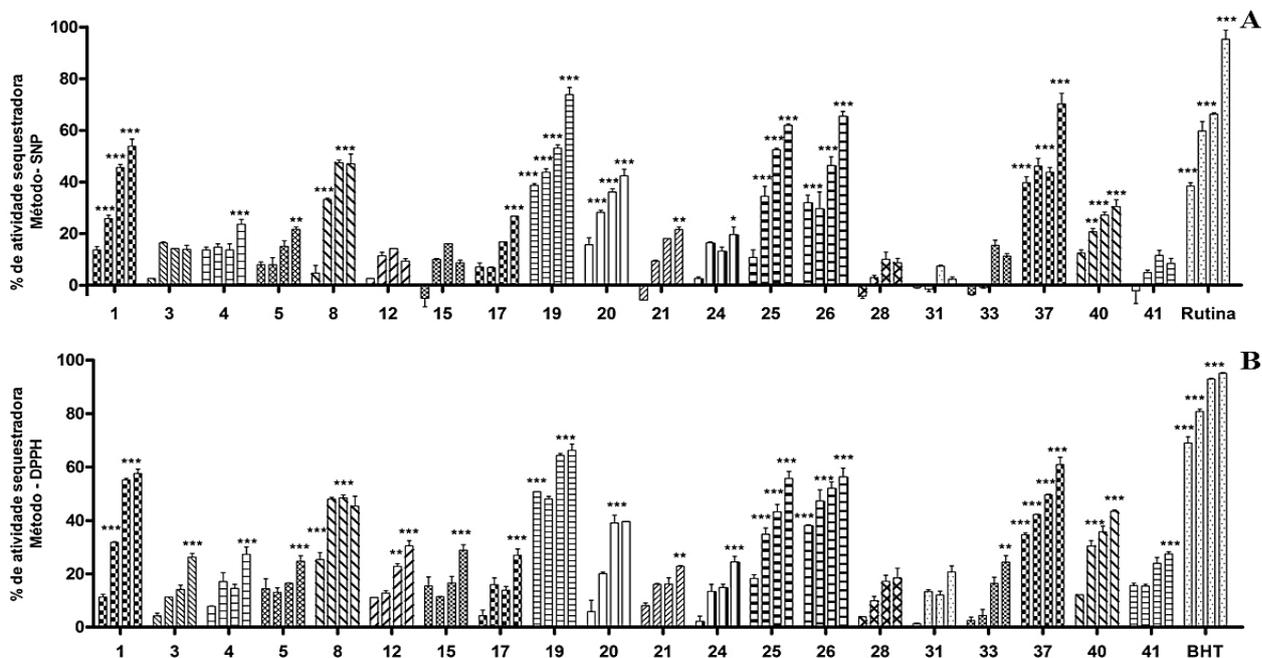


Figura 33. Efeito das chalconas no sequestro de radicais livres avaliados pelo método do SNP e do DPPH. **(A)** As chalconas foram diluídas em meio de cultura DMEM-F12 (100, 20, 4 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$) e acrescidas da solução de SNP (10 μM), por 90 min a temperatura ambiente. O método de Griess foi utilizado para quantificação do nitrito presente em solução. Controle negativo- meio de cultura DMEM-F12 ($100,9 \pm 0,5\%$) e controle positivo- meio de cultura DMEM-F12 acrescido com 10 μM de SNP ($1,2 \pm 1,1\%$). O flavonoide rutina foi utilizado como referência de potencial antioxidante. **(B)** A solução etanólica de DPPH foi acrescida por similar volume das chalconas (100, 20, 4 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$) por 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, a absorbância foi mensurada a 515 nm. O percentual antioxidante foi expresso como percentual da eliminação do radical DPPH da solução, o cálculo foi baseado na absorbância da solução contendo o radical DPPH sem tratamento (controle negativo) em relação à absorbância obtida pela solução de DPPH tratada com as chalconas nas diferentes concentrações utilizadas. A substância aromática BHT foi utilizada como referência de potencial antioxidante. As barras para cada chalcona se referem às concentrações testadas em ordem ascendente. Valores são reportados como média \pm desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*).

Tabela 6. Concentração mínima inibitória das chalconas substituídas no sequestro dos radicais livres avaliados pelo método do SNP e DPPH.

Chalcona	IC ₅₀ (μM)		Chalcona	IC ₅₀ (μM)	
	SNP	DPPH		SNP	DPPH
1	146.4 \pm 1.2 ^a	83.2 \pm 2.2 ^a	24	> 419.7	> 419.7
3	> 412.0	> 412.0	25	78.3 \pm 1.6 ^c	129.4 \pm 2.3
4	> 397.9	> 397.9	26	111.9 \pm 1.4	73.2 \pm 0.9 ^a
5	> 396.4	> 396.4	28	> 354.2	> 354.2
8	156.1 \pm 0.6 ^a	113.3 \pm 1.6	31	>412.0	>412.0
12	> 302.0	> 302.0	33	> 366.7	> 366.7
15	> 310.9	> 310.9	37	70.4 \pm 1.7 ^{bc}	75.0 \pm 1.3 ^a
17	> 416.2	> 416.2	40	353.2 \pm 2.5	250.7 \pm 2.1
19	68.0 \pm 2.4 ^b	31.9 \pm 2.6	41	> 347.6	> 347.6
20	281.3 \pm 3.1	310.2 \pm 2.5	Rutina	26.5 \pm 0.9	XX
21	> 396.3	> 396.3	BHT	XX	9.9 \pm 0.6

Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes ($p < 0,05$ ou $p < 0,001$).

5.5. Avaliação do potencial das chalconas mais ativas na modulação da expressão enzimática da iNOS e COX-2 em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS

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 LPS ou citocinas pró-inflamatórias induzem a expressão do gene da iNOS em várias células inflamatórias e é responsável pela produção de altos níveis de NO durante períodos prolongados (MOLLACE *et al.*, 2005). O estímulo inflamatório também é responsável pela indução da expressão enzimática da COX-2, e consequente síntese de prostaglandinas (RAO *et al.* 2008). A produção excessiva de NO e prostaglandinas, devido a elevada expressão das enzimas iNOS e COX-2, está associada ao papel patológico da inflamação e evidenciam a importância de substâncias que possam modular a expressão enzimática das mesmas (MOLLACE *et al.*, 2005).

Em continuação ao estudo do mecanismo de ação das chalconas mais ativas na inibição da produção de NO e PGE₂, e tendo em vista que a atividade antioxidante verificada não justificou exclusivamente a capacidade inibitória de algumas amostras, estas foram verificadas quanto a modulação da expressão enzimática da iNOS e COX-2 em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.

Para a avaliação da modulação da expressão destas enzimas foi utilizada a técnica de eletroforese seguido por western blot e o tratamento da cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS com as chalconas nas concentrações de 4 e 20 µg/mL. O peso molecular padrão foi utilizado para confirmar a marcação da banda protéica de interesse, tendo a enzima iNOS peso molecular de aproximadamente 114 kDa enquanto a COX-2 possui 72kDa.

As chalconas **3**, **4**, **5**, **31** e **33** foram analisadas quanto a modulação da expressão enzimática da iNOS de acordo com o elevado potencial de inibição da produção de NO (**Tab. 3**) e pela baixa capacidade de sequestro de radicais nos métodos utilizados (**Fig. 33** e **Tab. 6**).

Como pode ser observado na **Figura 34A**, todas as chalconas acima foram capazes de inibir quase completamente a expressão enzimática da iNOS na concentração de 20 µg/mL em comparação ao controle positivo (C⁺), macrófagos somente estimulados por LPS. Na concentração de 4 µg/mL, a chalcona **3** não manteve sua capacidade de inibição, enquanto as demais continuaram a exibir

capacidade de inibir a expressão enzimática da iNOS, embora com menor potencial. Estes resultados estão em acordância com a curva de concentração-resposta obtida anteriormente para cada chalcona (**Fig. 31**) e mostraram que o mecanismo de ação das chalconas mais ativas selecionadas está associado de forma substancial à inibição da expressão enzimática da iNOS.

Conjuntamente, as chalconas mais ativas na inibição da produção de PGE₂ também foram avaliadas quanto à capacidade de modulação da expressão enzimática da COX-2. De forma similar, o mesmo modelo e estímulo celular foram utilizados como também, as concentrações de uso das chalconas e técnica de análise.

Para esta avaliação, as chalconas **3**, **4**, **5**, **28** e **31** foram selecionadas e na concentração de 20 µg/mL, as amostras **3**, **5**, **28** e **31** inibiram quase completamente a expressão enzimática da COX-2 enquanto a amostra **4** apresentou boa capacidade inibitória, embora menos potente quando comparado as demais testadas e em comparação ao controle positivo (C⁺). (**Fig. 34B**). Na concentração de 4 µg/mL, somente a chalcona **4** não foi capaz de inibir a expressão enzimática da COX-2 (**Fig. 34B**). Os resultados obtidos estão em conformidade com o potencial observado na inibição da produção de PGE₂ (**Fig. 32**).

A acentuada diminuição na intensidade da marcação da banda protéica para iNOS e COX-2 foi evidenciada no tratamento da cultura celular com as chalconas, de forma mais expressiva na concentração de 20 µg/mL, assim como a redução do valor da densidade relativa das bandas obtido através da análise quantitativa por densitometria.

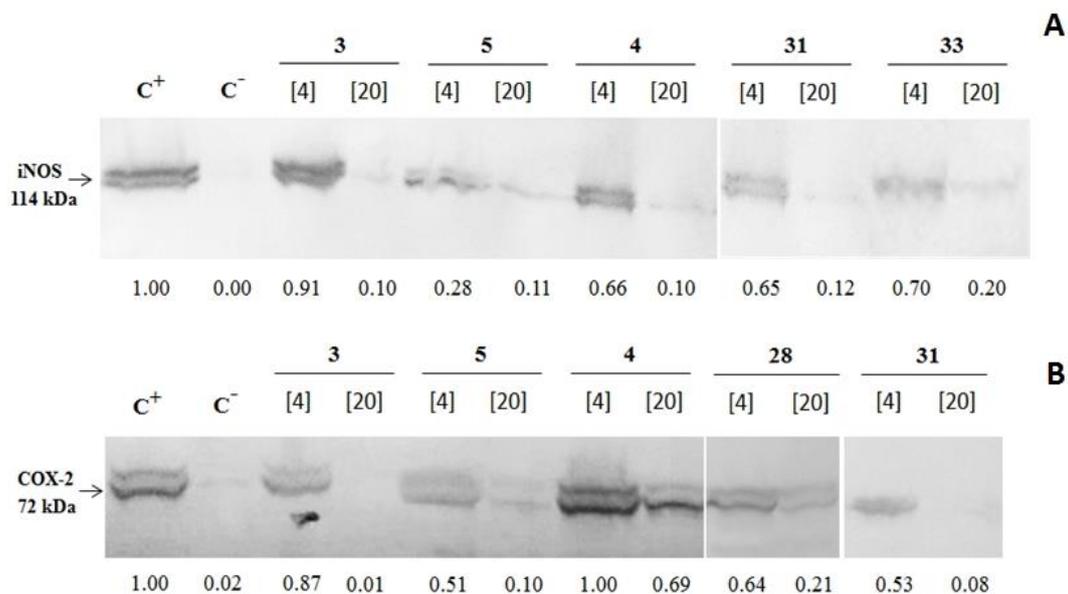


Figura 34. Efeitos das chalconas mais ativas sobre a expressão enzimática da iNOS e COX-2 em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. As células foram tratadas com LPS (1 µg/mL) e chalconas (4 e 20 µg/mL) por 24 h, lisadas e submetidas a análise por Western blot para a expressão da enzima iNOS (A) e COX-2 (B). Os resultados apresentados referem-se às chalconas que exibiram altos níveis de atividade inibitória (chalconas 3, 4, 5, 28, 31 e 33). As células tratadas apenas com LPS foram utilizadas como controle positivo de estimulação de macrófagos (C⁺). As células não tratadas foram usadas como controle negativo (C⁻). As imagens são representativas de dois experimentos independentes que apresentaram resultados semelhantes. Na parte inferior a cada imagem, os níveis das enzimas nas bandas imunorreativas foram quantificados por análise densitométrica. Cada banda foi comparada com a respectiva banda de controle positivo na mesma membrana e o valor para o controle positivo (células estimuladas por LPS) foi definido como 1 e outras condições foram calculadas de forma correspondente para permitir comparações de relação.

5.6. Avaliação das chalconas mais ativas na inibição do crescimento de cepas Mtb de diferentes níveis de virulência em cultura bacteriana

Para aprofundar a avaliação do potencial antimicrobiano das chalconas e como segundo objetivo do estudo, as chalconas que apresentaram maior potencial inibitório nos testes de *screening* envolvendo a cultura de *M. bovis* BCG (cepa avirulenta), foram investigadas quanto à capacidade antimicrobiana frente a duas culturas de *M. tuberculosis* patogênica, sendo uma delas de baixa virulência, a cepa laboratorial *M. tuberculosis* H37Rv e uma cepa hipervirulenta proveniente de isolado clínico, cepa M299, caracterizada por pertencer a sublinhagem moderna de cepas *M. tuberculosis* Beijing (RIBEIRO *et al.*, 2014).

Dezesseis chalconas foram selecionadas (3, 4, 5, 7, 8, 9, 15, 17, 19, 21, 24, 25, 33, 39, 40 e 41) e avaliadas primeiramente quanto à inibição do crescimento de Mtb

H37Rv. Os resultados foram apresentados na **Figura 35A** e os respectivos valores da concentração mínima inibitória (MIC) 50% e 90% foram mostrados na **Tabela 7**.

As chalconas **7** e **39** não foram capazes de inibir o crescimento micobacteriano da cepa H37Rv mesmo nas maiores concentrações (**Fig. 35A e Tab. 7**), enquanto as chalconas **19** e **40** apresentaram capacidade de inibição, em torno de 60-75%, a 100 µg/mL, nas menores concentrações, o potencial de inibição do crescimento micobacteriano não foi mantido, apresentando valor de MIC₅₀ e MIC₉₀ elevados (**Fig. 35A e Tab. 7**). As chalconas **17** e **21** inibiram cerca de 60% do crescimento da Mtb H37Rv e a chalcona **41** mostrou 75% e 43% de atividade inibitória nas concentrações de 100 e 20 µg/mL. O valor de MIC₅₀ foi de 63,8 ± 6,2 µM, 66,9 ± 6,2 µM e 82,1 ± 4,3 µM respectivamente e de MIC₉₀ foram elevados (**Fig. 35A e Tab. 7**). Deve-se considerar que na maior concentração testada, apenas a chalcona **40** apresentou efeito citotóxico baixo a moderado em cultura de macrófagos (**Fig. 31**), as demais demonstraram maior toxicidade nesta concentração, sendo um critério importante para análise da atividade antimicobacteriana priorizando substâncias seletivas ao patógeno.

A chalcona **33** inibiu quase completamente o crescimento micobacteriano na concentração de 100 µg/mL, embora de forma não seletiva (citotóxico para cultura de macrófagos), e nas demais concentrações, a capacidade inibitória não foi mantida (**Figura 35A**). O MIC₅₀ foi de 36,9 ± 4,5 µM (**Tab. 7**). As chalconas **15**, **24** e **25** também não apresentaram seletividade ao patógeno na maior concentração testada, contudo, na concentração de 20 µg/mL, a capacidade inibitória foi de 70% (chalconas **15** e **24**) e de 97% (chalcona **25**). Em menores concentrações, apenas a chalcona **24** exibiu 50% de potencial inibitório (**Fig. 35A**). O MIC₅₀ foi de 17,1 ± 3,8 µM, 25,3 ± 5,2 µM e 25,1 ± 5,2 µM respectivamente (**Fig. 35A e Tab. 7**). A chalcona **9** inibiu seletivamente o crescimento de Mtb H37Rv nas maiores concentrações testadas, em torno de 60-70%, mantendo em 50% a capacidade de inibição na concentração de 4 µg/mL. O valor de MIC₅₀ foi de 24,4 ± 4,5 µM (**Fig. 35A e Tab. 7**).

As chalconas **3**, **4**, **5** e **8** foram as mais ativas. Todas estas amostras inibiram quase completamente a inibição do crescimento do bacilo, na concentração de 100 µg/mL, sendo que para chalcona **8**, isto também ocorreu na concentração de 20 µg/mL, embora de forma não seletiva (**Fig. 31**). As chalconas **3**, **4** e **5**, inibiram seletivamente, em torno de 95% o crescimento micobacteriano na concentração de 20 µg/mL, e mantiveram este potencial em cerca de 55-75% na concentração de 4 µg/mL. Nesta concentração, a chalcona **8** exibiu 66% de capacidade inibitória (**Fig 35A**).

A maioria das substâncias foi ativa contra a cepa Mtb H37Rv, apresentando MIC₅₀ similar ao observado contra *M. bovis* BCG, apesar da diminuição da atividade inibitória quando analisado o valor de MIC₉₀ (**Tab. 7**). Deve ser notado que as substâncias mais ativas contra *M. bovis* BCG (**Tab. 2**), as chalconas **5** e **8** (MIC₉₀ 75,3 ± 8,4 µM e 33,7 ± 4,6 µM, respectivamente) foram menos potentes em relação a capacidade de inibição do crescimento de Mtb H37Rv (MIC₉₀ 303,2 ± 5,4 µM e 344,7 ± 0,4 µM, respectivamente).

Conforme realizado para o *screening* inicial em cultura de *M. bovis* BCG, o fármaco padrão rifampicina também foi avaliado, e destaca-se a utilização de maiores concentrações deste contra Mtb H37Rv (0,00032 µg/mL – 1 µg/mL), indicando maior grau de dificuldade na inibição do crescimento micobacteriano para esta cepa, todavia em comparação com as chalconas utilizadas, a rifampicina foi mais ativa. (**Fig. 35A**). O MIC₅₀ calculado foi de 0,11 ± 0,02 µM e o MIC₉₀, 0,15 ± 0,08 µM (**Tab. 7**).

A partir destes resultados, oito chalconas (**3, 4, 5, 8, 9, 15, 24** e **25**) foram selecionadas para avaliação da capacidade inibitória contra a cepa Mtb hipervirulenta M299. As chalconas **15** e **24** foram significativamente menos potentes contra o isolado clínico M299, apresentando elevado valor de MIC₅₀ (**Fig. 35B** e **Tab. 7**). A chalcona **9** inibiu em torno de 55-65% do crescimento micobacteriano nas maiores concentrações utilizadas, embora o potencial inibitório não tenha sido mantido nas menores concentrações (**Fig. 35B**). Em comparação com a atividade inibitória mostrada contra Mtb H37Rv, a chalcona foi menos ativa contra o isolado clínico duplicando o valor de MIC₅₀ (53,6 ± 1,9 µM) (**Tab. 7**).

Somente cinco chalconas (**3, 4, 5, 8** e **25**) mostraram similar perfil de atividade contra ambas as cepas *M. tuberculosis* (**Tab. 7**). A dificuldade em inibir o crescimento micobacteriano da cepa M299, pelas chalconas, também foi notada para o fármaco padrão utilizado, a rifampicina. Comparando os percentuais de inibição do crescimento obtidos pelo mesmo contra o isolado clínico hipervirulento notou-se um aumento de dez vezes na concentração anteriormente utilizada contra Mtb H37Rv (**Fig. 35** e **Tab. 7**).

