

Gustavo Reis e Conceição

# **Tuberculose, Novos Desafios**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013



Gustavo Reis e Conceição

# **Tuberculose, Novos Desafios**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Gustavo Reis e Conceição

# **Tuberculose, Novos Desafios**

Monografia apresentada à Universidade Fernando  
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção  
do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

---

(Gustavo Reis e Conceição)

Porto, 2013

## **Sumário**

Apesar dos progressos alcançados em todo o Mundo, a tuberculose continua a ser um problema de saúde pública muito sensível. Com 22 casos/100 mil habitantes registados em 2010, Portugal ainda não conseguiu atingir a categoria de país de baixa incidência. Com o aparecimento de cada vez mais casos de tuberculose multirresistente, os fármacos de primeira e segunda linha têm-se relevado ineficazes. Os novos desafios para a travagem deste fenómeno passam pela utilização de métodos mais rápidos e sensíveis para um diagnóstico precoce e também pela pesquisa de novas moléculas e de novos locais alvo.

## **Abstract**

Despite progress made around the world, TB remains a very sensitive public health problem. With 22 cases/100 thousand inhabitants recorded in 2010, Portugal still failed to reach the country category of low incidence. With the increasing numbers of multidrug-resistant tuberculosis cases, drugs of first and second line have shown to be ineffective. New challenges for stopping this phenomenon are the use of rapid and sensitive methods for early diagnosis and also for researching new molecules and new target sites.

---

## Índice

Sumário.....	V
Índice .....	VI
Índice de Figuras .....	VIII
Índice de Tabelas .....	IX
Abreviaturas.....	X
I. Introdução.....	12
II. Revisão Bibliográfica .....	14
1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	14
2. Transmissão e Patogénese .....	20
3. Dados epidemiológicos .....	23
III. Diagnóstico.....	24
1. Observação microscópica.....	24
2. Cultura .....	26
3. Sistemas automáticos e semiautomáticos.....	26
4. Novas tecnologias de identificação .....	27
IV. Tratamento.....	29
1. Antibióticos de primeira linha.....	32
1.1 Rifampicina .....	32
1.2 Isoniazida .....	34
1.3 Pirazinamida.....	35
1.4 Etambutol .....	37
2. Antibióticos de segunda linha.....	39
2.1 Etionamida .....	39
2.2 PAS.....	40
2.3 Aminoglicosídeos.....	42

2.4	Capreomicina .....	42
2.3	Fluoroquinolonas.....	43
3.	DOTS.....	45
V.	Novos fármacos .....	46
1.	Fluoroquinolonas .....	47
2.	Bedaquilina (TMC-207) .....	47
3.	Nitroimidazóis .....	48
4.	SQ-109.....	48
5.	Sudoterb (LL-3858).....	48
6.	Benzotiazinona (BTZ043) .....	48
7.	Oxazolidinonas .....	49
VI.	Novos locais alvo .....	49
1.	Maltosiltransferase.....	50
2.	Ciclopropanação .....	50
3.	<i>MshC</i> .....	51
4.	Fosforilribosiltransferase .....	51
VII.	Conclusão .....	52
VIII.	Bibliografia .....	54

## Índice de Figuras

Figura 1- <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> visualizado ao microscópio eletrônico.....	15
Figura 2- Comparação estrutural da parede celular entre as bactérias Gram positivo e negativo com a do <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> .....	15
Figura 3- Microscopia eletrônica com citoquímica Acpase do <i>M. leprae</i> fagocitados observado após 4 horas de infecção em macrófagos da medula óssea. ....	16
Figura 4- Biossíntese de ácidos micólicos.....	17
Figura 5- Processo de infecção.....	20
Figura 6- Influência das características do meio no crescimento do <i>Mtb</i> .....	21
Figura 7- Incidência de tuberculose na Europa. ....	23
Figura 8- <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> visualizado através de coloração de Ziehl-Neelsen. ....	25
Figura 9- <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> visualizado através da técnica de coloração auramina-rodamina.....	25
Figura 10- Mecanismo ação da pirazinamida. Legenda: POA-Ácido pirazinóico; HPOA- Ácido pirazinóico protonado; NAD- Nicotinamida adenina dinucleótido.....	36
Figura 11- Gene <i>embCAB</i> .....	37
Figura 12- Aspeto morfológico do <i>M. smegmatis</i> .....	38
Figura 13- Mecanismo de ação da Etionamida. ....	40
Figura 14- Via metabólica do ácido fólico e prováveis locais alvo do PAS .....	41
Figura 15- Estrutura básica das quinolonas.....	47
Figura 16- Novos locais alvo identificados em fase de estudo .....	50

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Classificação das espécies micobacterianas atendendo à sua patogenicidade para o Homem .....	14
Tabela 2- Diferentes tipos de NAAT existentes no mercado .....	27
Tabela 3- Esquema de tratamento habitual para o combate da tuberculose.....	29
Tabela 4- Relação entre os diversos MIC da rifampicina e as alterações genéticas no gene <i>RpoB</i> .....	33
Tabela 5- Cronologia de entrada das quinolonas no mercado do Reino Unido .....	43
Tabela 6- Principais moléculas em estudo para o combate da tuberculose.....	46

## **Abreviaturas**

***Mtb*** - *Mycobacterium Tuberculosis*

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**VIH** - Vírus da Imunodeficiência Adquirida

**MDR-TB** - Tuberculose Multirresistente

**XDR-TB** - Tuberculose Extensivamente Resistente

**PCR** - Reação em Cadeia de Polimerase

**B.A.A.R.** - Bacilos Álcool Ácido Resistentes

**DOTS** - Tratamento Diretamente Observado Curta Duração

**MIC** - Concentração Mínima Obrigatória

**FDA** - Food and Drug Administration

## I. Introdução

A tuberculose é uma doença contagiosa cujo agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), também conhecido como bacilo de Koch.