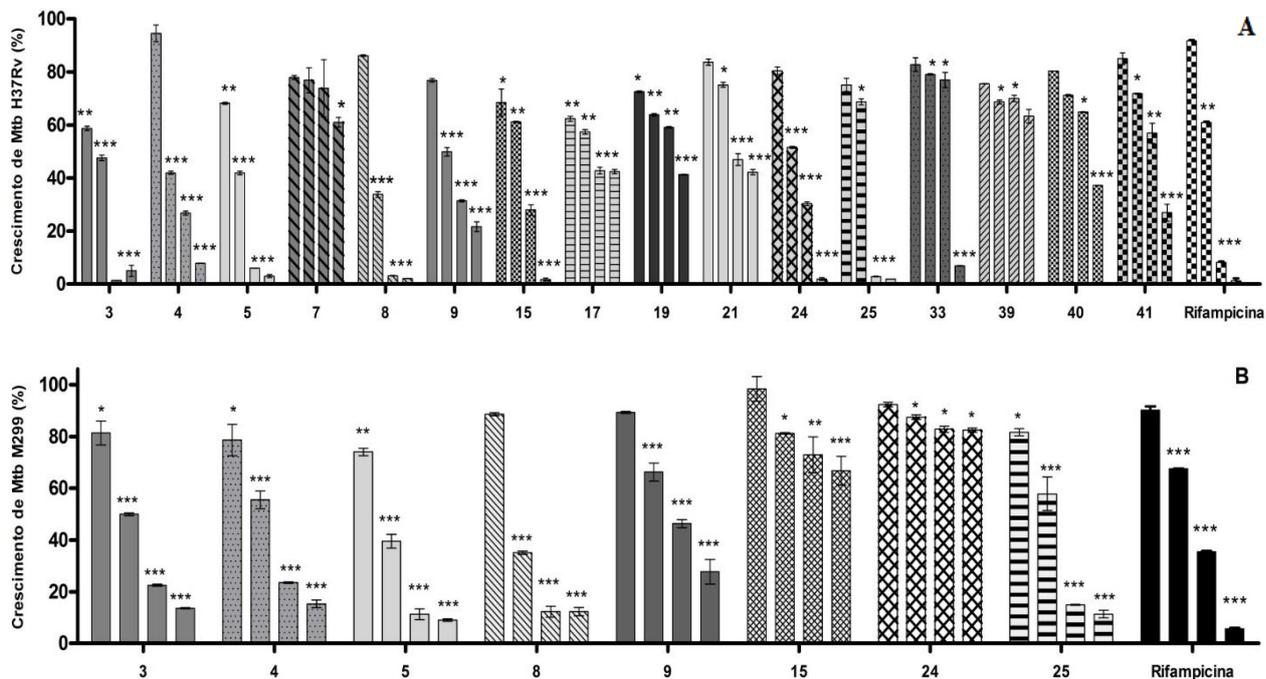


Figura 35. Efeito das chalconas na inibição do crescimento de cepas *M. tuberculosis* de baixa e hipervirulência. As suspensões bacterianas (1×10^6 CFU/poço) da cepa Mtb H37Rv (A) e do isolado clínico M299 (B) foram tratadas ou não tratadas com amostras de chalconas (0,8, 4, 20 e 100 $\mu\text{g/mL}$) ou rifampicina (0,00032 - 1 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa H37Rv e 0,008, - 10 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa M299) durante 5 dias. As quatro barras para cada amostra referem-se às concentrações em ordem crescente. As suspensões bacterianas tratadas com o fármaco rifampicina foram utilizadas como um controle positivo e a suspensão bacteriana não tratada como controle negativo. Valores são reportados como média \pm desvio padrão, e grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*).

Tabela 7. Concentração inibitória mínima das chalconas substituídas na inibição do crescimento micobacteriano da cepa laboratorial *M. tuberculosis* H37Rv e do isolado clínico *M. tuberculosis* M299.

Chalcona	MIC ₅₀ (μM)	MIC ₉₀ (μM)	MIC ₅₀ (μM)	MIC ₉₀ (μM)
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		<i>M. tuberculosis</i> M299	
3	13,0 \pm 3,3 ^a	372,7 \pm 3,6 ^a	18,4 \pm 3,9 ^a	373,9 \pm 1,4
4	19,7 \pm 1,9 ^a	320,1 \pm 4,8 ^b	20,1 \pm 1,0 ^a	351,5 \pm 1,8
5	12,7 \pm 1,9 ^a	303,2 \pm 5,4	11,7 \pm 3,4 ^a	289,6 \pm 0,7
7	>477,9	>477,9	XX	XX
8	10,5 \pm 3,8 ^a	325,9 \pm 3,3 ^b	10,2 \pm 4,9 ^a	344,7 \pm 0,4
9	24,4 \pm 4,5 ^a	252,1 \pm 2,7 ^c	53,6 \pm 1,9	313,0 \pm 1,4
15	17,1 \pm 3,8 ^a	287,8 \pm 5,5 ^c	>311,0	>311,0
17	63,8 \pm 6,2 ^b	>416,2	XX	XX
19	112,4 \pm 6,4 ^c	>376,8	XX	XX
21	66,9 \pm 6,2 ^b	368,2 \pm 5,2 ^a	XX	XX
24	25,3 \pm 5,2 ^a	374,6 \pm 6,8 ^a	>419,7	>419,7
25	25,1 \pm 5,2 ^a	366,1 \pm 3,6 ^a	18,5 \pm 3,6 ^a	366,9 \pm 0,3
33	36,9 \pm 4,5 ^a	355,8 \pm 4,9 ^a	XX	XX
39	>373,2	>373,2	XX	XX
40	131,7 \pm 1,3 ^c	351,8 \pm 5,9 ^a	XX	XX
41	82,1 \pm 4,3 ^b	275,3 \pm 6,7 ^c	XX	XX
Rifampicina	0,11 \pm 0,02	0,15 \pm 0,08	0,2 \pm 0,18	3,3 \pm 0,16

Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas (a-c) são significativamente diferentes ($p < 0,05$ ou $p < 0,001$, determinado pelo teste de Tukey). XX—não definido.

5.7. Avaliação do efeito das chalconas mais ativas em cultura de macrófago RAW 264.7 infectado por *M. tuberculosis* H37Rv

O *M. tuberculosis* infecta primariamente macrófagos e a composição da sua parede celular juntamente com a produção de diversos mediadores inflamatórios contribui para ativação continuada destas células que deve ser controlada rigidamente a fim de evitar danos teciduais excessivos (GARLANDA *et al.*, 2007). Substâncias capazes de inibir o crescimento intracelular dos bacilos nos macrófagos infectados são candidatos promissores para estudos farmacológicos aprofundados, uma vez que o potencial das amostras é testado no microambiente que mimetiza a fase intracelular da infecção natural da TB (MARRAPU *et al.*, 2011).

Após avaliar o potencial das chalconas diretamente em cultura de Mtb de baixa e hipervirulência, as chalconas mais ativas foram analisadas quanto ao potencial inibitório em macrófagos infectados por Mtb H37Rv na proporção de 1:1 (macrófago:micobactéria) e a viabilidade do bacilo foi verificada através da contagem das unidades formadoras de colônia (CFU).

Para atestar a viabilidade e o crescimento bacteriano durante o experimento, as culturas referentes ao controle positivo (macrófagos somente infectados) foram lisadas e semeadas no início (dia 0) e final (dia 4) da infecção. Para excluir a hipótese da redução do CFU estar vinculada a morte celular dos macrófagos, o método de LDH foi realizado após o período de tratamento realizado. A baixa concentração micobacteriana utilizada foi escolhida por não alterar a viabilidade dos macrófagos no período de observação (ZHANG *et al.*, 1999).

As chalconas **3**, **4**, **5**, **8**, **9**, **15**, **24**, **25** e **33** foram selecionadas para os experimentos de infecção *in vitro* de acordo com os resultados provenientes da avaliação da inibição do crescimento micobacteriano na cultura de *M. bovis* BCG e Mtb H37Rv.

As chalconas **15** e **33** apresentaram baixa capacidade de redução do crescimento bacteriano ($p > 0,05$), com elevado valor de MIC₅₀. Na maior concentração testada, o percentual de redução do número de CFU foi de $69,2 \pm 1,3\%$ e $93,2 \pm 0,7\%$ respectivamente (**Fig. 36A**), enquanto nas menores concentrações este potencial não foi mantido, embora a viabilidade da cultura de macrófagos não tenha sido afetada nestas concentrações pelo efeito citotóxico (**Fig. 36B**).

As chalconas **24** e **25** foram ativas em reduzir o crescimento intracelular do bacilo. Nas maiores concentrações, o potencial de redução da viabilidade bacilar para

ambas foi em torno de 90%. Na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, a chalcona **25** foi capaz de reduzir $89,4 \pm 1,5\%$ do crescimento intracelular de Mtb sem interferência citotóxica para o cultivo celular (**Fig. 36A e B**), à medida que a chalcona **24** inibiu $54,7 \pm 1,8\%$ na mesma concentração (**Fig. 36A e B**). Em menores concentrações, o potencial de redução no crescimento intracelular do bacilo não foi mantido.

As amostras mais ativas e de similar potencial de atividade ($p > 0,05$) foram as chalconas **3**, **4**, **5**, **8** e **9**. Nas maiores concentrações testadas, todas as amostras inibiram mais de 90% do crescimento intracelular micobacteriano (**Fig. 36A**), ainda que somente a chalcona **9**, na maior concentração testada tenha inibido de forma seletiva (**Fig. 36B**). Nas menores concentrações, as chalconas testadas reduziram em torno de 60-80% do crescimento intracelular de Mtb, destacando-se as chalconas **4** e **5** que mostraram potencial inibitório de 50%, com valor de MIC_{50} de $4,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ e $3,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$.

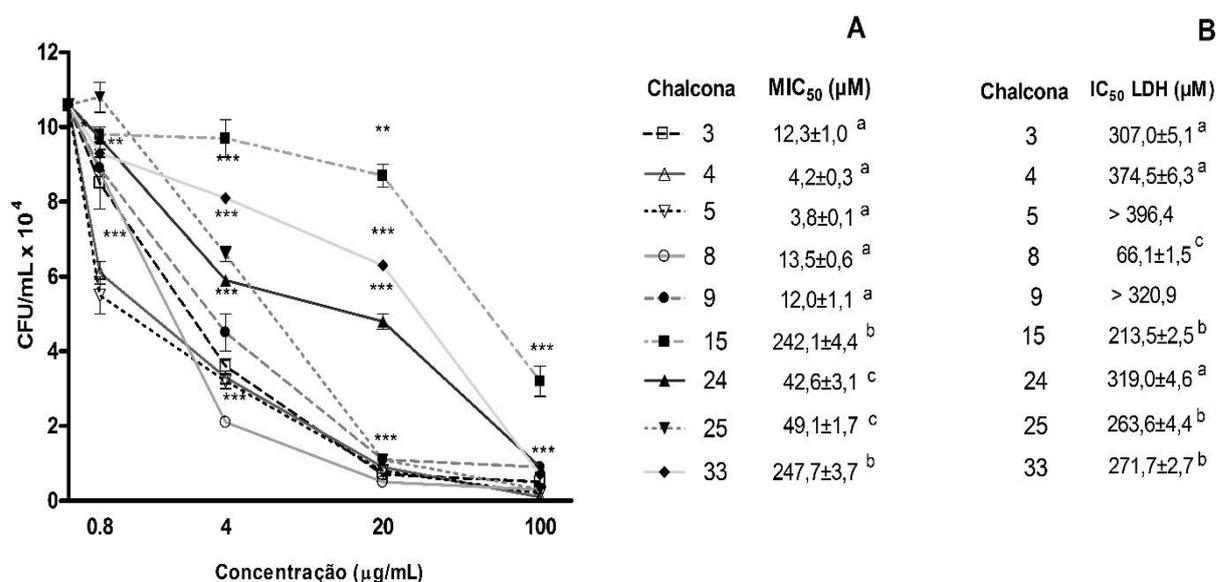


Figura 36. Efeito das chalconas em cultura de macrófagos RAW 264.7 infectados por *M. tuberculosis* H37Rv. Macrófagos RAW 264.7 foram infectados com Mtb H37Rv na razão de infecção de 1:1 (macrófago:micobactéria) e tratadas com as chalconas na concentração de 100, 20, 4 e 0,8 $\mu\text{g/mL}$ por 4 dias. A viabilidade intracelular do bacilo foi determinada por contagem do CFU (**A**) e a toxicidade das chalconas para os macrófagos foi avaliada pelo método do LDH (**B**). Os resultados apresentados são valores obtidos após 3 experimentos realizados em triplicata. $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*) comparado ao controle positivo (macrófago não tratado). Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas (a-c) são significativamente diferentes ($p < 0,05$ ou $p < 0,001$; determinado pelo teste de Tukey).

5.8. Avaliação do efeito das chalconas mais ativas em associação ao fármaco rifampicina na viabilidade da cepa *M. tuberculosis* hipervirulenta

O tratamento da TB resistente a fármacos envolve um cenário amplamente complexo em termos de patologia e severidade da doença. A combinação de antibióticos no tratamento da TB é uma prática comum na clínica terapêutica para combater o desenvolvimento de resistência do bacilo ao fármaco em virtude da monoterapia, o que é importante durante o tratamento de longa duração. Tal tratamento pode resultar em efeito aditivo ou sinérgico em relação à monoterapia exclusiva proporcionando maior eficácia e redução na concentração de cada fármaco utilizado, podendo reduzir possíveis efeitos colaterais, o custo do tratamento e a duração do mesmo (GUZMAN *et al.*, 2013; MÜLLER *et al.*, 2013).

Nesta etapa do estudo, o potencial das chalconas **3**, **4**, **5**, **8** e **25** foi avaliado quando em associação ao fármaco padrão rifampicina numa concentração previamente estabelecida (0,04 µg/mL) onde o potencial inibitório da mesma foi de no máximo 30%, a fim de investigar se o acréscimo das chalconas nas concentrações de 0,8, 4, 20 e 100 µg/mL ao tratamento da rifampicina teria efeito negativo ou positivo na capacidade de inibição do crescimento micobacteriano do isolado clínico M299. Os resultados obtidos no tratamento exclusivo com as chalconas testadas (**Fig. 35B** e **Tab. 7**) foram comparados ao observado no ensaio de associação entre estas e o fármaco padrão, rifampicina.

Como pode ser observado na **Figura 37**, a associação do tratamento entre o fármaco padrão rifampicina com cada uma das chalconas **3 (A)**, **5 (C)** e **25 (E)** mostrou-se ser positiva com relação à inibição do crescimento de Mtb M299. A elevação do potencial inibitório foi confirmada pela diminuição do MIC₅₀ observado na associação dos tratamentos quando comparado ao mesmo de forma exclusiva (**Tab. 8**). As amostras foram similares em termos de capacidade inibitória ($p > 0,05$). Nas menores concentrações, 0,8 e 4 µg/mL, onde de forma exclusiva o tratamento com as chalconas apresentava baixa a moderada capacidade de inibição do crescimento bacilar, a associação do tratamento exibiu significativa redução do crescimento micobacteriano ($p < 0,001$).

Quando analisado os resultados obtidos na associação entre a chalcona **4** e a rifampicina observou-se a não ocorrência de alterações no efeito inibitório (**Fig. 37B**), sendo similar ao obtido no tratamento exclusivo com a chalcona ($p > 0,05$). O valor de

MIC₅₀ obtido a partir da associação da chalcona **4** à rifampicina e o tratamento exclusivo com a mesma não diferiram em potencial ($p > 0,05$) (**Tab. 8**).

A associação entre a chalcona **8** e a rifampicina mostrou uma facilitação da sobrevivência da cultura micobacteriana de Mtb M299, decorrente da redução na capacidade da chalcona quando em associação inibir o crescimento micobacteriano (**Fig. 37D**). Em distinção ao tratamento exclusivo com a chalcona **8**, houve um aumento do valor de MIC₅₀ (**Tab. 8**). Esta associação foi menos efetiva e mostrou-se desfavorável para inibição do crescimento micobacteriano.

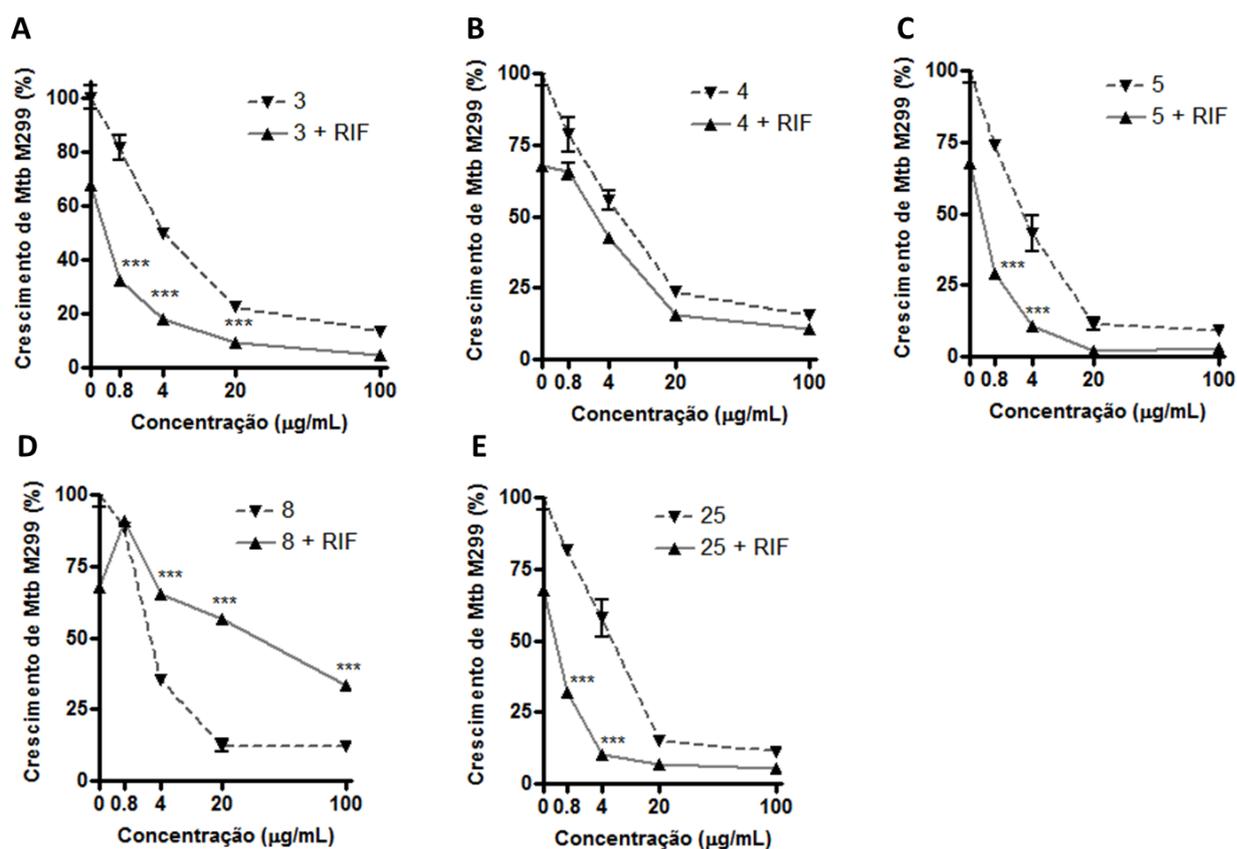


Figura 37. Efeito da associação das chalconas mais ativas à rifampicina contra *M. tuberculosis* hipervirulenta. A suspensão bacteriana (1×10^6 CFU/poço) do isolado clínico M299 foi tratada ou não tratada com cada chalcona (0,8, 4, 20 e 100 µg/mL) associada a rifampicina (0,04 µg/mL) durante 5 dias. Os gráficos **A**, **B**, **C**, **D** e **E** se referem respectivamente aos ensaios com as chalconas **3**, **4**, **5**, **8** e **25**. A viabilidade micobacteriana foi quantificado pelo método do MTT. Os dados foram apresentados como porcentagem de crescimento bacteriano de cada cultura tratada em comparação com o crescimento da cultura não tratada (controle negativo, 100%). A linha contínua cinza refere-se ao percentual de inibição do crescimento micobacteriano para o tratamento exclusivo com cada chalcona enquanto a linha pontilhada refere-se ao efeito da associação das chalconas com a rifampicina. Os resultados apresentados são valores obtidos após 3 experimentos realizados em triplicata. $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*).

Tabela 8. Concentração inibitória mínima (50%) referente ao tratamento com as chalconas associadas ou não a rifampicina quanto à inibição do crescimento micobacteriano da cepa Mtb M299.

Chalcona	MIC ₅₀ (µM)		Chalcona	MIC ₅₀ (µM)	
	Mtb M299			Mtb M299	
3	18,4 ± 3,9 ^a		3 + RIF	0,7 ± 0,2 ^a	
4	20,1 ± 1,0 ^a		4 + RIF	8,9 ± 0,5 ^b	
5	11,7 ± 3,4 ^a		5 + RIF	1,0 ± 0,3 ^a	
8	10,2 ± 4,9 ^a		8 + RIF	144,3 ± 1,4	
25	18,5 ± 3,6 ^a		25 + RIF	0,8 ± 0,1 ^a	

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).

5.9. Avaliação do efeito das chalconas mais ativas na viabilidade de bactérias extracelulares agregadas em *clumps*

A replicação acelerada de micobactérias virulentas em macrófagos induz morte necrótica promovendo a liberação do bacilo ou *clumps* de bacilos (PARK *et al.*, 2006). A maior parte destas bactérias liberadas torna-se extracelular e se adapta à necrose formando agregados ou *clumps* (ORME, 2013). A formação destes agregados bacterianos explica a aparente "tolerância à droga" das bactérias persistentes. Atualmente, foi demonstrado que o *M. tuberculosis* pode formar biofilmes *in vitro*, e estes possuem um tipo de matriz extracelular formado por ácidos micólicos livres, tornando-se altamente resistentes a antibióticos (ORME, 2011 e OJHA, *et al.*, 2008).

Deste modo, o potencial das chalconas mais ativas (**3**, **4**, **5**, **8** e **25**) na inibição do crescimento micobacteriano de cepas virulentas em cultura e em macrófagos infectados foi avaliado quanto ao efeito na viabilidade de bactérias extracelulares agregadas em *clumps*.

O fármaco padrão rifampicina (10, 0,2, 0,04 e 0,008 µg/mL) também foi avaliado quanto ao efeito na viabilidade dos agregados micobacterianos para ambas as cepas.

Vale ressaltar as diferenças existentes em termos de crescimento bacilar e aparência da cultura celular infectada pelas cepas Mtb de baixa e hipervirulência utilizadas. O isolado clínico M299, possui maior taxa de crescimento bacteriano do que a cepa Mtb H37Rv e embora ambas nesta razão de infecção induzam morte necrótica nos macrófagos, a cepa hipervirulenta exibe maior proporção deste tipo de morte celular.

As chalconas mais ativas, de forma geral, exibiram capacidade de reduzir a viabilidade dos agregados micobacterianos para ambas as cepas, embora este tenha

sido menor quando comparado à capacidade inibitória diretamente em cultura bacteriana e em cultura celular infectada em menor proporção de bactérias.

A redução do potencial inibitório também foi observada para o tratamento com o fármaco padrão rifampicina. Nas menores concentrações, o elevado potencial inibitório observado anteriormente foi diminuído contra os agregados micobacterianos em *clumps* para ambas as cepas utilizadas na infecção da cultura celular. O valor de MIC₅₀ foi de 0,4 ± 0,1 µM (H37Rv) e 0,6 ± 0,1 µM (M299), o que confirmou a maior dificuldade do fármaco em reduzir o crescimento dos agregados micobacterianos (**Tab. 9**), embora tenha sido mais ativo comparado ao efeito das chalconas.

Em relação ao controle positivo, as chalconas **3**, **5** e **8** foram as mais ativas em reduzir a viabilidade dos agregados micobacterianos da cepa Mtb H37Rv. Nas maiores concentrações utilizadas as amostras exibiram percentuais de redução em torno de 95%. Contudo, na concentração de 4 µg/mL, somente a chalcona **5** demonstrou potencial inibitório de 50,9 ± 2,1%, as demais exibiram menor capacidade inibitória (**Fig. 38A**). A capacidade de reduzir a viabilidade dos agregados micobacterianos da cepa Mtb H37Rv não foram mantidos na menor concentração utilizada sendo similar ao controle somente infectado ($p > 0,05$) (**Fig. 38**). O valor de MIC₅₀ foi de 20,5 ± 0,4 µM, 16,2 ± 0,7 µM e 18,5 ± 1,6 µM para as chalconas **3**, **5** e **8** (**Tab. 9**). Comparado aos resultados obtidos anteriormente nos ensaios em cultura de macrófagos infectados pela cepa Mtb H37Rv em menor proporção e diretamente em cultura bacteriana (**Fig. 36 e Tab. 7**), o potencial inibitório foi pouco menor (**Tab. 9**).

As chalconas **4** e **25** mostraram capacidade inibitória menor do que as chalconas **3**, **5** e **8** ($p < 0,001$), embora tenham exibido potencial na redução da viabilidade dos agregados micobacterianos da cepa Mtb H37Rv. Nas maiores concentrações, os índices de inibição foram maiores que 90% e em concentrações menores o potencial inibitório alcançou somente 30% (**Fig. 38A**). O valor de MIC₅₀ foi de 26,6 ± 0,9 µM e 28,9 ± 0,8 µM (**Tab. 9**).

Comparando o potencial inibitório das chalconas no crescimento dos agregados micobacterianos da cepa Mtb H37Rv ao apresentado contra os da cepa Mtb M299, as chalconas **3**, **4** e **5** mantiveram a atividade inibitória, enquanto as chalconas **8** e **25** demonstraram similar redução de potencial (**Fig. 38B**). Isto foi confirmado pelo aumento no valor de MIC₅₀ calculado para as amostras em ambas as condições ($p < 0,001$) (**Fig. 38C**).

A chalcona **4** apresentou capacidade de reduzir a viabilidade dos agregados micobacterianos da cepa Mtb M299 em cerca de 90% (100 µg/mL) e 75% (20 µg/mL).

Na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$, o percentual de inibição foi de somente 30% (**Fig. 38B**). O valor de MIC_{50} foi de $35,5 \pm 0,9 \mu\text{M}$ (**Tab. 9**).

As chalconas **3** e **5** se destacaram em reduzir a viabilidade de crescimento dos agregados micobacterianos da cepa Mtb M299, sendo em torno de 90% nas maiores concentrações testadas. Na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$, o potencial de inibição foi de 46% para a chalcona **3**, e de 50% para a chalcona **5** (**Fig. 38B**). O valor de MIC_{50} foi de $20,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$ e $18,4 \pm 0,8 \mu\text{M}$ (**Tab. 9**).

O estudo do efeito das chalconas diretamente em cultura bacteriana, como também no crescimento intracelular em cultura de macrófagos infectados por cepas de virulência distintas ou mesmo na viabilidade de crescimento dos agregados micobacterianos permitiu aprofundar os conhecimentos acerca do potencial destas chalconas e conjuntamente com os resultados obtidos no estudo anti-inflamatório selecionar a amostra mais promissora para ensaios em modelo murino de tuberculose pulmonar severa, induzida em camundongos C57Bl/6 por cepa hipervirulenta.

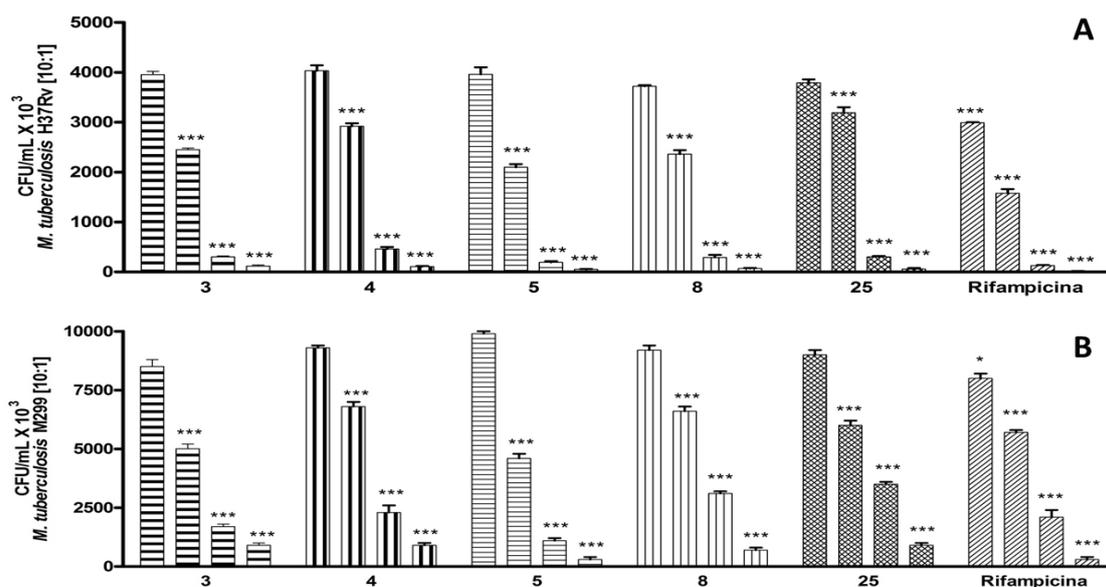


Tabela 9. Concentração inibitória mínima (50%) das chalconas na viabilidade de agregados extracelulares da cepa Mtb H37Rv e do isolado clínico M299.

Chalcona	MIC ₅₀ (µM)		Chalcona	MIC ₅₀ (µM)	
	Mtb H37Rv			Mtb M299	
3	20.5 ± 0.4		3	20.7 ± 1.1	
4	26.6 ± 0.9		4	35.5 ± 0.9	
5	16.2 ± 0.7		5	18.4 ± 0.8	
8	18.5 ± 1.6		8	40.4 ± 1.8	
25	28.9 ± 0.8		25	40.8 ± 0.7	
Rifampicina	0.4 ± 0.1		Rifampicina	0.6 ± 0.1	

Valores na mesma coluna com diferentes letras sobrescritas (a-c) são significativamente diferentes ($p < 0,05$ ou $p < 0,001$; determinado pelo teste de Tukey).

5.10. Avaliação do efeito da chalcona 5 no crescimento bacteriano nos pulmões de camundongos infectados

Após a avaliação *in vitro* das amostras obtidas quanto à atividade anti-inflamatória e antimicobacteriana, a chalcona **5** foi selecionada para continuação dos estudos visando a abordagem *dual* para o tratamento da tuberculose, visto a mesma ter exibido maior potencial dentre as demais em ambas as atividades nos experimentos anteriormente realizados.

Para este propósito, a avaliação do efeito terapêutico da chalcona **5** foi efetuada em modelo murino C57Bl/6 infectado pela cepa *M. tuberculosis* hipervirulenta, já estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa (AMARAL, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012). Este modelo se caracteriza pela indução de tuberculose progressiva, crescimento bacilar nos pulmões e reprodução de várias manifestações patológicas das formas clínicas severas da TB humana, incluindo pneumonia tuberculosa com áreas de necrose e disseminação miliar para o baço e o fígado (AMARAL *et al.*, 2014). Assim, o estabelecimento deste modelo animal possibilitou o estudo do efeito terapêutico da chalcona **5** na redução das lesões necróticas (prevenção ou minimização dos danos teciduais) e no crescimento do bacilo.

A caracterização do tratamento com a chalcona **5** no âmbito *dual* foi comparado a terapia com fármacos conhecidos pela atuação nas respectivas abordagens terapêuticas, antimicobacteriana e anti-inflamatória, sendo portanto, inseridos no delineamento experimental grupos de animais tratados com o fármaco padrão anti-TB, rifampicina, e com o fármaco anti-inflamatório ibuprofeno. Inicialmente, o parâmetro utilizado para avaliar o efeito terapêutico antimicobacteriano das amostras foi investigar

a capacidade de crescimento do bacilo nos pulmões dos camundongos infectados. Após 15 dias da infecção, os camundongos separados em grupo foram submetidos ao tratamento diário por via intraperitoneal com a chalcona **5**, rifampicina ou ibuprofeno.

Todos os grupos de animais tratados, independente da substância utilizada no tratamento intraperitoneal e da duração do mesmo, diferiram significativamente dos animais somente infectados ($p < 0,001$) em relação à redução da carga bacilar quantificado através da contagem de CFUs (**Fig. 39**).

Os animais tratados com a chalcona **5** na dose de 20 mg/kg durante 15 dias de tratamento, reduziram 1,8 em Log_{10} do CFU apresentado pelos animais não tratados. Entretanto, a redução induzida pela rifampicina foi significativamente maior (de 2,7 Log_{10}). Após 30 dias de tratamento, os efeitos inibitórios de ambas substâncias foram similares – cerca de 3 Log_{10} do CFU (**Fig. 39**). Deve-se considerar que a dose de tratamento da rifampicina foi a metade do utilizado para a chalcona **5**, no entanto efeitos colaterais, como diarreia foram observados de forma expressiva durante o tratamento com a rifampicina.

O tratamento durante 15 dias com o fármaco anti-inflamatório ibuprofeno reduziu 1,4 em Log_{10} do CFU, apresentando o nível de eficácia inibitória compatível com o tratamento efetuado com a chalcona **5**, contudo o potencial foi significativamente menor ao exibido pela rifampicina no mesmo período de tempo (**Fig. 39**). Após 30 dias de tratamento, o efeito do ibuprofeno na redução do crescimento micobacteriano aumentou, demonstrando 2,1 Log_{10} de diferença em número de CFU comparado ao grupo dos animais não tratados. Entretanto, durante o mesmo período de tempo os efeitos do tratamento com a chalcona **5** ou rifampicina foram significativamente maiores (**Fig. 39**).

O efeito terapêutico da chalcona **5** quanto ao crescimento bacteriano nos pulmões, também foi avaliado em camundongos BALB/c infectados pela cepa Mtb M299 a fim de verificar os resultados obtidos em outro modelo murino. Neste modelo foi realizado o tratamento comparativo apenas com o fármaco rifampicina. Como observado na **Tabela 10**, o tratamento com a chalcona **5** também apresentou redução na carga bacilar de até 2,7 Log_{10} CFU em 30 dias de tratamento. O tratamento com a rifampicina apresentou maior efeito de redução assim como observado no modelo murino C57Bl/6.

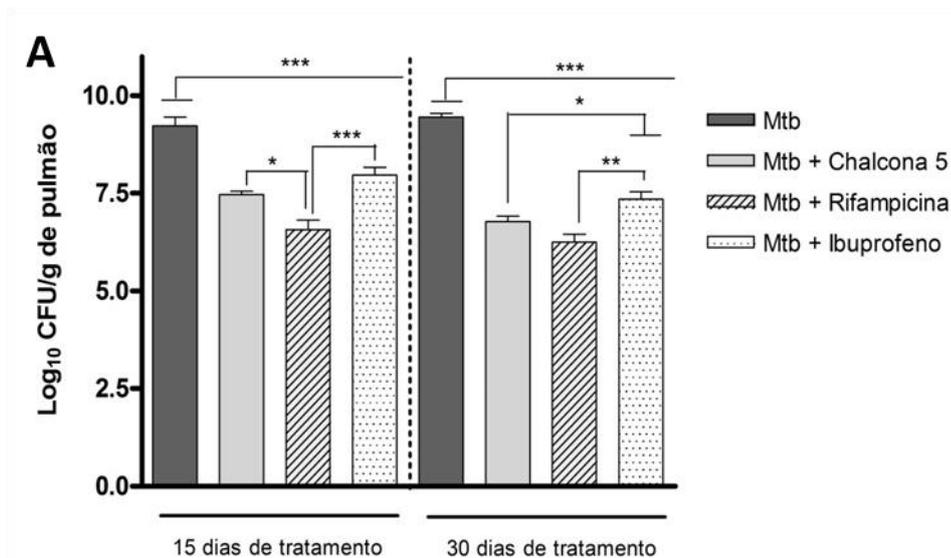


Figura 39. Efeito do tratamento com a chalcona 5, ibuprofeno ou rifampicina no crescimento micobacteriano intracelular nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados. Camundongos C57Bl/6 foram infectados intratraquealmente com 100 bacilos da cepa Mtb M299, e após 15 dias de infecção foram tratados diariamente em grupos separados (n=5) por 15 e 30 dias (via intraperitoneal) com chalcona 5 (20 mg/kg), rifampicina (10 mg/kg) ou ibuprofeno (40 mg/Kg, somente no tratamento dos animais C57Bl6 infectados). O crescimento micobacteriano nos pulmões foi avaliado através da contagem de CFU. Os resultados apresentam média \pm desvio padrão de 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.

Tabela 10. Efeito do tratamento com a chalcona 5, ibuprofeno ou rifampicina no crescimento micobacteriano intracelular nos pulmões dos camundongos BALB/c infectados.

	Log ₁₀ CFU	
	15 dias de tratamento (30 dias de infecção)	30 dias de tratamento (45 dias de infecção)
Mtb	5,9 \pm 0,3	5,7 \pm 0,8
Mtb + Chalcona 5	3,8 \pm 0,6	3,0 \pm 0,4
Mtb + Rifampicina	3,0 \pm 0,1	2,5 \pm 0,3

Valores reportados como média \pm desvio padrão de valores obtidos em dois experimentos independentes.

5.11. Avaliação do efeito da chalcona 5 na patologia dos pulmões de camundongos infectados

Para avaliar o efeito do tratamento com a chalcona 5 na progressão da tuberculose severa, foi realizada a análise da patologia pulmonar dos animais infectados em comparação aos grupos de animais infectados e tratados pela chalcona 5 ou fármacos ibuprofeno e rifampicina.

Após fixação com formol para posterior estudo histopatológico, o lóbulo pulmonar direito de um animal representativo pertencente aos diferentes grupos de experimentação foi fotografado para comparação da macropatologia induzida (**Fig. 40A**). A massa relativa de cada órgão (**Fig. 40B**) foi calculada em relação ao peso em gramas (**Fig. 40C**) do pulmão do animal controle.

Como observado na **Figura 40A**, os pulmões dos animais somente infectados foram maiores do que o dos animais não infectados e dos animais infectados e tratados, independente do tratamento utilizado e duração do mesmo. Macroscopicamente, os pulmões dos animais infectados e não tratados apresentavam grandes lesões inflamatórias, onde pode-se observar nódulos difusos de coloração esbranquiçada de diferentes tamanhos, o que associa-se com o aumento do peso e da massa relativa pulmonar, que foi 2,7 vezes maior que em animais de controle (**Fig. 40B e C**). Entre 30 e 45 dias de curso da infecção, o peso e a massa relativa pulmonar dos animais não tratados não diferiu significativamente ($p > 0,05$) (**Fig. 40B e C**). O peso pulmonar dos animais tratados pelos fármacos foi cerca de 1,5 a 2 vezes menor do que o peso dos pulmões dos animais infectados o que reflete a redução da intensidade da infiltração pelas células inflamatórias no órgão.

Os pulmões dos animais tratados com a chalcona 5 durante 15 dias de tratamento exibiram menor número de lesões inflamatórias e em menor tamanho, o que condiz com a redução do peso pulmonar, em cerca de 45%, quando comparado ao dos pulmões dos animais não tratados (**Fig. 40C**). Em 30 dias de tratamento, o efeito da chalcona 5 foi ainda mais acentuado, com a redução do peso pulmonar maior que 50% em comparação com o grupo não tratado. Quando comparado com os efeitos dos outros fármacos utilizados para o tratamento dos animais infectados, a redução do peso pulmonar observada nos grupos tratados pelas chalcona 5 e o fármaco anti-inflamatório, ibuprofeno, foi similar, enquanto o efeito do antibiótico rifampicina foi significativamente menor (**Fig. 40C**).