A Organização Mundial da Saúde estima que, por ano, surgem nove milhões de casos de tuberculose, e destes, somente sete milhões sobrevivem. Apenas dez por cento dos casos de infecção pelo *Mtb* surgem nos indivíduos infetados pelo VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana) e destes, 80% dos casos surgem no continente africano. A epidemia da infecção pelo VIH provocou um acréscimo de casos de tuberculose em África atingindo um pico em 2004. A melhoria das condições sociais e económicas tem um peso importante na luta contra a tuberculose. Por sua vez as crises económicas podem ter um efeito retroativo, provocando uma degradação das condições (WHO, 2010). Nos últimos anos, com a implementação de estratégias que visam reduzir a incidência de tuberculose, Portugal conseguiu reduzir significativamente os casos desta infecção, passando de 34,4 casos por 100'000 habitantes em 2003 para 22 casos por 100'000 habitantes em 2010, correspondendo a um decréscimo anual médio de 6,4% nos últimos 10 anos (Antunes, 2011).

Para se proceder a um correto diagnóstico bacteriológico e, por sua vez, implementar uma terapêutica adequada para o combate da tuberculose, é necessário realizar testes de identificação de *Mtb* e de sensibilidade aos antibióticos. Além de apresentarem alguma rapidez na deteção do bacilo de Koch, os testes de identificação também devem apresentar um custo relativamente baixo.

O aparecimento de resistência aos fármacos antituberculosos, principalmente de estirpes MDR-TB (tuberculose multiresistente) e XDR-TB (tuberculose extensivamente resistente) tornou-se um enorme problema de saúde pública e um grande obstáculo no controlo global da tuberculose.

Como o *Mtb* é um bacilo de crescimento muito fastidioso, os métodos de diagnóstico tradicionais (realização de culturas) da bactéria têm sido ultrapassadas pelas novas tecnologias, sendo estas mais rápidas e mais precisas quanto ao resultado obtido.

Estes novos métodos utilizados trazidos pela biologia molecular consistem em técnicas como o PCR (reação em cadeia de polimerase), a amplificação isotérmica e a LCR (reação em cadeia de ligase)(Goncalves *et al.*, 2012). Estes métodos consistem na amplificação do código genético do bacilo de Koch (IS6110, 16SrARN ou 65KDa) (Portugal *et al.*, 2008) e também têm a capacidade de detetar algumas mutações genéticas responsáveis pelo aparecimento de resistências aos antibióticos (*rpoB*, *katG* ou *inhA*), podendo assim adequar a melhor terapêutica de modo a obter uma maior eficácia no tratamento (Goncalves *et al.*, 2012).

Existem vários antibióticos disponíveis para o tratamento da tuberculose, no entanto, este arsenal terapêutico tem sido cada vez menos eficaz devido ao aparecimento de estirpes resistentes a estes antibióticos, nomeadamente, MDR-TB e XDR-TB tornando-se urgente a pesquisa de novas moléculas (Lamichhane, 2010, Nathan *et al.*, 2008, Prabowo *et al.*, 2012).

Com a realização deste trabalho, pretende-se aprofundar os conhecimentos da problemática da tuberculose multirresistente, desde o seu diagnóstico (através de novas técnicas de diagnóstico), até à sua cura, passando pela identificação dos tipos de resistência aos fármacos existentes, pela identificação de novas moléculas com eficácia cientificamente comprovada e de novos locais alvo como base de estudo para futuras moléculas.

## II. Revisão Bibliográfica

### 1. *Mycobacterium tuberculosis*

A espécie *Mycobacterium tuberculosis* pertence ao género *Mycobacterium* e à família das *Mycobacteriaceae*. Como se pode verificar pela tabela 1, o género *Mycobacterium* contempla espécies patogénicas e não patogénicas. Além do *Mycobacterium tuberculosis*, existem outras espécies patogénicas para o ser humano, nomeadamente, o *M. leprae*, agente causador da lepra. Em doentes imunocomprometidos, podem ocorrer infeções por micobactérias oportunistas, tais como o *M. avium*, *M. simiae*, *M. kansasii* e o *M. haemophilum*. Nos animais, também podem surgir infeções provocadas por micobactérias destacando-se o *M. bovis*, agente causador da tuberculose bovina e o *M. avium*, associado a infeções respiratórias nas aves e nos suínos (Rastogi et al., 2001).