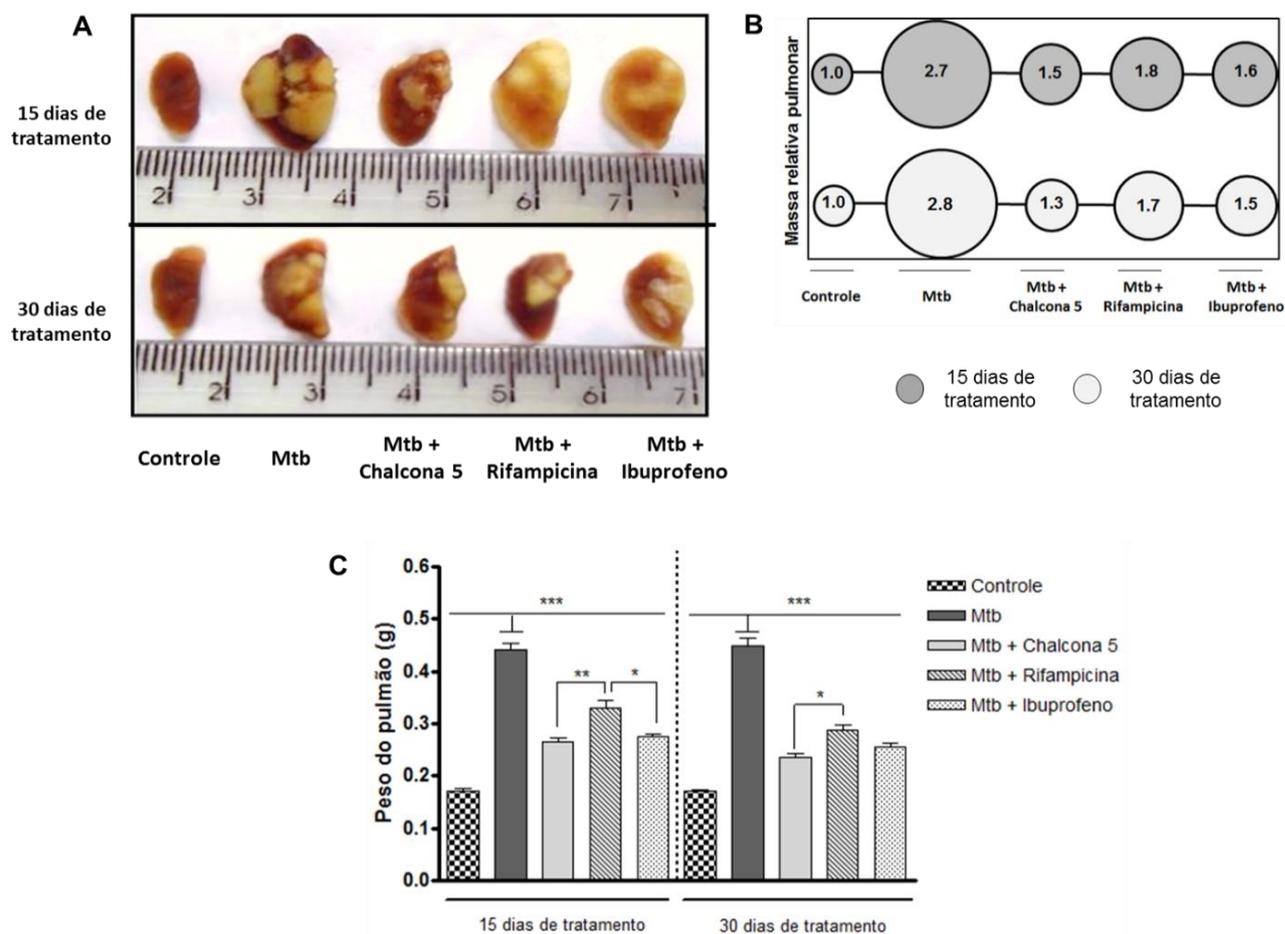


Figura 40. Efeito do tratamento com a chalcona **5**, ibuprofeno ou rifampicina na macropatologia pulmonar induzida nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa Mtb hipervirulenta. Camundongos C57Bl/6 foram infectados intratraquealmente com 100 bacilos e após 15 dias de infecção foram tratados diariamente em grupos separados por 15 ou 30 dias (via intraperitoneal) com chalcona **5** (20 mg/kg), rifampicina (10 mg/kg) ou ibuprofeno (40 mg/Kg) e posteriormente sacrificados. Foram infectados cinco animais de cada grupo de tratamento. A macropatologia pulmonar foi avaliada qualitativamente através da imagem do lóbulo direito pulmonar 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 após dois experimentos independentes. $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*), comparando cada grupo tratado com o grupo apenas infectado com a cepa Mtb M299.

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). Os pulmões dos animais infectados pela cepa hipervirulenta apresentaram o desenvolvimento da patologia da tuberculose severa. Ao final de 30 dias de infecção os pulmões exibiram extensa área de pneumonia tuberculosa, cerca de 80% da área total dos cortes pulmonares (**Fig. 41-43**), apresentando uma certa delimitação dos nódulos granulomatosos (**Fig. 41B**, setas

vetmelhas), compostos na periferia por áreas de alveolite com o espessamento das paredes alveolares, além de alvéolos e brônquios cheios de macrófagos, neutrófilos e linfócitos (**Fig. 41B**, setas pretas). Além disso, múltiplos focos de necrose intragranulomatosa decorrente da progressão da pneumonia tuberculosa foram presentes (**Fig. 41B**, estrela), mostrando numerosa quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) intra- e extracelulares (**Fig. 42**). Foi observado trombose de vasos nas regiões necróticas. As regiões adjacentes aos nódulos granulomatosos embora sem a presença marcante de infiltrado celular apresentavam grande quantidade de exsudato seroso. Hemorragias focais também foram observadas nessas áreas devido a dilatação dos capilares sanguíneos. (**Fig. 41B**). A análise dos pulmões ao final de 45 de infecção, exibiu tendência de redução nas áreas de alveolite e no percentual de área de pneumonia (**Fig. 41-43**), demonstrando uma certa melhoria no quadro patológico associada ao controle de infecção pelo sistema imune atingida ao final da fase aguda da doença.

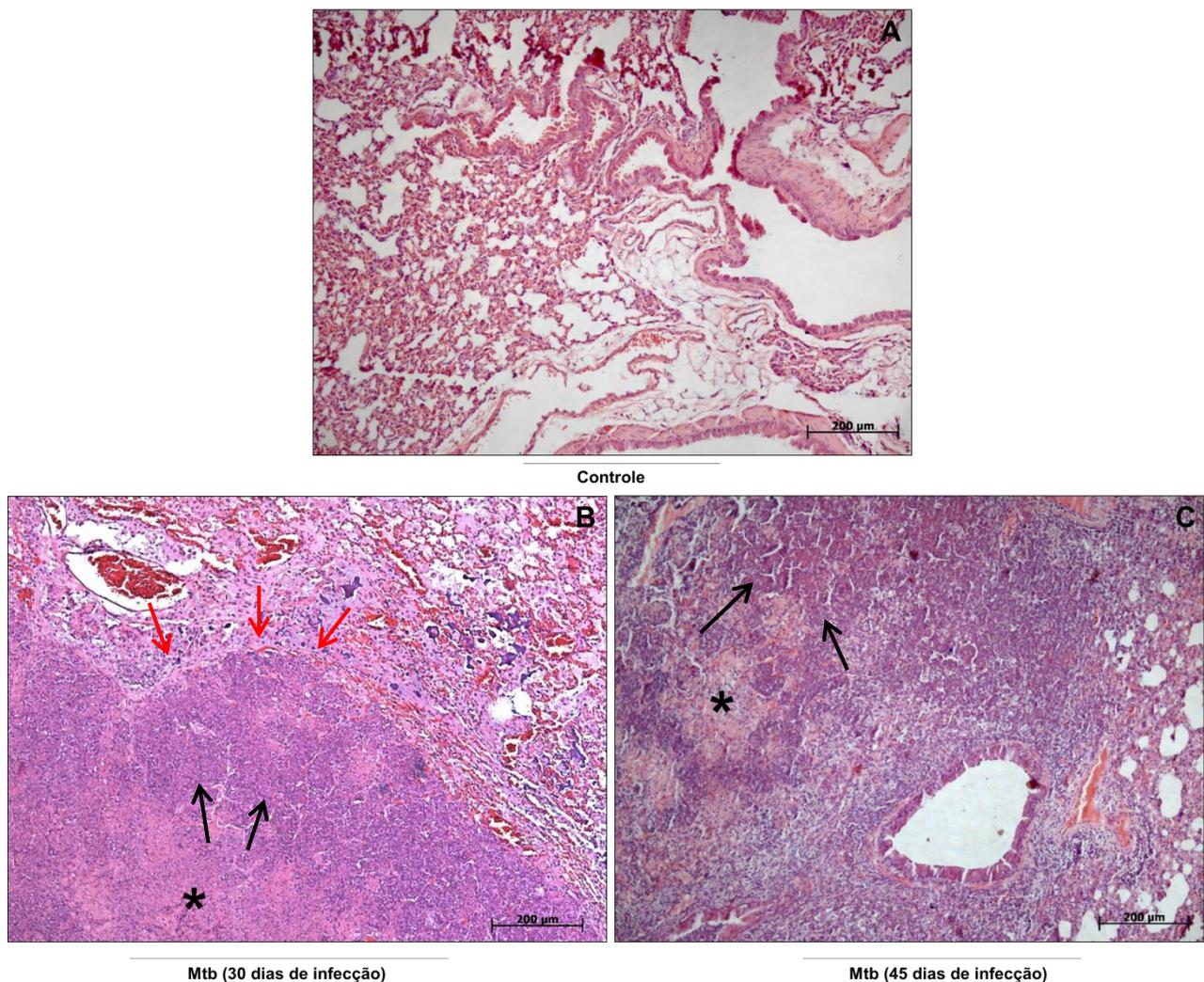


Figura 41. Análise histopatológica comparativa entre os pulmões de camundongos C57BL/6 controle e infectados por cepa *Mtb* hipervirulenta. Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com ~100 bacilos e sacrificados após 30 ou 45 dias de infecção. Os lóbulos inferior esquerdo, superior e médio direito do pulmão foram fixados em formol e processados histologicamente. As lâminas do tecido foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) e observadas em microscópio óptico com aumento de 100X. **(A)** animal controle, **(B)** animal infectado com 30 dias de infecção e **(C)** animal infectado com 45 dias de infecção. As setas pretas indicam áreas de alveolite e as setas vermelhas apontam uma borda delimitando a área de pneumonia tuberculosa, enquanto a estrela indica área necrótica.

Os pulmões dos animais infectados e tratados com a chalcona **5** durante 15 dias apresentaram diminuição da área de pneumonia tuberculosa em torno de 50% (**Fig. 42 e 44**), comparado aos animais sem tratamento. Foram observada redução da área de alveolite e necrose nas áreas granulomatosas e do exsudato seroso alveolar nas regiões adjacentes. Uma grande parte do tecido pulmonar apresentava áreas livres da patologia (**Fig. 42**), o que correspondeu ao menor peso e massa relativa pulmonar (**Fig. 40**). Foi observada menor quantidade de BAAR nas amostras coradas através de técnica Ziehl Neelsen (**Fig. 42**).

Em maior período de tratamento (30 dias), a área de patologia foi ainda menor, apresentando redução de 60-70% em comparação com os animais não tratados (**Fig. 44**). Os granulomas foram menores, sem alveolite e exsudato seroso (**Fig. 43**).

Comparando os efeitos do tratamento com chalcona **5** e ibuprofeno (fármaco anti-inflamatório), não houve diferença estatisticamente significativa no que diz respeito a redução da área de pneumonia observada após 15 dias de tratamento ($p > 0,05$, **Fig. 42 e 43**). Os animais de ambos os grupos apresentaram menor área de alveolite pulmonar e volume de infiltrado celular em relação aos pulmões dos animais sem tratamento (**Fig. 42**). A quantidade de bacilos coradas pelo método de Ziehl Neelsen foi também menor comparado aos pulmões dos animais sem tratamento (**Fig. 42**). Entretanto, após 30 dias de tratamento, os pulmões dos animais tratados com a chalcona **5** apresentaram menor área de pneumonia do que os pulmões dos animais tratados com ibuprofeno ($p < 0,05$) (**Fig. 44**), demonstrando melhor efeito terapêutico.

Os animais tratados com rifampicina durante 15 dias, mostraram maior redução na quantidade de BAAR no pulmão, comparado aos animais tratados com chalcona **5** (**Fig.42**). Contudo em termos de patologia pulmonar, os animais tratados pela rifampicina não apresentaram redução significativa da área de pneumonia, como foi observado para os animais tratados com a chalcona **5** ou ibuprofeno, exibindo regiões com acúmulo de exsudato seroso e maiores extensões de áreas de alveolite. O tratamento com a rifampicina não foi capaz de reduzir o desenvolvimento de áreas necróticas, onde foi possível observar a presença de bacilos extracelulares (**Fig. 43**). Em 30 dias de tratamento com rifampicina, a área de pneumonia diminuiu apenas em 20% (**Fig. 44**).

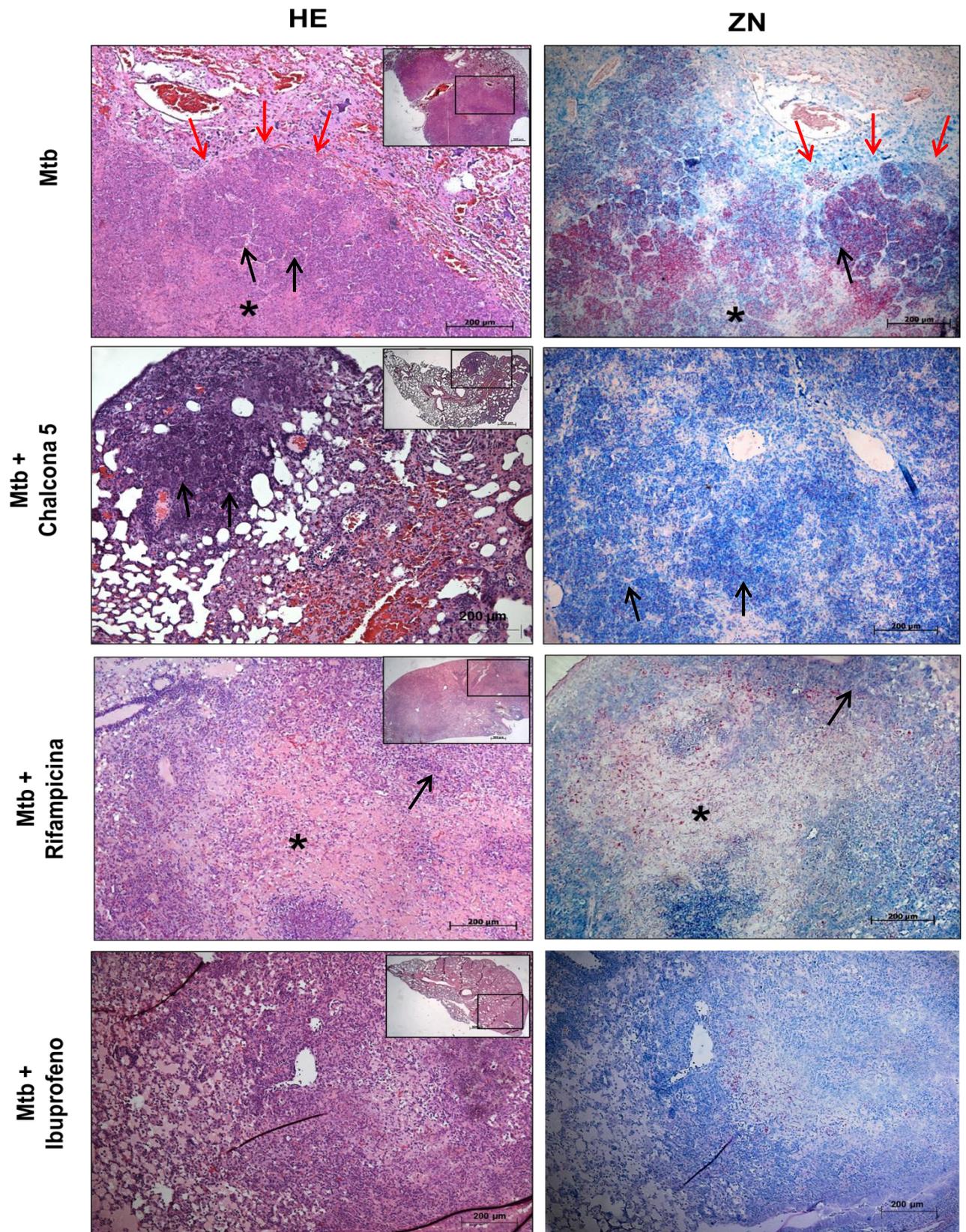


Figura 42. Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados (30 dias de infecção) sem tratamento ou sob tratamento por 15 dias com a chalcona **5**, ibuprofeno ou rifampicina. Os lóbulos inferior esquerdo, superior e médio direito do pulmão foram fixados em formol e processados 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. Setas vermelhas indicam elementos de borda delimitando a área de pneumonia tuberculosa, enquanto a estrela indica área necrótica. Os BAAR estão coradas em vermelho (ZN).

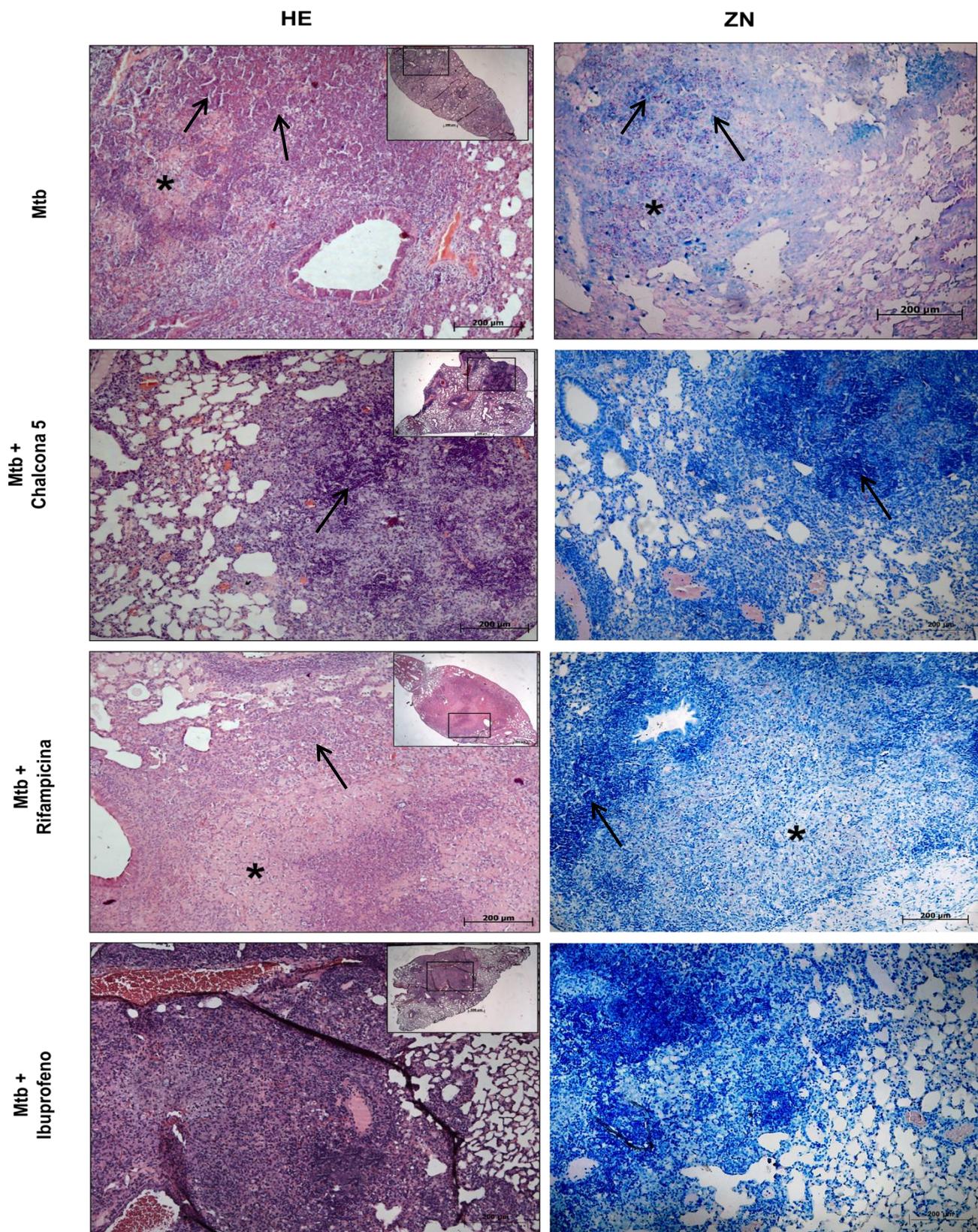


Figura 43. Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados (45 dias de infecção) sem tratamento ou sob tratamento por 30 dias com a chalcona 5, ibuprofeno ou rifampicina. Os lóbulos inferior esquerdo, superior e médio direito do pulmão foram fixados em formol e processados para 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 enquanto a estrela indica área necrótica. Os BAAR estão coradas em vermelho (ZN).

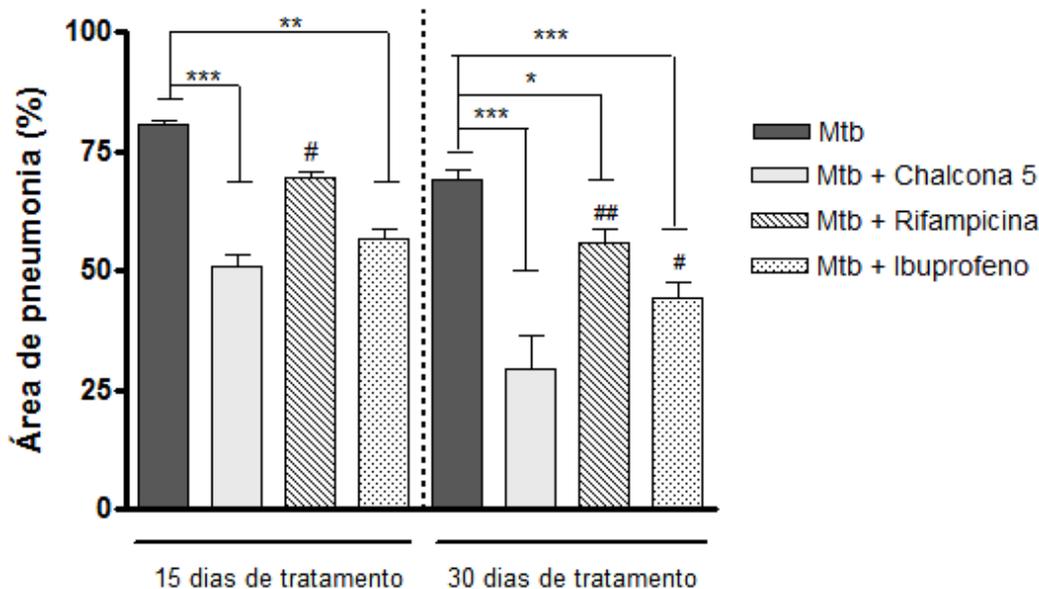


Figura 44. Análise morfométrica da área de pneumonia nos pulmões dos animais infectados sobre efeito do tratamento com a chalcona 5, rifampicina e ibuprofeno. Imagens de dez seções dos pulmões de cada grupo de animais foram capturadas pela câmera Axiocam MCR-5 Zeiss, no aumento de 10X, e analisadas com o uso do programa Image J para a determinação morfométrica da área de inflamação no pulmão (área de pneumonia). Para quantificar área de pneumonia, foi calculada a porcentagem da área pulmonar não aerada em relação da área pulmonar total (100%) de cada grupo infectado, subtraindo da média percentual da área não aerada nos pulmões de controle (tecido pulmonar). Os resultados apresentados são média \pm desvio padrão após dois experimentos independentes. $p < 0,001$ (***) e $p < 0,01$ (**), comparando cada grupo tratado com o grupo apenas infectado com a cepa de Mtb M299. $p < 0,01$ (##) e $p < 0,05$ (#), comparando os grupos de animais submetidos aos tratamentos com a rifampicina e ibuprofeno com o grupo tratado com chalcona 5.

Além da análise histopatológico do pulmão, foram analisados os aspectos patológicos do baço e fígado de cada animal para avaliação do efeito do tratamento na contenção da disseminação do bacilo. O baço e fígado dos animais infectados exibiram maior número de granulomas, compostos por macrófagos, linfócitos e elevado número de neutrófilos. Nos granulomas foram observados bacilos intracelulares (**Fig. 45**). Comparando os dias de infecção decorridos e os aspectos observados nestes órgãos, o número de granulomas relativamente aumentou em 45 dias em comparação com 30 dias de infecção (**Tab. 11**). Nos grupos de animais tratados durante 15 e 30 dias, a disseminação do bacilo para o baço e fígado foi reduzida, levando a redução do número dos granulomas e de BAAR intracelulares. Foi observado também menor número dos neutrófilos nestes granulomas.

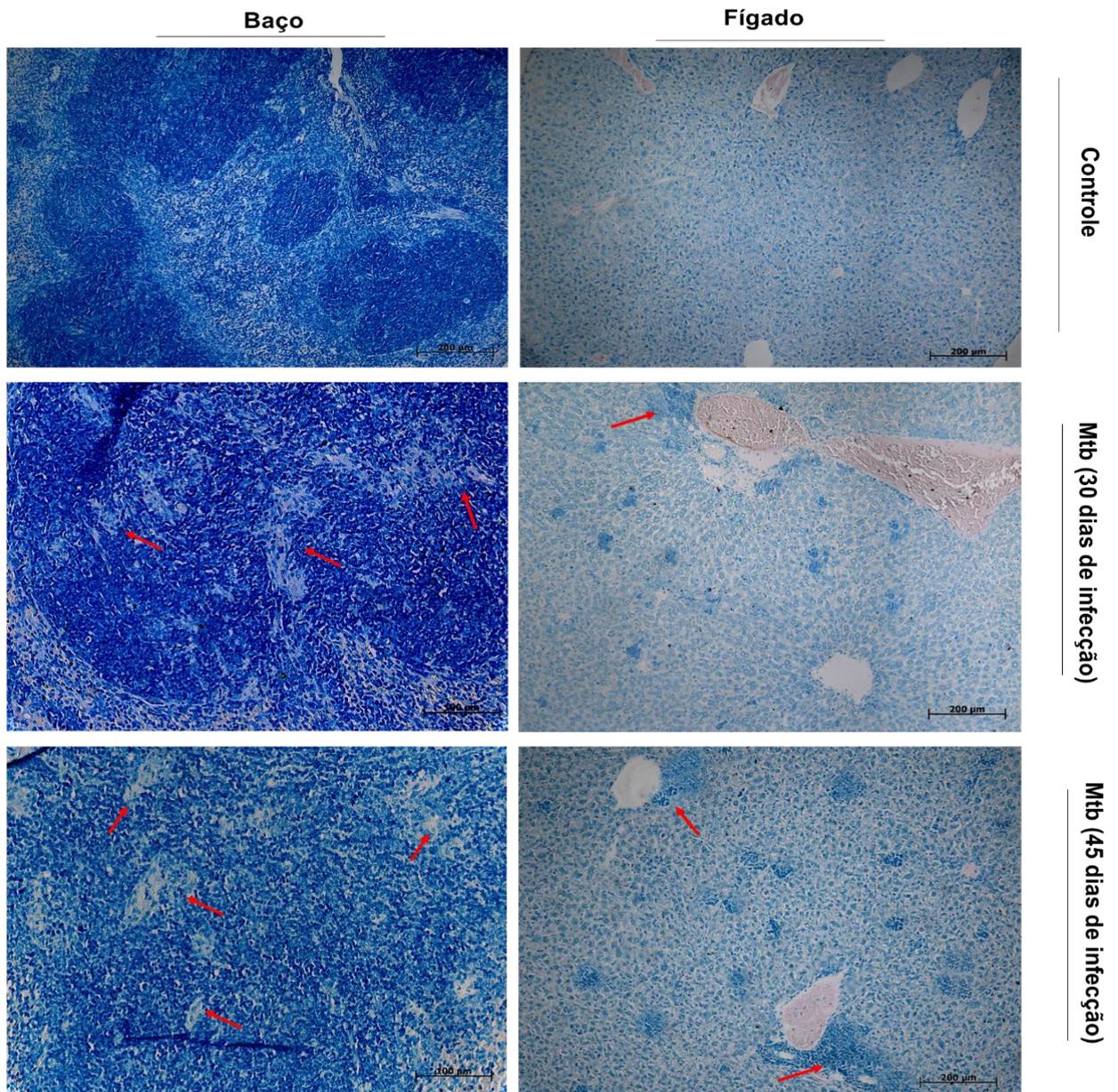


Figura 45. Análise histopatológica do fígado e baço dos camundongos C57BL/6 infectados pela cepa Mtb M299 (30 ou 45 dias de infecção) sem tratamento e sob tratamento por 15 e 30 dias com a chalcona **5**, ibuprofeno ou rifampicina. O fígado e o baço foram fixados em formol e processados para a obtenção das lâminas. As lâminas foram coradas pelo método de Ziehl Neelsen (ZN), e as microfotografias foram obtidas com o microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando o programa Axion Vision, no aumento de 100X. Imagens referentes aos animais controle e infectados, sem tratamento. As setas vermelhas destacam os granulomas com micobactérias intracelulares.

Tabela 11. Número de granulomas quantificados na secção do fígado dos animais C57Bl/6 infectados pela cepa M299 sem tratamento ou sob tratamento de 15 ou 30 dias com a chalcona 5, ibuprofeno ou rifampicina.

	15 dias de tratamento (30 dias de infecção)	30 dias de tratamento (45 dias de infecção)
Mtb	42 ± 3	61 ± 4
Mtb + Chalcona 5	13 ± 4	22 ± 5
Mtb + Rifampicina	28 ± 2	39 ± 3
Mtb + Ibuprofeno	12 ± 3	25 ± 4

Os granulomas observados no fígado foram quantificados e as médias ± desvio padrão do número de granulomas foram apresentados para cada grupo de animal (n=6).

5.12. Análise fenotípica das células inflamatórias nos pulmões dos camundongos infectados sob efeito do tratamento com a chalcona 5

Para entender o mecanismo do efeito terapêutico da chalcona **5** na redução da patologia estudamos o influxo de leucócitos inflamatórios para os pulmões dos animais infectados através da avaliação fenotípica das subpopulações celulares mieloides presentes no homogenato celular pulmonar de cada animal.

Inicialmente, considerou-se o gate de interesse contendo células positivas para expressão de CD11b, uma integrina expressa na superfície de células mieloides. A partir deste gate, a frequência de células positivas para expressão de Ly6G foi avaliada, uma proteína expressa majoritariamente por neutrófilos. As células CD11b+ Ly6G- foram avaliadas quanto a expressão de CD11c, uma integrina expressa predominantemente na superfície de células dendríticas e em macrófagos alveolares, quanto para a expressão de Ly6C, um marcador das populações de monócitos (Ly6C_{low}) e macrófagos ativados (Ly6C_{high}) (**Fig. 46A**).

Em acordância com as análises microscópicas dos pulmões dos animais infectados, que demonstraram grandes aglomerados dos leucócitos, principalmente macrófagos e neutrófilos, os dados de citometria apresentaram elevado percentual de células CD11b+ (cerca de 75% de toda população celular analisada) nos pulmões dos animais após 30 dias de infecção (**Fig. 46B**). O número destas células nos pulmões dos animais tratados com chalcona **5** ou ibuprofeno foi 3 vezes menor, e o tratamento com a rifampicina também ocasionou inibição significativa do influxo celular porém esta foi menor (cerca de 50%). Mais da metade das células CD11b+ (55-60%)

expressavam também o marcador Ly6G, sugerindo que a maioria dessas células foi representada pelos neutrófilos (**Fig. 46C**).

A população das células Ly6G⁻ incluiu duas principais sub-populações: células Ly6C⁺ CD11c⁻ (incluindo monócitos e macrófagos inflamatórios) e células Ly6C⁺ CD11c⁺ (incluindo células dendríticas e macrófagos alveolares ativados). Todas as populações celulares foram reduzidas nos pulmões dos animais tratados pelos fármacos. A maior taxa de redução foi observada na população das células Ly6G⁺, o número dessas células foi 5 vezes menor após 15 dias de tratamento e cerca de 10 vezes menor após 30 dias do tratamento nos animais tratados pela chalcona **5** ou ibuprofeno. A redução das células Ly6G⁺ pela rifampicina foi significativamente menor, cerca de 30% após 15 dias de tratamento e de 50% após 30 dias de tratamento. O efeito dos tratamentos com chalcona **5** e ibuprofeno foi menor em relação a população das células Ly6G⁻ Ly6C⁺ CD11c⁻ (monócitos e macrófagos inflamatórios), que foi reduzida 2,5 vezes após o tratamento durante 15 dias. Após 30 dias, os números dessas células foram reduzidas 4,5-5,0 vezes em comparação com animais não-tratados (**Fig. 46D e E**).

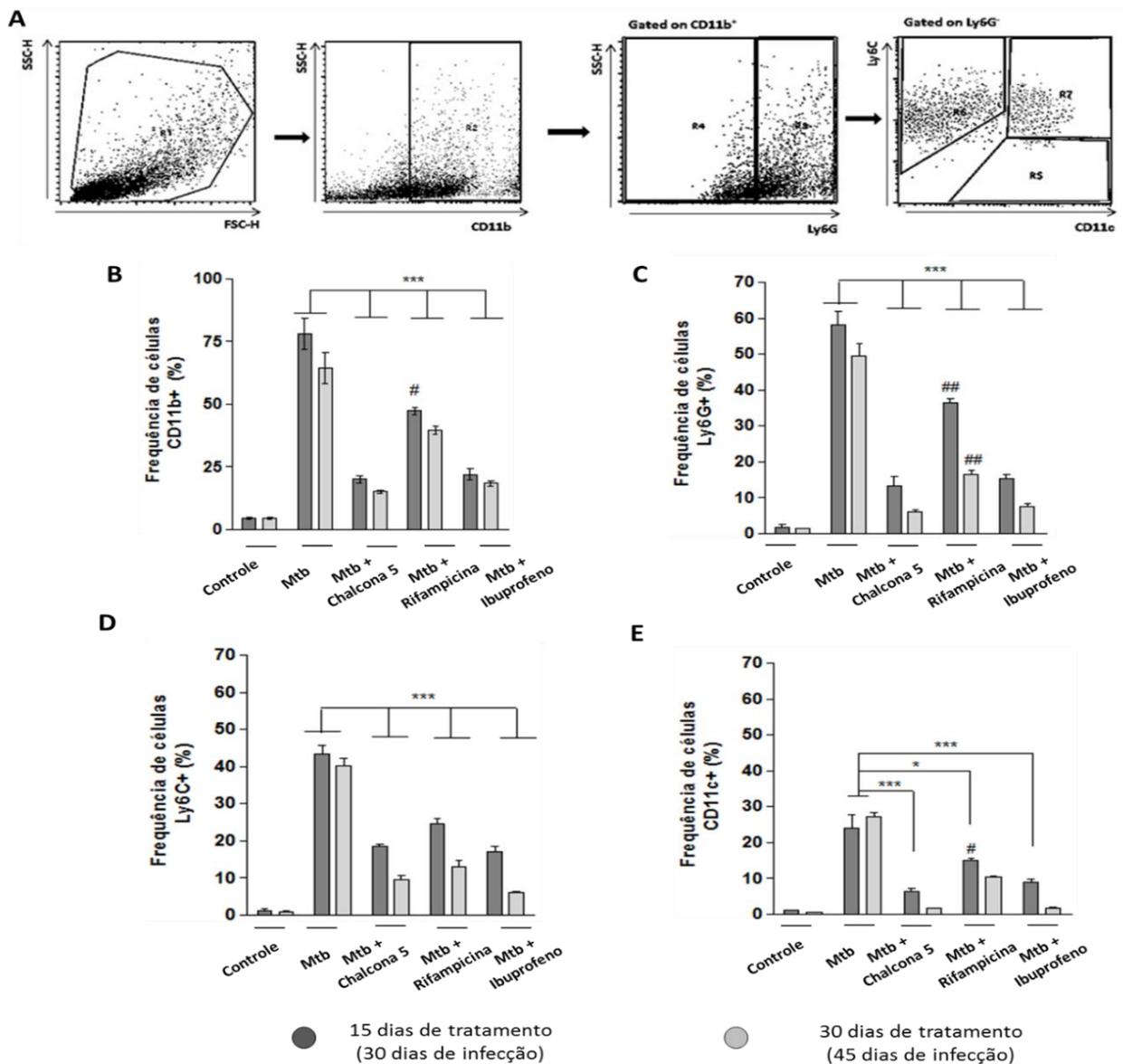


Figura 46. Análise fenotípica do infiltrado celular pulmonar dos animais infectados pela cepa Mtb hipervirulenta sobre efeito do tratamento com fármacos. O lóbulo esquerdo dos pulmões dos animais de cada grupo foi utilizado para obtenção das células. As células foram tratadas com uma combinação de anticorpos (anti-CD11b-PE, Ly6G-PerCP, CD11c-APC, Ly6C-FITC). Posteriormente ao tratamento, as células foram fixadas e analisadas em citômetro de fluxo para identificar subpopulações das células mieloides (**A**). A frequência celular foi calculada em percentual (**B-E**). Os resultados apresentados são média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes. $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*), comparando cada grupo tratado com o grupo apenas infectado com a cepa Mtb. A simbologia $p < 0,01$ (##) e $p < 0,05$ (#) se refere a comparação entre os grupos de animais submetidos aos tratamento com rifampicina e ibuprofeno em relação aos tratados com a chalcona 5.

5.13. Análise do perfil de citocinas produzidas *ex vivo* pelas células dos pulmões dos camundongos infectados sob efeito do tratamento com a chalcona 5

Os perfis de citocinas/ quimiocinas produzidas pelas células pulmonares dos animais infectados são decorrentes dos diferentes níveis de ativação celular para cada sub-população no foco inflamatório granulomatoso. Para avaliar o perfil de citocinas produzido pelas células pulmonares, a produção dos mediadores químicos foi quantificada no sobrenadante da cultura das células do pulmão cultivadas *ex vivo* por 48 h. Os sobrenadantes da cultura foram coletados, filtrados para eliminar eventuais micobactérias, e submetidos à quantificação dos mediadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β e IL-10 por ELISA tipo sanduíche e de óxido nítrico (NO) através do método de Griess.

As células pulmonares obtidas dos animais infectados e não tratados apresentaram elevada produção de mediadores inflamatórios presentes no sobrenadante da cultura (NO, TNF- α e IL-1 β , **Fig. 47A-C**) e baixos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (**Fig. 47D**), o que suporta a observação da extensa área de pneumonia com presença do elevado número de células inflamatórias no pulmão. Os dados obtidos para este grupo não exibiram diferença significativa entre 30 dias de infecção (final da fase aguda) e 45 dias (início da fase crônica), embora ocorra uma tendência a regulação negativa da produção de citocinas pró-inflamatórias após o controle do crescimento bacteriano pela resposta imune.

O tratamento com a chalcona 5 apresentou redução de 2 a 3 vezes na produção dos mediadores pró-inflamatórios (**Fig. 47A-C**) pelas células pulmonares quando comparado a produção dos mesmos pelas células pulmonares dos animais sem tratamento, o que se relaciona ao menor número de infiltrado celular e consequente diminuição do dano tecidual. Além disso, os níveis de produção da citocina IL-10 (**Fig. 47D**) foram significativamente aumentados em relação aos animais não tratados demonstrando a capacidade de modulação da resposta imune contrabalaneando elementos pró- e anti-inflamatórios a fim de conter a resposta inflamatória exarcebada.

Os resultados obtidos no tratamento com a chalcona 5 foram similares aos exibidos no tratamento com o fármaco anti-inflamatório ibuprofeno para os mediadores químicos estudados nos dois períodos de tratamento investigados.

Em contraste, uma menor redução na produção de mediadores pró-inflamatórios (**Fig. 47A-C**) foi exibida pelas células pulmonares provenientes dos animais tratados

com a rifampicina do que o observado para o tratamento com a chalcona **5** ($p < 0,001$) ou ibuprofeno, e os níveis de indução da IL-10 (**Fig. 47D**) foram significativamente mais baixos, demonstrando a menor capacidade da rifampicina na supressão de inflamação.