Estritamente patogénicas	Potencialmente patogénicas	Raramente patogénicas
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i> <sup>(2)</sup>	<i>M. gordonae</i>
<i>M. bovis</i> <sup>(1)</sup>	<i>M. intracelulares</i> <sup>(2)</sup>	<i>M. terrae</i>
<i>M. africanum</i> <sup>(1)</sup>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. triviale</i>
	<i>M. kansasii</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
<i>M. leprae</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. flavescens</i>
	<i>M. marinum</i>	<i>M. farcinogenes</i>
<i>M. ulcerans</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. microti</i> <sup>(1)</sup>
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. lepraemurium</i>
	<i>M. paratuberculosis</i>	
	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. segmatis</i> *
	<i>M. malmoense</i>	<i>M. termoresistibile</i> *
	<i>M. shimoidei</i>	<i>M. fallax</i> *
		<i>M. phlei</i> *
	<i>M. fortuitum</i> *	<i>M. vaccae</i> *
	<i>M. chelonae</i> *	<i>M. parafortuitum</i> *
		<i>M. aurum</i> *
		<i>M. chitae</i> *
		<i>M. duvalii</i> *
		<i>M. gilvum</i> *
		<i>M. neoaurum</i> *
		<i>M. gadium</i> *
		<i>M. senegalense</i> *
		<i>M. komossense</i> *
		<i>M. sphagni</i> *
		<i>M. agri</i> *
		<i>M. aichiense</i> *

Tabela 1- Classificação das espécies micobacterianas atendendo à sua patogenicidade para o Homem. Legenda: \*- Micobactérias de crescimento rápido; <sup>(1)</sup>-Micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*; <sup>(2)</sup>- Micobactérias pertencentes ao complexo *M. avium* (Ferreira e Sousa, 2000).

O *Mycobacterium tuberculosis* é uma bactéria aeróbia, imóvel, não capsulada e não formadora de esporos sendo consideradas parasitas intracelulares (sendo os macrófagos alveolares os principais hospedeiros). Como se pode verificar na figura 1, morfologicamente, o *Mtb* possui estrutura bacilar ou cocobacilar, recto ou ligeiramente encurvado, possuindo um tamanho de 0,2 a 0,6 µm de largura e de 1 a 10 µm de comprimento (Ferreira e Sousa, 2000).

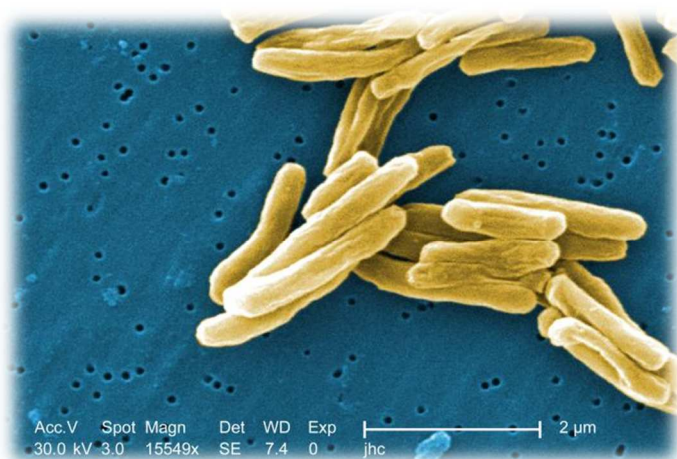


Figura 1- *Mycobacterium Tuberculosis* visualizado ao microscópio eletrónico (<http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>).

A composição da parede celular do *Mtb* merece especial atenção. A parede celular desempenha um papel determinante na adaptação da micobactéria ao meio intracelular, como por exemplo, promover a adesão desta dentro dos macrófagos e assim adquirir os nutrientes essenciais, inibindo as propriedades microbicidas do

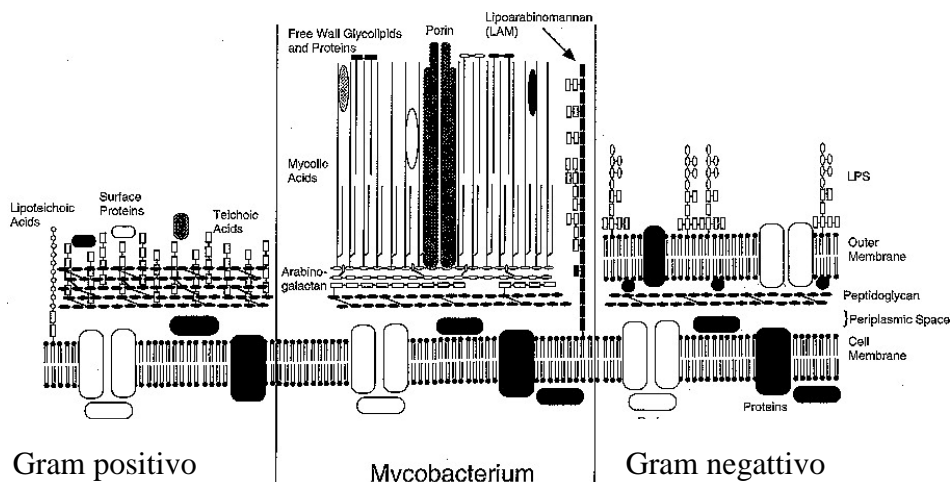


Figura 2- Comparação estrutural da parede celular entre as bactérias Gram positivo e negativo com a do *Mycobacterium Tuberculosis* (Parsons et al., 1997).

hospedeiro. A complexa estrutura e composição da parede celular (figura 2) são essenciais para o *Mtb*, não só para a sua própria sobrevivência a nível intracelular e na modulação da resposta imune do indivíduo infetado como também como instrumento para a aquisição de resistência aos fármacos. A compreensão dos constituintes da parede celular é de extrema importância para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou potenciais estratégias para o controlo e tratamento da tuberculose (Rastogi et al., 2001).

Um estudo sobre a interação entre micobactérias e macrófagos revela que as micobactérias intracelulares se encontravam rodeadas por uma “estrutura capsular” ou “electron-transparent zone” de 70 nm a 100 nm (figura 3), que impede a ligação fagolisossoma, permitindo à micobactéria crescer no interior do macrófago (Frehel e Rastogi, 1987). Este revestimento capsular é uma parte integrante das espécies patogénicas *M. avium* e *Mtb*, não se visualizando nas espécies não patogénicas *M. segmatis* (Rastogi et al., 2001).