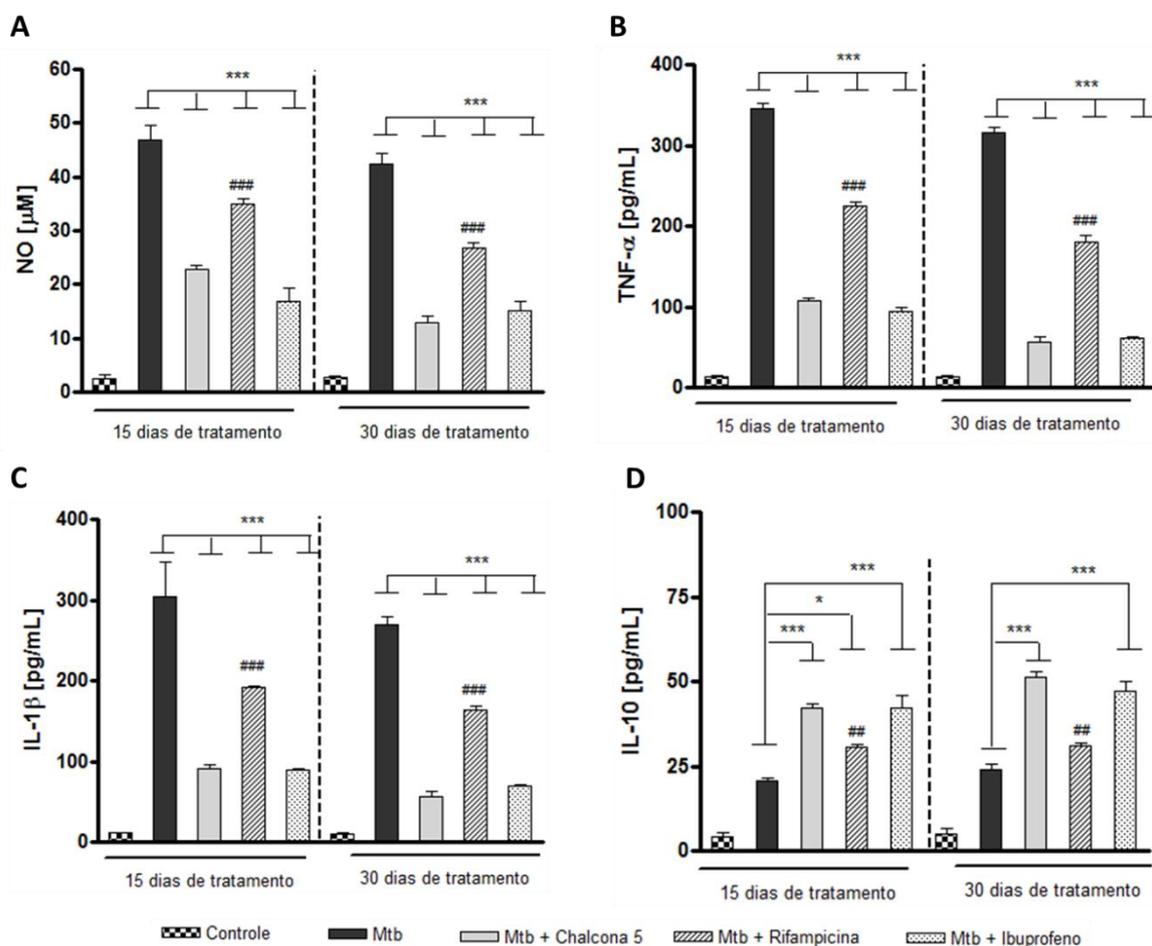


Figura 47. Análise da produção de citocinas e óxido nítrico pelas células dos pulmões dos animais infectados com cepa Mtb hipervirulenta sobre efeito do tratamento com fármacos. As células foram extraídas do pulmão e a concentração celular foi ajustada em 2×10^5 células/mL para cada amostra. As células foram plaquedadas e mantidas sob cultivo por 48 h. Os sobrenadantes da cultura foram quantificados para produção de NO (**A**), TNF- α (**B**), IL-1 β (**C**) e IL-10 (**D**). Os resultados apresentados são média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes. $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*), comparando cada grupo tratado com o grupo apenas infectado com a cepa de Mtb. $p < 0,001$ (###) e $p < 0,01$ (##) se refere a comparação entre os grupos de animais submetidos aos tratamentos com rifampicina e ibuprofeno em relação aos tratados com chalcona **5**.

6. DISCUSSÃO

As chalconas e seus derivados têm atraído cada vez mais atenção devido a exibição de inúmeras atividades farmacológicas, tais como anti-inflamatória e antimicrobiana, incluindo efeitos antimicobacterianos. Assim, a classe das chalconas possui grande interesse químico e farmacológico, encorajando a síntese e avaliação biológica voltada para a diversificação da estrutura básica das chalconas (não substituída) a fim de gerar substâncias apresentando maior potencial e reduzido efeito adverso (RAHMAN *et al.*, 2011).

O processo inflamatório está fortemente envolvido na patogênese da maioria das doenças infecciosas, incluindo a tuberculose. Atualmente, o tratamento da TB baseia-se no uso de fármacos antimicobacterianos, no entanto, muitas formas graves da doença, como por exemplo, a TB miliar ou meningite tuberculosa, exigem adicional terapia anti-inflamatória para suprimir a resposta inflamatória excessiva (GARLANDA *et al.*, 2007).

Existe uma necessidade urgente de tratamento para as formas de TB associadas com a inflamação exacerbada, incentivando a síntese e desenvolvimento de novas substâncias com atividade *dual*, ou seja, antimicobacteriana e anti-inflamatória.

Neste estudo investigamos os efeitos anti-inflamatórios e antimicobacterianos de uma série de quarenta chalconas, sintetizadas com diferentes substituintes nos anéis A e B e também da chalcona não substituída disponível comercialmente. O *screening* inicial das chalconas foi realizado através da avaliação dos efeitos inibidores destas substâncias na produção de NO e TNF- α por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e posteriormente no modelo celular de macrófagos alveolares MH-S estimulados por lisado de *M. bovis* BCG, exibindo similar desempenho.

Os níveis mais pronunciados de atividade inibitória sobre a produção de NO foram apresentados por dez chalconas (**4**, **5**, **12**, **24**, **28**, **29**, **31**, **33**, **40** e **41**), exibindo IC₅₀ inferior a 21 μ M. A amostra mais ativa foi a chalcona **5** contendo um grupo metilenodioxi entre os carbonos **3** e **4** do anel A (IC₅₀ 2,1 \pm 2,7 μ M). O grupo substituinte metilenodioxi é geralmente encontrado ligado a uma estrutura aromática, onde o metilenodioxibenzeno ou o grupo funcional benzodioxolo é formado, e é amplamente encontrado nos produtos naturais. A presença deste grupo em lignanas de *Saururus chinensis* (GAO *et al.*, 2014) e na miristicina, encontrada na *Myristica fragrans* (LEE *et al.*, 2011) contribui para a capacidade destas substâncias inibirem a produção

de NO por macrófagos RAW 264.7. Este é o primeira descrição demonstrando atividade anti-inflamatória para a chalcona **5** contendo o substituinte metilenodioxi entre a posição 3 e 4.

Entretanto, deve-se notar que quatro outras substâncias (**12**, **20**, **28** e **35**) avaliadas neste estudo, que compartilham o grupo substituinte metilenodioxi no anel A, tal como a chalcona **5**, e, adicionalmente, possuindo substituintes no anel B, apresentaram níveis mais baixos de atividade do que o observado para a chalcona **5**. Dentre estas, a substituição na posição 4' do anel B pelo radical bromo (**12**), metil (**20**) ou metoxila (**28**) não diferiu em termos de potencial inibitório enquanto a presença do radical cloro (**35**) na posição 2' do mesmo anel, conduziu a drástica redução da atividade.

As chalconas que inibiram eficazmente a produção de NO foram em sua maioria, igualmente ativas na supressão de PGE₂, e estas atividades foram mediadas pela inibição específica da expressão enzimática da iNOS e COX-2, respectivamente. As amostras **3**, **5** e **31** foram as mais ativas. Estes resultados foram corroborados também através dos ensaios antioxidantes, onde o mecanismo de ação baseado no sequestro dos radicais livres não justificou substancialmente o potencial inibitório das chalconas mais ativas na produção de NO, com exceção de algumas amostras (**8**, **19**, **25**, **26** e **37**) para as quais a atividade antioxidante foi expressiva.

Em contraste com a produção de NO e PGE₂, que foi suprimido facilmente pela maioria das chalconas, a produção das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β foi inibida apenas por algumas amostras, como a chalcona **3**, **4**, **5**, **24** e **41**, existindo correlações quanto à capacidade de inibição para ambos os mediadores inflamatórios. Destaca-se o fato das vias de transdução de sinais e seus componentes serem compartilhados entre TNF- α e IL-1 β , além destas citocinas atuarem no mesmo portfólio genético (BALKWILL *et al.*, 2001).

Considerando a presença de elevada toxicidez para a cultura de macrófagos por algumas chalconas e sua exclusão nas análises posteriores, somente três chalconas foram identificadas como potentes agentes anti-inflamatórios, as chalconas **3**, **4** e **5**, sendo capazes de suprimir a produção dos principais mediadores inflamatórios (NO, PGE₂, TNF- α e IL-1 β) em macrófagos estimulados por LPS. A chalcona **3** foi caracterizada pela presença do radical cloro na posição 4 do anel A enquanto a chalcona **4** possui o substituinte 4-dimetilamino no mesmo anel. Ressalta-se que, estes substituintes foram relatados em estudos anteriores como importantes características estruturais para a presença de atividade anti-inflamatória (KONTOGIORGIS *et al.*,

2008). A chalcona **3** foi também descrita pela capacidade de inibição do edema de pata (cerca de 60%) induzido pela carragenina em modelo murino contudo o mecanismo de ação não foi elucidado (YADAV *et al.*, 2011), e de acordo com nossos resultados, a atividade anti-inflamatória possivelmente decorre da supressão da expressão da enzima COX-2 e conseqüente redução da produção de PGE₂.

Para identificar chalconas com propriedades antimicobacterianas, as amostras foram avaliadas quanto sua capacidade de inibir o crescimento de *M. bovis* BCG em cultura, e as chalconas mais ativas foram posteriormente testadas contra o crescimento de cepas *M. tuberculosis*, tais como a cepa laboratorial padrão H37Rv e o isolado clínico M299. Algumas das chalconas inclusas no estudo, amostras **24**, **25** e **30**, foram descritas previamente por exibir atividade antimicobacteriana contra *M. tuberculosis* H37Rv (MOODLEY *et al.*, 2014; SIVAKUMAR *et al.*, 2010 e ÁVILA *et al.*, 2008).

De acordo com estes dados, as chalconas **24**, **25** e **30** apresentaram satisfatória atividade anti-*M. bovis* BCG em nossos experimentos. Entretanto, somente a chalcona **25** foi ativa contra a cepa Mtb M299, as demais foram excluídas desta avaliação devido a elevada citotoxicidade ou baixa atividade contra Mtb. Deve ser notado que a maioria das chalconas que exibiram atividade inibitória contra *M. bovis* BCG e a cepa Mtb laboratorial não mantiveram sua efetividade na inibição do crescimento da cepa Mtb M299.

A cepa Mtb M299, pertencente ao genótipo Beijing sublinhagem moderna, foi caracterizada em estudos prévios do nosso grupo como uma cepa hipervirulenta, responsável por induzir severa imunopatologia pulmonar em camundongos C57Bl6, podendo conduzir os animais a morte precoce (RIBEIRO *et al.*, 2014). Somente cinco chalconas (**3**, **4**, **5**, **8** e **25**) mostraram similar perfil de atividade contra as cepas M299 e H37Rv. Duas chalconas (**15** e **24**) e o fármaco padrão anti-TB rifampicina foram significativamente menos potente contra a cepa hipervirulenta M299 demonstrando o alto nível de resistência desta cepa para o tratamento quando comparado com a cepa H37Rv. Com atenção exclusiva ao tratamento com o fármaco rifampicina foi necessário um aumento de 10 vezes na concentração utilizada contra Mtb H37Rv para inibir o crescimento da cepa M299.

Em relação à capacidade das chalconas para suprimir o crescimento intracelular de Mtb em macrófagos, três amostras (**4**, **5** e **8**) foram potentes, destacando a chalcona **5** como a mais ativa. Ressalta-se a importância de avaliar a atuação de substâncias com ação em cultura bacteriana, também em cultura de macrófagos infectados. Isto possibilita a averiguação da seletividade da substância testada para com a célula

hospedeira infectada pela micobactéria e a capacidade da substância em adentrar o ambiente intracelular a fim de exercer o efeito desejado, além de ampliar a compreensão de possíveis atividades imunomodulatórias e serem bons candidatos para estudos farmacológicos *in vivo* (MARRAPU *et al.*, 2011). Para a classe das chalconas somente três trabalhos foram realizados sobre este prisma, e as chalconas **4**, **5** e **8** avaliadas em nosso estudo, reduziram o crescimento intracelular micobacteriano em 10 a 100 vezes mais quando comparado às chalconas descritas nos dois trabalhos anteriores (MASCARELLO *et al.*, 2010; MATIVANDELA *et al.*, 2009), sendo que no terceiro trabalho (MARRAPU *et al.*, 2011), os valores de MIC não foram calculados, sendo expressos em percentual, e por essa razão não puderam ser comparadas em termos de potencial com nossos dados.

Para nosso conhecimento, a chalcona **5** não foi testada anteriormente contra *Mycobacterium*, no entanto, a atividade antibacteriana desta contra *Staphylococcus aureus* e anti-fúngica contra *Cladosporium cladosporioides* foi demonstrada em um trabalho anterior (SILVA *et al.*, 2013). A atividade antimicobacteriana da chalcona **4** contra Mtb H37Rv já foi descrita na literatura, embora os dados obtidos nesse estudo não forneçam informações suficientes sobre o valor de MIC e índice de seletividade (SIVAKUMAR *et al.*, 2007), o que dificulta a comparação destes resultados com os dados obtidos em nosso trabalho.

Como parte de uma avaliação inicial sobre os efeitos da associação entre as chalconas mais ativas e o fármaco padrão rifampicina no crescimento da cepa M299, as amostras **3**, **5** e **25** apresentaram efeito positivo à inibição do crescimento desta cepa quando associadas ao fármaco rifampicina. Nestes casos onde o efeito foi positivo para a atividade da chalcona em estudo, os resultados mostram uma tendência a existência de efeito sinérgico, tendo em vista que o efeito observado com a associação das substâncias é maior do que simplesmente o somatório da atividade das mesmas individualmente, sendo observado uma redução de 10 vezes no valor de MIC original. Para a confirmação do efeito sinérgico, serão necessários experimentos futuros para se determinar o índice da concentração inibitória fracionária (FICI) que representa a soma do FIC de cada substância testada, em que o FIC é a razão do MIC de cada substância quando utilizado em combinação, pelo MIC de cada substância quando utilizado sozinho, sendo considerado um efeito sinérgico $FIC \leq 0,5$ (JOHNSON *et al.*, 2004). Neste âmbito, somente o estudo do grupo de Mativandela (MATIVANDELA *et al.*, 2009) descreveu o efeito sinérgico entre a chalcona 3,2',4'-

trihidroxi-3'-metoxichalcona e a isoniazida, reduzindo em 4 vezes o MIC original da isoniazida.

Um estudo adicional das chalconas mais ativas quanto a inibição do crescimento das bactérias extracelulares agregadas em *clumps* (para as cepas Mtb H37Rv e M299) mostrou que as amostras **3** e **5** foram as mais potentes contra o crescimento de agregados de ambas as micobactérias. A busca por substâncias com este potencial têm sido almejada para diversas infecções, devido à substancial resistência dos bacilos agregados em *clumps* e biofilmes aos fármacos utilizados (OJHA *et al.*, 2008, ORME, 2011). Deve-se notar que cepas Mtb altamente virulentas, como a cepa M299, induzem *in vivo* o desenvolvimento de áreas de necrose celular favorecendo o crescimento extracelular do bacilo e sua disseminação, o que destaca a importância da capacidade inibitória destas chalconas sob esta abordagem. Em adição, para a classe das chalconas, a avaliação neste modelo não foi descrita anteriormente.

A identificação da maioria das chalconas ativas descritas neste estudo foi acompanhada por análise da relação estrutura-atividade (SAR) (VENTURA *et al.*, 2015). Tendo em vista que a atividade de qualquer substância promissora a ser utilizada para fins terapêuticos é dependente de a mesma possuir características físico-químicas compatíveis com parâmetros de biodisponibilidade no organismo a fim de interagir com o alvo proposto (DASHTI *et al.*, 2014), estudos de ADME e toxicidade foram realizados para as chalconas estudadas. Os resultados obtidos *in silico* mostraram que todos os parâmetros farmacocinéticos das chalconas substituídas avaliadas neste trabalho estavam dentro dos valores recomendados, e a chalcona **5**, mais promissora, apresentou níveis inferiores de hepatotoxicidade do que os fármacos anti-TB isoniazida e pirazinamida (VENTURA *et al.*, 2015).

Para a continuação do estudo da chalconas como fármacos anti-TB, os resultados obtidos *in vitro* e paralelamente *in silico* foram conjuntamente avaliados e a chalcona **5** foi selecionada para investigação dos efeitos terapêuticos em modelo murino de tuberculose severa (AMARAL, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012). A combinação das atividades anti-inflamatórias e antimicobacterianas para uma mesma chalcona pode proporcionar uma vantagem importante no seu uso contra a TB, tendo em vista a possibilidade de redução do período de tratamento, do número de fármacos anti-TB a serem utilizados e simplificação do tratamento e a preservação da função pulmonar (HAWN *et al.*, 2013), entretanto, chalconas com atividade dual ainda não foram identificadas.

Trabalhos anteriores têm enfatizado a importância da avaliação *in vivo* de substâncias potencialmente ativas contra *Mycobacterium*, em modelos animais adequados, utilizando para infecção cepas Mtb emergentes e resistentes ao tratamento, e não somente cepas laboratoriais, para de fato se obter substâncias de eficácia relevante (ORME, 2011). Além disso, a busca por novos fármacos anti-TB para o tratamento adjuvante da TB grave associada com a inflamação excessiva têm sido especialmente incentivada (LECHARTIER *et al.*, 2014, ZUMLA *et al.*, 2014a). Isto ressalta a importância da utilização do modelo murino de tuberculose severa aplicado em nossos estudos por possibilitar a avaliação do efeito terapêutico da chalcona **5** não somente sobre o controle da carga bacilar da cepa hipervirulenta, mas também na imunopatologia da doença induzida pela mesma.

Os efeitos do tratamento com a chalcona **5** foram comparados aos tratamentos com o fármaco padrão anti-TB, rifampicina, e com o fármaco anti-inflamatório, ibuprofeno, visando a confiabilidade da eficácia avaliada (DASHITI *et al.*, 2014).

Primeiramente, foi avaliado o efeito da chalcona **5** sobre o crescimento bacteriano nos pulmões, onde o tratamento com a mesma durante 15 dias reduziu cerca de 2 Log₁₀ CFU, alcançando até 3 Log₁₀ CFU ao final de 30 dias de tratamento em comparação aos animais não tratados, o que foi confirmado através da quantificação de CFU/g de pulmão e nas secções pulmonares coradas por ZN dos animais tratados. Os resultados obtidos no modelo murino C57Bl/6 também foram verificados no tratamento dos animais BALB/c. A dificuldade de drástica redução na carga bacilar foi observada para todos os tratamentos efetuados e reflete a característica de cepas hipervirulentas apresentarem maior taxa de crescimento entre os primeiros 28 dias de infecção *in vivo* em comparação com cepas menos virulentas (AMARAL *et al.*, 2014, ANDRADE *et al.*, 2012).

Além de atuar no controle da proliferação bacilar, o tratamento com a chalcona **5** foi capaz de diminuir o número e tamanho das lesões inflamatórias, o que foi compatível com a diminuição do peso e massa relativa pulmonar comparado aos animais não tratados. Em adição, as análises histopatológicas dos pulmões dos animais tratados com a chalcona **5** exibiram redução da área de pneumonia tuberculosa, envolvendo a diminuição de áreas de alveolite e necrose nas áreas granulomatosas e do exsudato seroso alveolar nas regiões adjacentes, além da diminuição da disseminação do bacilo para o baço e fígado. A diminuição da área de patologia está diretamente relacionada a capacidade da chalcona **5** diminuir o influxo de células inflamatórias no pulmão, baço e fígado, especialmente de neutrófilos,

propiciando a redução do número de granulomas e necrose nestas áreas, reduzindo o número de BAAR extracelulares.

O acúmulo excessivo de infiltrado celular inflamatório no pulmão e sua relação com a imunopatologia da TB severa têm sido abordada por diversos autores e fundamentada no fato que o acúmulo excessivo destas células no pulmão conduzem a compressão e colapso da estrutura endotelial, o que em combinação com altas concentrações dos mediadores inflamatórios produzidos por estas células, leva a necrose tecidual (ORME, 2013; TORRADO *et al.*, 2010; MARZO *et al.*, 2014). Além disso, o recrutamento de células fagocitárias permissíveis induz novos ciclos de replicação bacteriana e favorece a disseminação do bacilo (AMARAL *et al.*, 2014). O acúmulo de neutrófilos têm sido destacado na patologia da TB, uma vez que são células de vida curta e secretam ou liberam uma ampla variedade de produtos microbicidas e citotóxicos durante sua morte celular, contribuindo para o dano tecidual, formação da necrose intragranulomatosa, e além disso, os debris celulares são fonte de carbono para o bacilo e suporte para formação de biofilmes (HUNTER *et al.*, 2011; PEYRON *et al.*, 2008). Um dos fatores que afetam a função da resposta imune adquirida a TB é o acúmulo de neutrófilos que conduzem a perda da contenção da doença (ORME *et al.*, 2015).