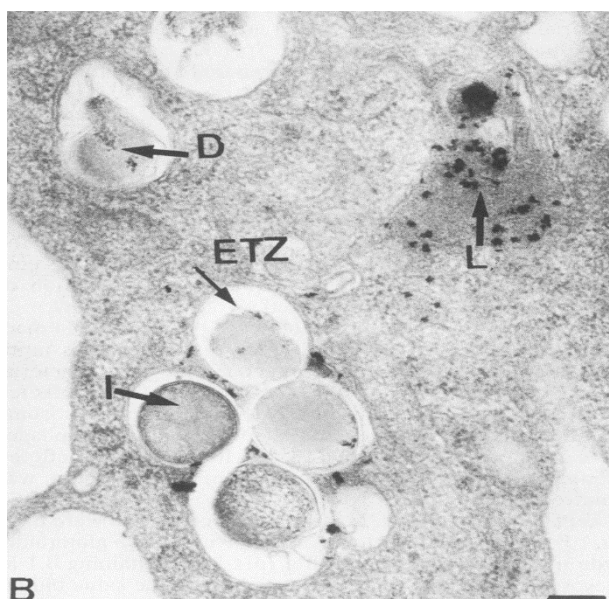


Figura 3- Microscopia eletrônica com citoquímica Acpase do *M. Iepxae* fagocitados observado após 4 horas de infecção em macrófagos da medula óssea. As setas evidenciam depósitos ricos em eletrões à volta dos bacilos D e I. Legenda: I, Bactéria intacta; D, bactéria danificada, L, lisossomas. ETZ, “electron-transparent zone”. Barra, 0,2, um. (Rastogi et al., 2001).

A persistência e virulência da micobactéria está associada à estrutura da parede celular bem organizada, sendo esta rica em diversos lipídios, tornando a parede celular altamente impermeável aos antibióticos hidrofílicos. No entanto, torna-se também um alvo atrativo para o desenvolvimento de vacinas e de novos fármacos para o combate da tuberculose (Jankute et al., 2012). A parede celular é composta por dois segmentos, interna e externa. O segmento interno, situado imediatamente a seguir à membrana



segunda fase do ciclo de alongação, o produto resultante, o  $\beta$ -cetoacil-ACP é reduzido pela enzima NADPH dependente  $\beta$ -cetoacil redutase. O produto desta reação é desidratada por um conjunto de enzimas HadABC e finalmente reduzida pela enzima InhA (proteína transportadora enoil-acil redutase) (Molle *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por Ojha demonstra que os bacilos de *Mtb* têm capacidade de libertar ácidos micólicos da parede celular para formar uma matriz (biofilme). Este biofilme é permeável aos gases permitindo assim a entrada de oxigénio e a sobrevivência da micobactéria no interior do macrófago. Outra característica importante consiste na função de barreira deste biofilme aos antibióticos, impedindo o contacto destes com a micobactéria. O processo de formação do biofilme é, sem dúvida, um local atrativo para o desenvolvimento de novos fármacos, podendo assim encurtar o tempo de tratamento. Os ácidos micólicos livres presentes neste biofilme têm capacidade de induzir resposta inflamatória pulmonar e de ativar os macrófagos (Ojha *et al.*, 2008) (Vander Beken *et al.*, 2011).

O segmento externo é composto por lípidos livres e alguns ácidos gordos de cadeia curta e longa. Inseridas no meio, encontram-se as proteínas da parede celular, o fosfatidilinositol manosídeos (PIMs), lípidos contendo ftiocerol, lipomanano (LM) e lipoarabinomanano (LAM) (derivado do glicolípido fosfatidil-mio-inositol). (Jankute *et al.*, 2012, Brennan, 2003) Este tem como principal função inibir a ligação fago-lisossoma no interior do macrófago. Esta composição da parede celular é de extrema importância pois, aquando de um processo de lise celular com a utilização de solventes, os lípidos livres, as proteínas, o LAM e os PIMs são dissolvidos nos solventes enquanto o complexo formado pelo ácido micólico, peptidoglicano e arabinogalactano não são dissolvidos (Brennan, 2003).

A composição da parede celular confere, também, alguma resistência a diversos métodos de coloração empregando vários tipos de corantes, como por exemplo, o método de coloração de Gram ou de Giemsa. Quando corado, o *Mtb* torna-se resistente à descoloração por soluções ácido-alcoólicas, característica responsável pela atribuição da designação de bactérias álcool-ácido-resistentes (B.A.A.R.)(Ferreira e Sousa, 2000).

Apesar de as micobactérias apresentarem vários tipos de lípidos na parede celular, alguns são característicos de algumas espécies, tais como sulfolípidos, exclusivamente presente no *Mtb* e que estão envolvidos na sua patogenicidade (Brennan

e Nikaido, 1995). Além disso, o gradiente de fluidez da parede celular micobacteriana possui uma orientação oposta à todas as bactérias Gram-negativas, sendo que a região mais externas é mais fluida do que o a interna (Brennan e Nikaido, 1995). As micobactérias possuem proteínas da membrana que formam canais seletivos catiónicos denominado canais porinas. Estes canais têm como objetivo controlar ou retardar a difusão de pequenas moléculas hidrofílicas, conferindo assim, baixa permeabilidade da parede celular para solutos hidrofílicos (Jarlier e Nikaido, 1994). Por princípio, moléculas lipofílicas possuem maior capacidade para atravessar qualquer membrana biológica. No entanto, fatores como a baixa fluidez da estrutura interna e desta se encontrar num estado quase cristalino faz com que a parede celular do Mtb se torne uma excelente barreira para os fármacos lipofílicos (Brennan e Nikaido, 1995).