Como parte final, o perfil de citocinas produzidas *ex vivo* pelas células pulmonares dos animais tratados com a chalcona **5** foi avaliado, demonstrando uma redução de 2 a 3 vezes na produção dos mediadores pró-inflamatórios, enquanto os níveis de IL-10 foram significativamente aumentados. A diminuição do influxo celular nos pulmões e redução da patologia estão associados com a menor produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, observou-se o aumento na produção da citocina anti-inflamatória IL-10 o que pode sugerir uma modulação da produção local de citocinas pelas células do pulmão.

A resposta protetora contra *Mtb* exige um equilíbrio entre citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, e seus efeitos são contrabalanceados durante o processo inflamatório. A elevada infiltração celular culmina no aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios tendo como consequência, dano tecidual, pneumonia e mortalidade, enquanto a grande predominância de citocinas anti-inflamatórias pode favorecer a proliferação e disseminação do bacilo, em virtude da inadequação da resposta imune, que também conduz a severidade da doença (GARLANDA *et al.*, 2007, TOBIN *et al.*, 2012).

Comparado ao tratamento com a rifampicina, a chalcona **5** exibiu menor potencial de redução da carga bacilar, contudo os animais tratados com a mesma apresentaram boa tolerabilidade, sem a presença de efeitos colaterais, diferentemente do observado para o tratamento com a rifampicina que induziu diarreia nos animais tratados. Deste modo, uma dose maior da chalcona **5** poderia ser testada para aumentar o potencial de redução do crescimento bacteriano nos pulmões. Em contrapartida, embora o tratamento com a rifampicina reduza a carga bacilar de forma mais efetiva do que a chalcona **5**, em termos de patologia pulmonar, o tratamento com a rifampicina não propiciou redução significativa da área de pneumonia ou de áreas necróticas, onde observou-se a presença de bacilos extracelulares, o que está correlacionado com a menor capacidade da rifampicina em diminuir o influxo de células inflamatórias e inflamação no pulmão (TORRADO *et al.*, 2010; COOPER, 2009; EHLERS e SCHAIBLE, 2013). Os resultados do tratamento com a rifampicina e a chalcona **5** sustentam a abordagem do tratamento adjuvante, anti-inflamatório e antimicobacteriano, nos casos de TB grave associada com a inflamação excessiva, de forma que a intervenção possa ser focada na tendência inflamatória do indivíduo a ser tratado (ORME *et al.*, 2015).

Em relação ao tratamento com o ibuprofeno, a chalcona **5** exibiu melhor efeito terapêutico, tanto no potencial de redução da carga bacilar quanto na redução da área de patologia (pneumonia) ao final de 30 dias de tratamento. Embora o ibuprofeno seja um fármaco de abordagem anti-inflamatória, o efeito inibitório diretamente no crescimento da cepa Mtb H37Rv e de um isolado clínico de Mtb-MDR já foi descrito previamente (GUZMAN *et al.*, 2013). Esta observação foi substanciada em modelo murino C3HeB/FeJ infectado por via intravenosa com alta dose de infecção (2×10^4 CFU) de Mtb H37Rv, onde foi realizado o tratamento oral diário com ibuprofeno (80 mg/kg) por 1 semana. Sob estas condições, os animais tratados mostraram redução no número e tamanho das lesões no pulmão, redução da área afetada pela infecção em torno de 50%, diminuição da carga bacilar em 1,5-2 Log₁₀ e aumento da sobrevivência em 40% (VILAPLANA *et al.*, 2013). Os resultados obtidos no modelo de camundongos C3HeB/FeJ (sensíveis para TB) não podem ser comparados diretamente com os nossos resultados obtidos em modelo de camundongos C57Bl/6 (resistentes para TB). Entretanto, os dois trabalhos demonstram que a utilização do ibuprofeno para tratamento da TB severa apresenta bons efeitos terapêuticos, inibindo a inflamação exacerbada, causada tanto pela cepa laboratorial H37Rv (em alta dose de infecção),

quanto pelo isolado clínico hipervirulento (cepa Mtb Beijing M299), utilizado em baixa dose de infecção.

Em comparação com o trabalho de Vilapana *et al.*, nosso estudo apresenta um certo avanço no entendimento dos mecanismos do efeito terapêutico dos fármacos anti-inflamatórios (ibuprofeno ou chalcona **5**) utilizados para tratamento da TB severa. Pelo menos dois fatores são importantes: 1) uma forte redução no recrutamento das células inflamatórias, principalmente de neutrófilos, no pulmão; e 2) inibição da produção dos mediadores pró-inflamatórios e aumento da produção de IL-10 pelas células presentes no pulmão. A capacidade de reduzir o influxo de neutrófilos e a minimização dos danos teciduais pulmonares já foi descrito para o tratamento oral com o ibuprofeno em pacientes com fibrose cística (KONSTAN *et al.*, 2003), o que corrobora os resultados obtidos no nosso modelo murino de TB acerca da diminuição do influxo celular.

Os resultados promissores obtidos pelo grupo de Vilaplana com o modelo murino da TB, incentivaram os autores sugerir uma ampla utilização deste fármaco anti-inflamatório para tratamento dos pacientes com TB (VILAPLANA *et al.*, 2013). Entretanto, as indicações para uso dos anti-inflamatórios nos casos TB devem ser melhor estudados. A TB é uma doença crônica que em alguns pacientes, ou em fases determinadas, pode ser controlada pelo sistema imune, atingindo um equilíbrio entre resposta imune e persistência de bactéria no organismo. No nosso modelo da TB experimental, baseado nos camundongos C57Bl/6 relativamente resistentes a Mtb, o sistema imune é capaz de controlar a doença na maioria dos animais após 3 a 4 semanas de infecção, o que está associado com a regulação negativa da inflamação pulmonar na fase crônica (ANDRADE, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2014). Efeito dos fármacos, anti-inflamatórios, incluindo ibuprofeno e chalconas, na fase crônica da doença com baixo nível de inflamação deve ser melhor estudado, e os biomarcadores da inflamação exacerbada nos pacientes hiper-reativos, que podem ser beneficiados pela terapia anti-inflamatória, ainda devem ser identificados. A análise cuidadosa da utilização do tratamento adjuvante deve considerar o grau de severidade da doença e principalmente o período de intervenção de modo que a mesma não afete as respostas anti-TB destinadas à eliminação do agente patogênico (ZUMLA *et al.*, 2014b; LECHARTIER *et al.*, 2014).

No âmbito da classe das chalconas, esta é a primeira descrição de atividade *dual* em modelo murino de TB de hipervirulência, com identificação da chalcona **5** como a substância mais ativa. Somente um trabalho foi realizado *in vivo* envolvendo

chalconas no tratamento da tuberculose. Neste estudo, camundongos suíços foram infectados pela cepa Mtb laboratorial H37Rv por via intravenosa em alta dose, 10^7 CFU/animal, e o tratamento oral com a chalcona foi realizado por 28 dias (100 mg/kg). Apenas o efeito de redução na carga bacilar foi estudado, demonstrando uma redução de 40% da viabilidade bacilar, contudo esta redução foi mínima em termos de CFU em Log_{10} ($0,3 \text{ CFU } \text{Log}_{10}$) (MARRAPU *et al.*, 2011). Quando comparado ao potencial exibido pela chalcona **5** na redução da carga bacilar, a mesma mostrou um potencial de redução quase 10 vezes maior, visto a capacidade de diminuição do crescimento bacteriano pela chalcona **5** ter sido de $2,8 \text{ Log}_{10}$.

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que a chalcona **5** é uma substância promissora para estudos prospectivos que visam a geração de novos fármacos anti-TB para o tratamento adjuvante dos casos graves da TB grave associados com inflamação exacerbada. Este foi o primeiro estudo descrevendo uma nova abordagem para o *screening* de chalconas anti-TB focando a atividade biológica *dual*, anti-inflamatória e antimicobacteriana. Em adição, este foi o primeira descrição destas atividades para a chalcona **5**, assim como efetivo potencial no tratamento da tuberculose severa em modelo murino.

7. CONCLUSÕES

- De uma série de quarenta chalconas sintéticas, as amostras **3**, **4** e **5** foram identificadas como potentes agentes anti-inflamatórios sendo capazes de suprimir a produção dos mediadores inflamatórios (NO, PGE₂, TNF- α e IL-1 β), sendo a inibição da produção de NO e PGE₂ decorrente da inibição específica da iNOS e COX-2.
- As amostras selecionadas como mais ativas apresentaram sua capacidade imunomodulatória de forma seletiva, nas concentrações intermediárias utilizadas, com ausência ou baixa toxicidade para a cultura celular;
- Com relação à estrutura-atividade, a chalcona **3** possui o radical cloro na posição 4 do anel A, a chalcona **4** possui o substituinte 4-dimetilamino no mesmo anel enquanto a chalcona **5** apresenta um grupo metilenodioxí entre os carbonos **3** e **4** do anel A. Estes substituintes foram descritos em estudos anteriores por contribuírem para a capacidade anti-inflamatória;
- Dezesseis chalconas foram capazes de inibir o crescimento de *M. bovis* BCG, cinco destas mantendo similar capacidade inibitória contra cepas Mtb H37Rv e M299, destacando a chalcona **5** como mais ativa e sendo a primeira descrição antimicobacteriana para a mesma;
- As chalconas **4**, **5** e **8** foram capazes de suprimir o crescimento intracelular bacteriano em macrófagos infectados por Mtb, exibindo capacidade de adentrar este microambiente e exercer o efeito desejado;
- A associação entre as chalconas **3**, **5** e **25** e o fármaco padrão rifampicina apresentaram efeito positivo à inibição do crescimento da cepa M299, mostrando uma tendência à existência de efeito sinérgico;
- As amostras **3** e **5** foram as mais potentes em inibir o crescimento extracelular de bactérias Mtb H37Rv e M299 agregadas em *clumps*, sendo a primeira descrição de chalconas com essa atividade;
- A chalcona **5** apresentou maior atividade para ambos efeitos, anti-inflamatório e antimicobacteriano.
- Em camundongos, o tratamento com a chalcona **5** inibiu significativamente o crescimento bacteriano nos pulmões, reduziu em número e tamanho as lesões inflamatórias e a área de pneumonia tuberculosa, além de diminuir a disseminação do bacilo para o baço e fígado;

- A diminuição da patologia no pulmão foi relacionada a capacidade da chalcona **5** diminuir o influxo de células inflamatórias no pulmão, especialmente de neutrófilos, propiciando a redução da necrose nestas áreas e diminuição do número de BAAR extracelulares;
- A diminuição do influxo celular está associado a capacidade da chalcona **5** reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 pelas células do pulmão;
- O tratamento com a rifampicina reduziu significativamente a carga bacilar, embora não tenha propiciado redução da patologia pulmonar devido a maior presença do influxo de células inflamatórias, o que sustenta a abordagem do tratamento adjuvante nos casos de TB grave associada com a inflamação excessiva;
- O tratamento com a chalcona **5** exibiu melhor efeito terapêutico do que o tratamento com o ibuprofeno, tanto no potencial de redução da carga bacilar quanto na redução da área de patologia (pneumonia) ao final de 30 dias de tratamento.
- No âmbito da classe das chalconas, este é a primeira descrição de atividade *dual* em modelo murino de TB induzida por cepa Mtb hipervirulenta, com identificação da chalcona **5** como a substância mais ativa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **ACKART**, D. F.; HASCALL-DOVE, L.; CACERES, S. M.; KIRK, N. M.; PODELL, B. K.; MELANDER, C.; ORME, I. M.; LEID, J. G.; NICK, J. G., BASARABA, R. J. (2014) Expression of antimicrobial drug tolerance by attached communities of *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathog. Dis.* 70: 3, 359-69.
2. **ALAHARI**, A.; TRIVELLI, X.; GUÉRARDEL, Y.; DOVER, L. G.; BESRA, G. S.; SACCHETTINI, J. C.; REYNOLDS, R. C.; COXON, G. D.; KREMER, L. (2007) Thiacetazone, an antitubercular drug that inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in mycobacteria. *Plos One* 2: 12, e1343.
3. **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* reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *Plos Pathog.* 10, 1-14.
4. **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 Microbiol.* 12: 166
5. **ARBEX**, M. A.; VARELLA, M. C. R.; SIQUEIRA, H. R.; MELLO, F. A. F. (2010) Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: Second-line drugs. *J. Bras. Pneumol.* 36: 641-656.
6. **ÁVILA**, H. P.; FÁTIMA, E.; SMÂNIA, A.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA A., JR. (2008) Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 9790-9794.
7. **AZADMEHR**, A.; AFSHARI, A.; BARADARAN, B.; HAJIAGHAEI, R.; REZAZADEH, S.; MONSEF-ESFAHANI, H. (2009) Suppression of nitric oxide production in activated murine peritoneal macrophages *in vitro* and *ex vivo* by *Scrophularia striata* ethanolic extract. *J. Ethnopharmacol.* 124: 166-169.
8. **BALKWILL**, F. AND MANTOVANI, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Rev.* 357: 539-545.
9. **BANDGAR**, B. P. AND GAWANDE, S. S. (2010) Synthesis and biological screening of a combinatorial library of β -chlorovinyl chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 2060-2065.
10. **BJARNSHOLT**, T.; CIOFU, O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; HØIBY, N. (2013) Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed? *Nat. Rev. Drug Discov.* 12: 791-808.
11. **BONIFAIT**, L.; ZHAO, L.; AZELMAT, J.; GENOVESE, S.; EPIFANO, F.; GRENIER, D. (2014) Synthesis and biological activities of 2,6-dihydroxy-4-isopentenylchalcone as an antimicrobial and anti-inflammatory compound. *Med. Chem.* 10: 300-303.
12. **BROWN**, A. K.; PAPAEMMANOUIL, A.; BHOWRUTH, V.; BHATT, A.; DOVER, L. G.; BESRA, G. S. (2007) Flavonoid inhibitors as novel antimycobacterial agents targeting Rv0636, a putative dehydratase enzyme involved in *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. *Microbiol.* 153, 3314-3322.
13. **BUKHARI**, S. N. A.; FRANZBLAU, S. G.; JANTAN, I.; JASAMAI, M. (2013a) Current prospects of synthetic curcumin analogs and chalcones derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *Med. Chem.* 9, 897-903.
14. **BUKHARI**, S. N. A.; JASAMAI, M.; JANTAN, I.; AHMAD, W. (2013b) Review of methods and various catalysts used for chalcone synthesis. *Mini Rev. Org. Chem.* 10, 73-83.

15. **BUKHARI**, S. N. A.; JANTAN, I.; JASAMAI, M. (2013c) Anti-Inflammatory trends of 1, 3-diphenyl-2-propen-1-one derivatives. *Mini Rev. Med. Chem.* 13, 87-94.
16. **BUONSENSO**, D.; SERRANTI, D.; VALENTINI P. (2010) Management of central nervous system tuberculosis in children: light and shade. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 14, 845-853.
17. **BYRNE**, S. T.; DENKIN, S. M.; ZHANG, Y. (2007) Aspirin and ibuprofen enhance pyrazinamide treatment of murine tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 313-316.
18. **CASSIR**, N.; ROLAIN, J-M; BROUQUI, P. (2014) A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Front. Microbiol.* 5, 1-15.
19. **CHAN**, B.; KHADEM, T. M.; BROWN, J. (2013) A review of tuberculosis: focus on bedaquiline. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 70, 1984-1994.
20. **CHANG**, Y-C.; LI, P-C.; CHEN, B-C.; CHANG, M-S.; WANG, J-L.; CHIU, W-T.; LIN, C-H. (2006) Lipoteichoic acid-induced nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages is mediated by cyclooxygenase-2, prostaglandin E₂, protein kinase A, p38 MAPK, and nuclear factor- κ B pathways. *Cell. Signalling* 18: 1235-1243.
21. **COLE**, S. T. (2012) Infectious diseases: transporter targeted in tuberculosis. *Nat. Chem. Biol.* 8: 326-327.
22. **COLE**, S. T. AND RICCARDI, G. (2011) New tuberculosis drugs on the horizon. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 570-576.
23. **COOPER**, A. M. (2009) Cell-mediated immune response in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 393-422.
24. **CORONA**, F. AND MARTINEZ, J. L. (2013) Phenotypic resistance to antibiotics. *Antibiotics* 2, 237-255.
25. **COSCOLLA**, M.; LEWIN, A.; METZGER, S.; MAETZ-RENNING, K.; CALVIGNAC-SPENCER, S.; NITSCHKE, A.; DABROWSKI, P. W.; RADONIC, A.; NIEMANN, S.; PARKHILL, J.; COUACY-HYMAN, E.; FELDMAN, J.; COMAS, I.; BOESCH, C.; GAGNEUX, S.; LEENDERTZ, F. H. (2013) Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 969-976.
26. **CRAGG**, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. (2014) New horizons for old drugs and drug leads. *J. Nat. Prod.* 77, 703-723.
27. **DAI**, J.; CHEN, Y.; LAUZARDO, M. (2011) Web-Accessible database of *hsp65* sequences from *Mycobacterium* reference strains. *J. Clin. Microbiol.* 49: 2296-2303.
28. **DARTOIS**, V. (2014) The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 12: 159-167.
29. **DASHTI**, Y.; GRKOVIC, T.; QUINN, R. J. (2014) Predicting natural product value, an exploration of anti-TB drug space. *Nat. Prod. Rep.* 31: 990-998.
30. **DHEDA**, K.; SCHWANDER, S. K.; ZHU, B.; VAN ZYL-SMIT, R. N.; ZHANG, Y. (2010) The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. *Respirol.* 15, 433-450.
31. **DORHOI**, A.; REECE, S. T.; KAUFMANN, S. H. E. (2011) For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. *Immunol. Rev.* 240: 235-251.
32. **EHLERS**, S. AND SCHAIBLE, U. E. (2013) The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Front. Microbiol.* 3: 1-9.
33. **ERNST**, J. D. (2012) The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.*, 12: 581-591.
34. **FELDMAN**, M.; TANABE, S.; EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; CURINI, M.; GRENIER, D. (2011) Antibacterial and anti-inflammatory activities of 4-hydroxycordoin: potential therapeutic benefits. *J. Nat. Prod.* 74, 26-31.

35. **FOSSLIEN**, E. (2001) Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 31: 325-338.
36. **GAO**, X.; HE, J.; WU, X-D.; PENG, L-Y.; DONG, L-B.; DENG, X.; LI, Y.; CHENG, X.; ZHAO, Q-S. (2014) Further lignans from *Saururus chinensis*. *Planta Med.* 79, 1720-1723.
37. **GARCÍA**, A.; BOCANEGRA-GARCÍA, V.; PALMA-NICOLÁS, J. P.; RIVERA, G. (2012) Recent advances in antitubercular natural products. *Eur. J. Med. Chem.* 49, 1-23.
38. **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. *J. Immunol.* 179: 3119-3125.
39. **GILLESPIE**, S. H. (2007) Tuberculosis: evolution in millennia and minutes. *Biochem. Soc. Trans.* 35:1317-1320.
40. **GLICKMAN**, M. S.; COX, J. S.; JR, W. R. J. (2000) A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell* 5: 717-727.
41. **GO**, M. L.; WU, X.; LIU, X. L. (2005) Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Cur. Med. Chem.* 12, 483-499.
42. **GRIESS**, J. P. (1864) *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 154: 679. / A.C. Bratton, E.K.Marshall Jr., *Journal of Biology and Chemical.* 128 (1939) 537.
43. **GRIFFITHS**, G.; NYSTRÖM, B.; SABLE, S. B.; KHULLER, G. K. (2010) Nano bead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8: 827-834.
44. **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.* 180, 15-22.
45. **GUZIK**, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Phys. Pharm.* 54: 469-487.
46. **GUZMAN**, J. D.; EVANGELOPOULOS, D.; GUPTA, A.; BIRCHALL, K.; MWAIGWISYA, S.; SAXTY, B.; MCHUGH, T. D.; GIBBONS, S.; MALKINSON, J.; BHAKTA, S. (2013) Antitubercular specific activity of ibuprofen and the other 2-arylpropanoic acids using the HT-SPOTi whole-cell phenotypic assay. *BMJ Open* 3: e002672.
47. **HANS**, R.; GUANTAI, E.; LATEGAN, C.; SMITH, P.; WAN, B.; FRANZBLAU, S.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.; CHIBALE, K. (2010) Synthesis, antimalarial and antitubercular activity of acetylenic acalones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20: 942-944.
48. **HARTKOORN**, R. C.; SALA, C.; NERES, J.; POJER, F.; MAGNET, S.; MUKHERJEE, R.; UPLEKAR, S.; BOY-RÖTTGER, S.; ALTMANN, S-H; COLE S. T. (2012) Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin- nature's isoniazid. *EMBO Mol. Med.* 4: 1032-1042.
49. **HAWN**, T. R.; MATHESON, A. I.; MALEY, S. N.; VANDALC, O. (2013) Host-directed therapeutics for tuberculosis: can we harness the host? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77: 608-627.
50. **HUNTER**, R. L. (2011) Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review. *Tuberculosis.* 91: 497-509.
51. **HUNTER**, R. L.; OLSEN M. R.; JAGANNATH, C.; ACTOR, J. K. (2006) Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 36: 371-386.
52. **HWANG**, T-L.; YEH, S-H.; LEU, Y-L.; CHERN, C-Y.; HSU, H-C. (2006) Inhibition of superoxide anion and elastase release in human neutrophils by 3'-Isopropoxychalcone via a cAMP-dependent pathway. *Brit. J. Pharm.* 148: 78-87.