## 2. Transmissão e Patogénese

O Homem é o principal reservatório do *Mtb*, pelo que a sua transmissão ocorre principalmente por via aérea, através da inalação de aerossóis provenientes de um indivíduo infetado. A maioria dos aerossóis não consegue chegar aos alvéolos, ficando presos no nariz ou no trato respiratório superior, sendo estes eliminados posteriormente. Apenas os aerossóis contaminados pelo *Mtb* que chegam aos alvéolos pulmonares têm capacidade de provocar infeção (Ferreira e Sousa, 2000).

A tuberculose pode ser dividida em tuberculose primária ou primoinfeção e tuberculose secundária. A primoinfeção ocorre quando os indivíduos nunca tiveram contacto com a micobactéria, consistindo assim, numa primeira exposição ao bacilo. A tuberculose secundária desenvolve-se a partir de uma nova infeção (reinfeção exógena) ou da reativação dos bacilos latentes (reinfeção endógena) (Bombarda *et al.*, 2001).

Após a inalação, a bactéria é ingerida através de fagocitose por macrófagos alveolares e células dendríticas dos tecidos (figura 5), sendo estes parte integrante do sistema imunitário. No entanto, devido à proteção conferida pela sua parede celular e

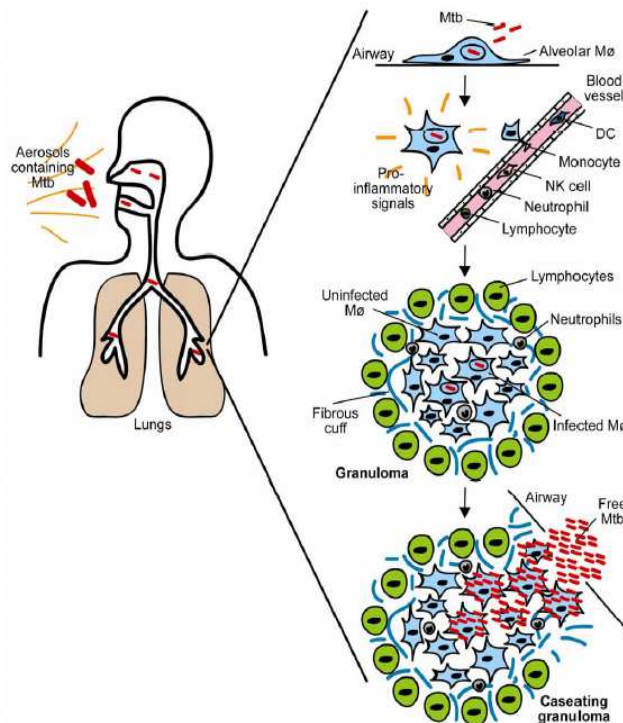


Figura 5- Processo de infeção (Russell, 2007).

pela capacidade de inibir a ligação fago-lisossoma, o *Mtb* possui capacidades para

sobreviver no interior dos macrófagos, servindo estes, de reservatório. Estes, quando infectadas, libertam citocinas pró-inflamatórias, que leva a recrutamento de mais células dendríticas, monócitos e neutrófilos a partir da corrente sanguínea. As células dendríticas infectadas são ativadas e migram para o nódulo linfático local, onde ocorre a ativação das células T (Russell, 2007, de Chastellier, 2009).

As citocinas IL-12 e IL-18, libertadas pelas células infectadas, induzem a atividade da célula NK, e, por sua vez, libertam IFN- $\gamma$  responsável pela ativação dos macrófagos para produzir TNF- $\alpha$  e substâncias microbicidas. Através desta sinalização e acumulação das células de defesa, ocorre a formação de granuloma. Neste, os macrófagos diferenciam-se em células epiteliais ou fundem-se originando células gigantes. Desta forma, os bacilos ficam rodeados por linfócitos, fibroblastos e proteínas da matriz extracelular. Com a progredir da infeção, ocorre a acumulação de macrófagos necróticos no granuloma, originando necrose caseosa, em que em estados avançados da tuberculose, gera cavidades no pulmão. O rompimento destas cavidades caseosas provoca a libertação de bacilos no seu estado ativo (responsáveis pela transmissão da infeção para outros indivíduos). Num estado latente da infeção, os bacilos ficam contidos no granuloma permanecendo num estado de dormência ficando por vezes neste estado durante décadas característica única do *Mtb* e do *Mycobacterium leprae* (de Chastellier, 2009).

Como se pode verificar na figura 6, as características do meio onde se encontra o *Mtb* é essencial para a ação de alguns fármacos antituberculosos, nomeadamente a

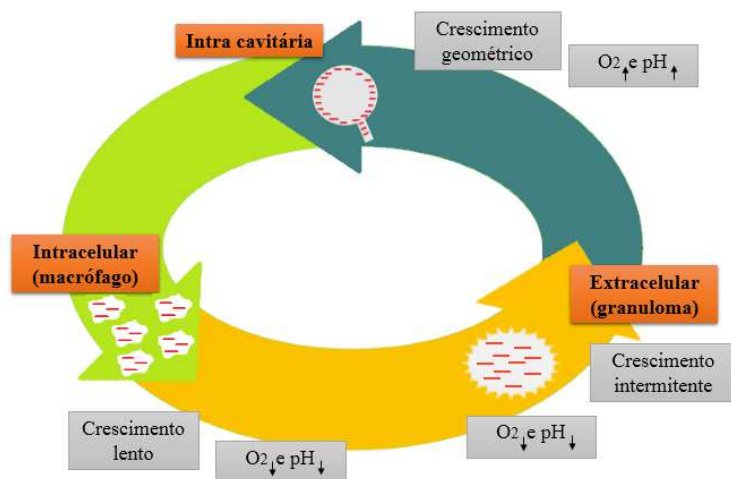


Figura 6- Influência das características do meio no crescimento do *Mtb* (Cedido pelo Professor João Carlos Sousa).

acidez do meio e a presença de oxigênio. O *Mtb* é especialmente sensível aos ácidos, isto é, na presença de um meio com pH ácido, o crescimento da micobactéria é comprometido. Esta característica permite, também, evidenciar a eficácia da pirazinamida como fármaco antituberculoso, apresentando o seu efeito quando este é convertido no seu ácido fraco, o ácido pirazinóico (Zhang *et al.*, 2003).

### 3. Dados epidemiológicos

A tuberculose continua a ser um problema de saúde global, tratando-se da segunda maior causa de morte por processo infeccioso, logo a seguir ao VIH. A OMS estima que, em 2011, houve cerca de nove milhões de novos casos de tuberculose no mundo, 1,4 milhões de mortes causadas pela tuberculose e destes, 430'000 mortes correspondem a indivíduos seropositivos (Antunes, 2011).

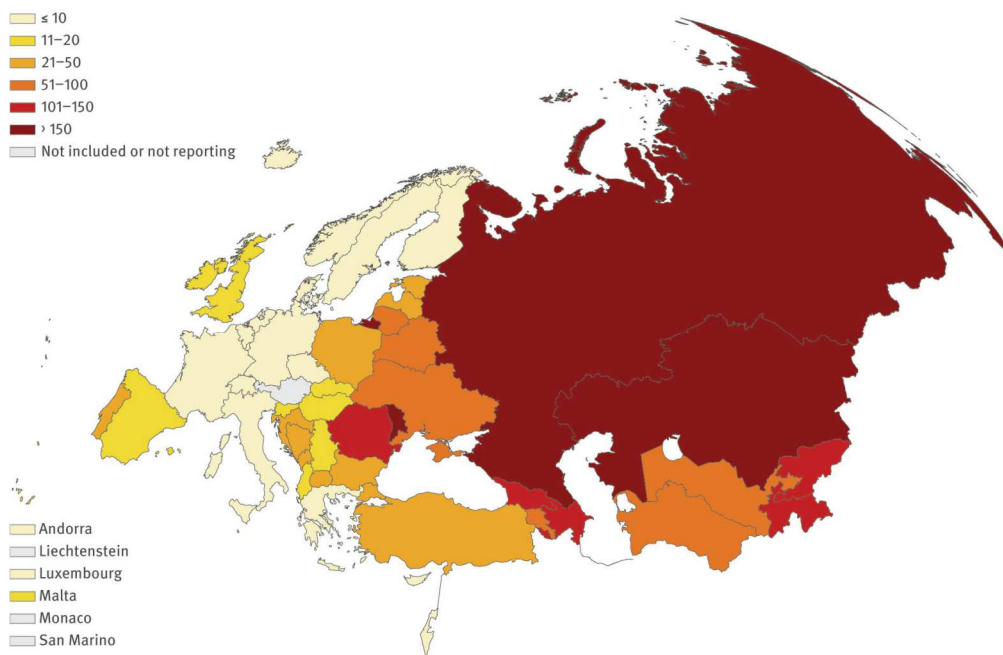


Figura 7- Incidência de tuberculose na Europa (Tuberculosis Surveillance in Europe 2008).

Em 2010, foram diagnosticados 2559 casos de tuberculose em Portugal. Este valor permite verificar uma diminuição constante da taxa de incidência de tuberculose desde 2002, com um decréscimo médio anual de 6,4%. Apesar destes valores serem promissores, Portugal continua com a maior taxa de incidência de tuberculose da Europa ocidental, continuando acima da fasquia dos 20 casos por 100000 habitantes (figura 7), limite que define os países de baixa incidência. Em 2010, Portugal apresentava uma incidência média de 22 casos por 100000 habitantes, sendo o Porto, o distrito com maior taxa de incidência do país: 33,9 casos por 100000 habitantes (Antunes, 2011).

O número de casos de tuberculose resistente à terapêutica tem vindo a aumentar, atingindo todos os continentes. A OMS estima que surge, a cada ano, cerca de meio milhão de novos casos de MDR-TB (Antunes, 2011).

### III. Diagnóstico

A constante evolução da Microbiologia permitiu o desenvolvimento de novas ferramentas e técnicas de diagnóstico e melhoria dos já existentes, com o objetivo de permitir o diagnóstico precoce da tuberculose e de desenvolver uma estratégia terapêutica mais adequada para cada situação (Jou *et al.*, 1997).

As metodologias devem ser de fácil realização, com equipamentos e infraestruturas simples de modo a que o diagnóstico possa ser aplicado em todas as partes do mundo (Singh e Kant, 2002). Por sua vez, os resultados devem ser rápidos, de fácil realização e interpretação, de modo a iniciar a terapêutica o mais rápido possível (Singh e Kant, 2002). Para a detecção da presença de *Mtb*, são utilizadas amostras biológicas, nomeadamente, amostras de expectoração, aspirados brônquicos e lavagens bronco-alveolares.