53. **JANIN**, Y. L. (2007) Antituberculosis drugs: ten years of research. *Bioorg. Med. Chem.* 15: 2479-2513.
54. **JIN**, X. Y.; **LEE**, S. H.; **PARK**, P.; **HUR**, J.; **KIM**, S.; **KIM**, H. S. AND **SOHN**, D. H. (2009) 2-Methoxy-4,6-bis(methoxymethoxy)chalcone inhibits nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Bas. Clin. Pharm. Toxicol.* 106: 454-460.
55. **JOHNSON**, M. D.; **MACDOUGALL**, C.; **OSTRSKY-ZEICHNER**, L.; **PERFECT**, J. R.; **REX**, J. H. (2004) Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 693-715.
56. **JORDAO**, L. AND **VIEIRA**, O. V. (2011) Tuberculosis: new aspects of an old disease. *Int. J. Cell Biol.* 2011, 1-13.
57. **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.* 2: 301-320.
58. **KLEINNIJENHUIS**, J.; **OOSTING**, M.; **JOOSTEN**, L. A. B.; **NETEA**, M. J.; **VAN CREVE**, R. (2011) Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Dev. Immunol.* ID 405310, 1-12.
59. **KOLDITZ**, M.; **KOSCHEL**, D.; **PHILIPP**, E.; **HOFFKEN**, G. (2010). Retrospective analysis of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* 2004-2008. *Pneumol.* 64: 675-678.
60. **KONSTAN**, M. W.; **KRENICKY**, J. E.; **FINNEY**, M. R.; **KIRCHNER**, H. L.; **HILLIARD**, K. A.; **HILLIARD**, J. B.; **DAVIS**, P. B.; **HOPPEL**, C. L. (2003) Effect of ibuprofen on neutrophil migration *in vivo* in cystic fibrosis and healthy subjects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306: 1086-1091.
61. **KONTOGIORGIS**, C.; **MANTZANIDOU**, M.; **HADJIPAVLOU-LITINA**, D. (2008) Chalcones and their potential role in inflammation. *Med. Chem.* 8: 1224-1242.
62. **KOO**, M-S.; **MANCA**, C.; **YANG**, G.; **O'BRIEN**, P.; **SUNG**, N. **TSENOVA**, L.; **SUBBIAN**, S.; **FALLOWS**, D.; **MULLER**, G.; **EHRT**, S.; **KAPLAN**, G. (2011) Phosphodiesterase 4 inhibition reduces innate immunity and improves isoniazid clearance of *Mycobacterium tuberculosis* in the lungs of infected mice. *Plos One*, 6: 1-13.
63. **KORKEGIAN**, A.; **ROBERTS**, D. M.; **BLAIR**, R.; **PARISH**, T. (2014) Mutations in the essential arabinosyltransferase EmbC lead to alterations in *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* doi 10.1074/jbc.M114.583112.
64. **KOUL**, A.; **ARNOULT**, E.; **LOUNIS**, N.; **GUILLEMONT**, J.; **ANDRIES**, K. (2011) The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nat. Rev.* 469: 483-490.
65. **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 Rev. Mol. Med.* 13: 1-25.
66. **KWON**, Y-S.; **JEONG**, B-H.; **KOH**, W-J (2014) Tuberculosis: clinical trials and new drug regimens. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 20: 280-286.
67. **LECHARTIER**, B.; **RYBNIKER**, J.; **ZUMLA**, A.; **COLE**, S. T. (2014) Tuberculosis drug discovery in the post post-genomic era. *EMBO Mol. Med.* 6: 158-168.
68. **LEE**, J. Y.; **PARK**, W. (2011) Anti-inflammatory effect of myristicin on RAW 264.7 macrophages stimulated with polyinosinic-polycytidylic acid. *Molecules* 16, 7132-7142.
69. **LI**, J. W. H. AND **VEREDAS**, J. C. (2009) Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Sci.* 325, 161-165.
70. **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. *Clin. Exp. Immunol.*, 133: 30-37.

71. **LU, Y.**; ZHENG, M.; WANG, B.; FU, L.; ZHAO, W.; LI, P.; XU, J.; ZHU, H.; JIN, H.; YIN, D.; HUANG, H.; UPTON, A. M.; MA, Z. (2011) Clofazimine analogs with efficacy against experimental tuberculosis and reduced potential for accumulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 5185-5193.
72. **LUSSIER, F-X.**; COLATRIANO, D.; WILTSHIRE, Z.; PAGE, J. E.; MARTIN, V. J. J. (2013) Engineering microbes for plant polyketide biosynthesis. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 3: 4, e201210020.
73. **LY, C. T.**; ALTUNTOP, M. E.; WANG, Y. (2010) Single-molecule study of viomycin's inhibition mechanism on ribosome translocation. *Biochem.* 49: 9732–9738.
74. **MANCA, C.**; KOO, M-S.; PEIXOTO, B.; FALLOWS, D.; KAPLAN, G.; SUBBIAN, S. (2013) Host targeted activity of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Plos One* 8: 2-11.
75. **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. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 4302-4310.
76. **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* 94, 55-64.
77. **MASCARELLO, A.**; CHIARADIA, L. D.; VERNAL, J.; VILLARINO, A.; GUIDO, R. V. C.; PERIZZOLO, P.; POIRIER, V.; WONG, D.; MARTINS, P. G. A.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; ANDRICOPULO, A. D.; AV-GAY, Y.; TERENCEZI, H. (2010) Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. *Bioorg. Med. Chem.* 18: 3783-3789.
78. **MATIVANDLELA, S. P. N.**; MUTHIVHI, T.; KIKUCHI, H.; OSHIMA, Y.; HAMILTON, C.; HUSSEIN, A. A.; VAN DER WALT, M. L.; HOUGHTON, P. J.; LALL, N. (2009) Antimycobacterial flavonoids from the leaf extract of *Galenia africana*. *J. Nat. Prod.* 72: 2169-2171.
79. **MINISTÉRIO DA SAÚDE** (2009) Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Brasília; Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_versao_28_de_agosto_v_5.pdf.
80. **MOLLACE, V.**; MUSCOLI, C.; MASINI, E.; CUZZOCREA, S.; SALVEMINI, D. (2005) Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol. Rev.* 57: 217-252.
81. **MOODLEY, S.**; KOORBANALLY, N. A.; MOODLEY, T.; RAMJUGERNATH, D.; PILLAY, M. (2014) The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay is a rapid, cheap, *screening* test for the *in vitro* anti-tuberculous activity of chalcones. *J. Microbiol. Methods* 104: 72-78.
82. **MORONEY, A. C.** (2014) Merck manual home and health handbook (Review of drug action section) Merck & Co. Inc, USA.
83. **MÜLLER, P.**; ALBER, D. G.; TURNBULL, L.; SCHLOTHAUER, R. C.; CARTER, D. A.; WHITCHURCH, C. B.; HARRY, E. J. (2013) Synergism between medihoney and rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Plos One* 8: e57679.
84. **NOWAKOWSKA, Z.** (2007) A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur. J. Med. Chem.* 42 :125-137.
85. **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.* 12: 289-299.

86. **NUNN**, P.; WILLIAMS, B.; FLOYD, K.; DYE, C.; ELZINGA, G.; RAVIGLIONE, M. (2005) Tuberculosis control in the era of HIV. *Nat. Rev.* 5, 819-826.
87. **OJHA**, A. K.; BAUGHN, A. D.; SAMBANDAN, D.; HSU, T.; TRIVELLI, X.; GUERARDEL, Y.; ALAHARI, A.; KREMER, L.; JACOBS JR, W. R.; HATFULL, G. F.; (2008) Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol. Microbiol.* 69: 164-174.
88. **ORME**, I. (2011) Development of new vaccines and drugs for TB: limitations and potential strategic errors. *Future Microbiol.* 6: 161-177.
89. **ORME**, I. (2013) A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis* 1-7.
90. **ORME**, I. AND BARSARABA, R. J. (2014) The formation of the granuloma in tuberculosis infection. *Seminars in Immunol.* 26: 601-609.
91. **ORME**, I. M.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. (2015) The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nat. Immunol.* 16: 57-63.
92. **OTTENHOFF**, T. H. M. AND KAUFMANN, S. H. E. (2012) Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *Plos Pathog. Rev.* 8: 1-12.
93. **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. Biol.* 79, 80-86.
94. **PEYRON**, P.; VAUBOURGEIX, J.; POQUET, Y.; LEVILLAIN, F.; BOTANCH, C.; BARDOU, F.; DAFTE, M.; EMILE, J-F.; MARCHOU, B.; CARDONA, P-J.; CHASTELLIER, C.; ALTARE, F. (2008) Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *Plos Pathog.* 4: e1000204.
95. **PHILIPS**, J. A. AND ERNST, J. D. (2012) Tuberculosis pathogenesis and immunity, *Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 7: 353-384.
96. **POUNDER**, J. I.; ANDERSON, C. M.; VOELKERDING, K. V.; SALFINGER, M.; DORMANDYE, J.; SOMOSKOVI, A.; HEIFETS, L.; GRAHAMG, J. J.; STORTS, D. R.; PETTI, C. A. (2010) *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation by genomic deletion patterns with multiplex polymerase chain reaction and melting analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67: 101-105.
97. **PRASAD**, K. AND SINGH, M. B. (2008) Corticosteroids for managing tuberculous meningitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 23: CD002244.
98. **RADAEVA**, T. V.; KONDRATIEVA, E. V.; SOSUNOV, V. V.; MAJOROV, K. B.; APT, A. (2008) A human-like TB in genetically susceptible mice followed by the true dormancy in a Cornell-like model. *Tuberculosis* 88: 576-585.
99. **RAHMAN**, M. A. (2011) Chalcone: a valuable insight into the recent advances and potential pharmacological activities. *Chem. Sci. J.* 2011, CSJ-29.
100. **RAO**, P. N. P. AND KNAUS, E. E. (2008) Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 11: 81-110.
101. **RASO**, G. M.; MELI, R.; DI CARLO, G.; PACILIO, M. AND DI CARLO, R. (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci.* 68: 921-931.
102. **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. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2615-2624.

103. **ROHINI**, R. M.; DEVI, K.; DEVI, S. (2015) Synthesis of novel phenyl azo chalcone derivatives for antitubercular, anti-inflammatory and antioxidant activity. *Der Pharm. Chem.* 7: 77-83.
104. **SALOMON**, C. E. AND SCHMIDT, L. E. (2012) Natural products as lead for tuberculosis drug development. *Curr. Top. Med. Chem.* 12: 735-766.
105. **SANTOSH**, R. S. AND SURIYANARAYANAN, B. (2014) Plants: a source for new antimycobacterial drugs. *Planta Med.* 80: 9-21.
106. **SAWLE**, P.; MOULTON, B. E.; JARZYKOWSKA, M.; GREEN, C. J.; FORESTI, R.; FAIRLAMB, I. J. S.; MOTTERLINI, R. (2008) Structure-activity relationship of methoxychalcones as inducers of heme oxygenase-1. *Chem. Res. Toxicol.* 21: 1484-1894.
107. **SHARMA**, M.; CHATURVEDI, V.; MANJU, Y. K.; BHATNAGAR, S.; SRIVASTAVA, K.; PURI, S.; CHAUHAN, P. M. S. (2009) Substituted quinolinyl chalcones and quinolinyl pyrimidines as a new class of anti-infective agents. *Eur. J. Med. Chem.* 44: 2081-2091.
108. **SHIM**, T. S. AND JO, K-W (2013) Medical treatment of pulmonary multidrug-resistant tuberculosis. *Infect. Chemother.* 45: 367-374.
109. **SILVA**, W. A.; ANDRADE, C. K. Z.; NAPOLITANO, H. B.; VENCATO, I.; LARIUCCI, C.; DE CASTRO, M. R. C.; CAMARGO, A. J. (2013) Biological and structure-activity evaluation of chalcone derivatives against bacteria and fungi. *J. Braz. Chem. Soc.* 24, 133-144.
110. **SIMÕES**, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (2010). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora UFRGS/UFSC, 6ª edição, cap. 23: 584-586.
111. **SINGH**, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. (2014) Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review. *Eur. J. Med. Chem.* 85: 758-777.
112. **SIVAKUMAR**, P. M.; KUMAR, V.; SEENIVASAN, S. P.; MOHANAPRIYA, J.; DOBLE, M. (2010) Experimental and theoretical approaches to enhance anti-tubercular activity of chalcones. *Transact. Biol. Biomed.* 2: 51-61.
113. **SIVAKUMAR**, P. M.; SEENIVASAN, S. P.; KUMAR, V.; DOBLE, M. (2007) Synthesis, antimycobacterial activity evaluation, and QSAR studies of chalcones derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17: 1695-1700.
114. **SKRAHIN**, A.; AHMED, R.; FERRARA, G.; RANE, L.; POIRET, T.; ISAIKINA, Y.; SKRAHINA, A.; ZUMLA, A.; MAEURER, M. J. (2014) Autologous mesenchymal stromal cell infusion as adjunct treatment in patients with multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: an open-label phase 1 safety trial. *Lancet Respir. Med.* 2: 108-122.
115. **STEHR**, M.; ELAMIN, A. A.; SINGH, M. (2014) Filling the pipeline – new drugs for an old disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 14: 110-129.
116. **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. *Immunopathol. Infect. Dis.* 179: 289-301.
117. **TOBIN**, D. M.; ROCA, F. J.; OH, S. F.; MCFARLAND, R.; VICKERY, T. W.; RAY, J. P.; KO, D. C.; ZOU, Y.; BANG, N. D.; CHAU, T. T.; VARY, J. C.; HAWN, T. R.; DUNSTAN, S. J.; FARRAR, J. J.; THWAITES, G. E.; KING, M. C.; SERHAN, C. N. RAMAKRISHNAN, L. (2012) Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell.* 148: 434-446.
118. **TORRADO**, E.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. (2010) Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends Immunol.* 32: 66-72.
119. **VALLANCE**, P. AND LEIPER, J. (2002) Blocking no synthesis: How, where and why? *Nat. Rev.* 1: 939-950.

120. **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. (2015) Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of substituted chalcones focusing on anti-tuberculosis dual treatment approach. *Molecules* 20, 8072-8093.
121. **VILAPLANA**, C.; MARZO, E.; TAPIA, G.; DIAZ, J.; GARCIA, V.; CARDONA, P. (2013) Ibuprofen therapy resulted in significantly decreased tissue bacillary loads and increased survival in a new murine experimental model of active tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 208: 199-202.
122. **WEI**, L.; WU, J.; LIU, H.; YANG, H.; RONG, M.; LI, D.; ZHANG, P.; HAN, J.; LAI, R. (2013) A mycobacteriophage-derived trehalose-6,6'-dimycolate-binding peptide containing both antimycobacterial and anti-inflammatory abilities. *FASEB J.* 27: 3067-3077.
123. **WORLD HEALTH ORGANIZATION** (2014a) Global Tuberculosis Report 2014. Geneva.
124. **WORLD HEALTH ORGANIZATION** (2014b) Drug-resistant TB: Surveillance and Response, supplement Global Tuberculosis Report 2014. Geneva.
125. **YADAV**, V. R.; PRASAD, S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. (2011) The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. *Int. Immunopharmacol.* 11: 295-309.
126. **ZHAI**, Z.; SOLCO, A.; WUD, L.; WURTELED, E. S.; KOHUTE, M. L.; MURPHY, P. A. AND CUNNICKA, J. E. (2009) Echinacea increases arginase activity and has anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophage cells, indicative of alternative macrophage activation. *J. Ethnopharmacol.* 122: 76-85.
127. **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. *J. Infect. Dis.* 179: 1213–1217.
128. **ZUMLA**, A.; PAYAM N.; COLE, S. T. (2013) Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat. Rev.* 12: 388-404.
129. **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. (2014a) New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *Lancet* 14: 327-340.
130. **ZUMLA**, A.; RAO, M.; PARIDA, S. K.; KESHAVJEE, S.; CASSELL, G.; WALLIS, R.; AXELSSON-ROBERTSSON, R.; DOHERTY, M.; ANDERSSON, J.; MAEURER, M. (2014b) Inflammation and tuberculosis: host-directed therapies. *J. Internal Med.* doi: 10.1111/joim.12256.

Dissertações e Teses:

- AMARAL, E. P. (2011) Avaliação da virulência micobacteriana e modulação da resposta imune durante a infecção por isolados clínicos de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*. Dissertação de Mestrado.
- ANDRADE, M. R. M. (2012) Perfil de ativação clássica ou alternativa dos macrófagos e seu impacto na patogenia da tuberculose. Tese de Doutorado.
- VENTURA, T. L. B. (2011) Atividade anti-inflamatória e antimicobacteriana de espécies vegetais ocorrentes no Brasil com ênfase em *Cecropia pachystachya* e *Vochysia divergens*. Dissertação de Mestrado.

9. ANEXO

Molecules **2015**, *20*, 8072–8093; doi:10.3390/molecules20058072

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Antimycobacterial and Anti-Inflammatory Activities of Substituted Chalcones Focusing on an Anti-Tuberculosis Dual Treatment Approach

Thatiana Lopes Biá Ventura ^{1,2}, Sanderson Dias Calixto ¹, Bárbara de Azevedo Abraham-Vieira ³, Alessandra Mendonça Teles de Souza ³, Marcos Vinícius Palmeira Mello ⁴, Carlos Rangel Rodrigues ³, Leandro Soter de Mariz e Miranda ⁵, Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza ⁵, Ivana Correa Ramos Leal ³, Elena B. Lasunskaja ^{1,†,*} and Michelle Frazão Muzitano ^{2,†,*}

¹ Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes 28013-602, RJ, Brazil; E-Mails: thativentura@yahoo.com.br (T.L.B.V.); sandersoncalixto@yahoo.com.br (S.D.C.)

² Laboratório de Produtos Bioativos, Curso de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Pólo Novo Cavaleiro—IMMT, Macaé 27933-378, RJ, Brazil

³ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-901, RJ, Brazil; E-Mails: babi_abraham@hotmail.com (B.A.A.-V.); amsouza2@yahoo.com.br (A.M.T.S.); rangelfarmacia@gmail.com (C.R.R.); ivanafarma@yahoo.com.br (I.C.R.L.)

⁴ Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro 24020141, RJ, Brazil; E-Mail: mvpmello@id.uff.br

⁵ Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-909, RJ, Brazil; E-Mails: leandrosoter@iq.uff.br (L.S.M.M.); souzarod21@gmail.com (R.O.M.A.S.)

† E.B.L. and M.F.M. authors are joint senior authors on this work.

* Authors to whom correspondence should be addressed;
E-Mails: elassounskaja@gmail.com (E.B.L.); mfmuzitano@gmail.com (M.F.M.);
Tel.: +55-222739-7128 (E.B.L.); +55-222796-2539 (M.F.M.).

Academic Editor: Derek J. McPhee

Received: 28 February 2015 / Accepted: 24 April 2015 / Published: 5 May 2015