#### 1. Observação microscópica

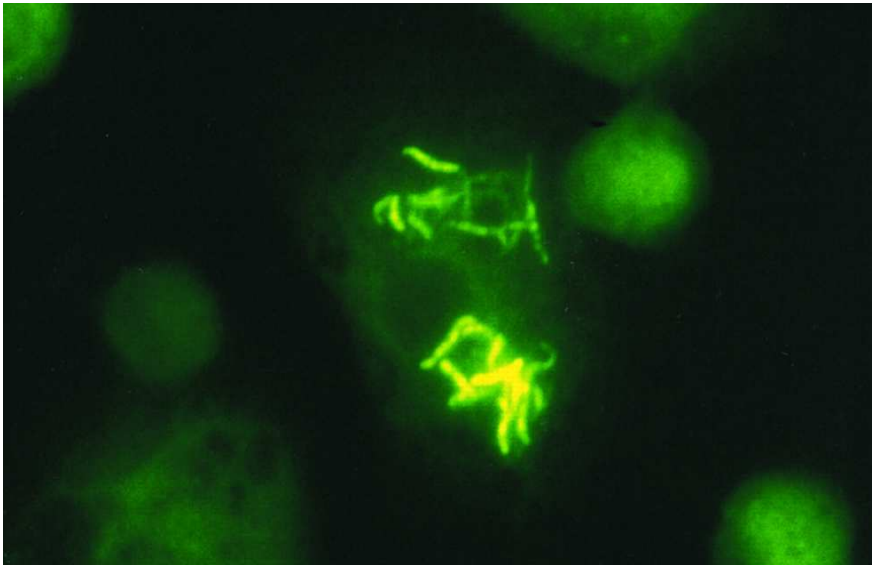
O diagnóstico inicial da tuberculose é efetuado através do exame microscópico direto, colocando em evidência os B.A.A.R.. Este tipo de exame é o método de mais fácil realização, menos dispendioso e mais rápido que outras técnicas. São realizadas, principalmente, as técnicas de Ziehl-Neelsen e de Auramina-rodamina. No entanto, o exame microscópico direto apresenta uma baixa sensibilidade, exigindo a presença de, pelo menos, 10<sup>4</sup> bacilos/ml para se obter um exame positivo (Ferreira e Ávila, 2001).

A coloração de Ziehl-Neelsen permite colocar em evidência os B.A.A.R. (figura 8), sendo que durante o procedimento de coloração pela fucsina, as micobactérias não descoram por uma mistura de álcool e ácido clorídrico. Esta propriedade deve-se à presença de grandes quantidades de lípidos na parede celular (ácidos micólicos) causando hidrofobicidade, dificultando assim, a remoção do corante pelo solvente. Este método consiste na adição de fucsina ao esfregaço numa primeira fase e em seguida na adição de uma mistura de álcool (97%) e ácido clorídrico (3%). Após a lavagem com água, é colocado azul-de-metileno ao esfregaço. Assim, as bactérias B.A.A.R. passam a adquirir a cor vermelha (fucsina), e as outras, que não retêm o corante, passam a assumir a cor do azul-de-metileno, funcionando também como contrastante (Ferreira e Ávila, 2001).



*Figura 8- Mycobacterium Tuberculosis visualizado através de coloração de Ziehl-Neelsen (Huggett et al., 2003).*

A coloração Auramina-rodamina é uma técnica de fluorescência e baseia-se na coloração pela auramina, permitindo a visualização dos B.A.A.R. como bacilos amarelo-fluorescentes (figura 9) quando observados em microscopia de fluorescência (Zhang et al., 1998).



*Figura 9- Mycobacterium Tuberculosis visualizado através da técnica de coloração auramina-rodamina (Zhang et al., 1998).*

## 2. Cultura

Como método de diagnóstico microbiológico, a cultura do *Mtb* continua a ser um método essencial, permitindo distinguir o *Mtb* de outras micobactérias. Este método consiste no crescimento em cultura de colónias típicas de *Mtb*. As vantagens da cultura em comparação com a microscopia são várias. Com a presença de, apenas, 10 bacilos/ml de amostra é possível obter um exame cultural positivo, tratando-se, portanto, de uma técnica mais sensível que o exame microscópico direto (Ferreira e Ávila, 2001). A identificação das espécies isoladas é realizada através do isolamento em cultura pura e posterior identificação. Como se trata de bactérias bastante exigentes em termos de crescimento, torna-se necessário utilizar meios de cultura ricos e frescos. No entanto, este tipo de metodologia necessita de três a oito semanas (quatro semanas de incubação a 37°C com 5-10% de CO<sub>2</sub> e cerca de quatro semanas para identificação e realização de antibiograma) para apresentar um resultado (Singh e Kant, 2002, Vega *et al.*, 2005)

Relativamente aos meios de cultura sólidos, o meio de Löwestein-Jensen é o mais utilizado, possibilitam uma leitura quantitativa, através da contagem do número de colónias, tornando mais adequado para a monitorização do tratamento. Os meios de cultura líquidos, como o meio de Middlebrook, são meios mais enriquecidos, conferindo uma maior sensibilidade.

## 3. Sistemas automáticos e semiautomáticos

O surgimento de sistemas automáticos e semiautomáticos de leitura do crescimento das micobactérias em meio líquido constituiu uma melhoria importante na micobacteriologia. A utilização destes sistemas permitiu uma deteção mais rápida do crescimento, com a utilização de diversos métodos, nomeadamente:

- Radiométricos (libertação de CO<sub>2</sub> marcado com carbono 14, no Bactec 460TB<sup>®</sup>);
- Fluorimétricos (libertação de um composto fluorescente devido ao consumo de O<sub>2</sub>, no MGIT<sup>®</sup> e no Bactec MGIT960<sup>®</sup>);
- Colorimétricos (baseado na obtenção de cor por parte do meio de cultura sensível a uma reação de redução secundária ao consumo de O<sub>2</sub> pelo *Mtb*, no MB Redox<sup>®</sup>)

Assim, é possível obter uma cultura positiva entre cinco a quinze dias. No entanto, os meios líquidos têm a desvantagem de não permitirem a quantificação do crescimento das micobactérias e são particularmente favoráveis à contaminação por outras bactérias (Bento *et al.*, 2011).

#### 4. Novas tecnologias de identificação

A introdução de novas técnicas de biologia molecular no diagnóstico da tuberculose permitiram uma redução no tempo de obtenção dos resultados laboratoriais, mas também a identificação precoce de resistências aos fármacos utilizados no tratamento. Assim, é possível obter um início de tratamento mais rápido e de acordo com os resultados obtidos no diagnóstico molecular.

Dentro das novas técnicas de identificação, encontram-se as sondas de ácidos nucleicos. Estas identificam a presença de uma sequência de DNA específica do complexo *Mtb*, por hibridação da sonda com o seu fragmento homólogo (Ling *et al.*, 2008)

As técnicas de amplificação dos ácidos nucleicos (NAAT) têm tido grande importância no diagnóstico da infecção, uma vez que permite a obtenção dos resultados num curto espaço de tempo (três a seis horas). A técnica mais conhecida é a reação em cadeia da polimerase (PCR). No entanto, existem outros kits comerciais que utilizam diferentes métodos para amplificar uma sequência específica do DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (tabela 2). Estes kits incluem: o teste GenProbe Amplified *M. tuberculosis* Direct<sup>®</sup> (AMTD), o teste Roche Amplicor MTB<sup>®</sup>, o Cobas Amplicor<sup>®</sup>, o Abbott LCx<sup>®</sup> e o teste BD-ProbeTec<sup>®</sup> (SDA).

NAAT	Fabricante	Método
Amplified <i>M. tuberculosis</i> Direct Test (AMTB)	Gen-Probe Inc San Diego, CA	Transcrição mediado pela amplificação do rRNA
Amplicor MTB	Roche Molecular Systems Branchburg, NJ	Amplificação por PCR do 16s rRNA
Cobas Amplicor	Roche Diagnosis Systems Mannheim, Germany	Amplificação por PCR do 16s rRNA
LCx (descontinuado)	Abbot Laboratories Abbot Park, IL	Reação em cadeia de ligase amplificação da proteína de 38kDa
BD-ProbeTec Direct (SDA)	Becton Dickinson Diagnostic Systems Sparks, MD	Amplificação de IS6110 e 16s rRNA
Amplificação isotérmica mediada em loop (LAMP)	Eiken Chemical Co, Ltd, Tokyo	Amplificação isothermal e leitura visual através de fluorescência UV

Tabela 2- Diferentes tipos de NAAT existentes no mercado (Ling *et al.*, 2008).

Mais recentemente, surgiu o teste de amplificação isotérmica mediada em loop (LAMP) (Ling et al., 2008, Bento et al., 2011).

Para a identificação de estirpes de *Mtb* resistentes à terapêutica, foram desenvolvidas novos métodos no sentido de adequar a terapêutica. Estes métodos baseiam-se na técnica de NAAT e do PCR, identificando sequências genéticas responsáveis pela resistência. Por exemplo, a reação em cadeia da polimerase quantitativa automatizada (Xpert MTB/RIF) permite verificar a existência de resistência à rifampicina, através da identificação de mutações numa pequena região contendo 81 par de bases (pb) na zona central do gene *rpoB* (Theron *et al.*, 2012, Van Rie *et al.*, 2010).

#### IV. Tratamento

Segundo Duarte, “a terapêutica ideal da tuberculose combina as ações bactericidas, de prevenção de resistências e de esterilização dos diversos fármacos, devendo ser feita por um período de tempo suficientemente longo, de forma a evitar falências de tratamento e recaídas” (Duarte *et al.*, 2010a).

O esquema terapêutico tem evoluído com o aprofundamento dos conhecimentos da biologia do *Mtb*, do processo de infecção, surgimento de novos fármacos e também de resistências a estes. Em 1944, surge o primeiro fármaco que permite combater a tuberculose, a estreptomina. No entanto, após vários meses da sua utilização, surgem então os primeiros casos de resistência ao tratamento. Mais tarde, com a descoberta da isoniazida, surge então o primeiro esquema terapêutico, conjugando este tuberculostático com a rifampicina.

O tratamento para combater a tuberculose requer a utilização de diversos fármacos em simultâneo com uma elevada duração de tempo. Diversos estudos efetuados com a isoniazida, revelam que a sua administração durante 3, 6 ou 12 meses, diminuía o risco de evolução para doença em 21%, 65% e 75%, respetivamente (Duarte *et al.*, 2010b). O esquema habitual para o tratamento da maioria dos doentes com tuberculose (tabela 3) consiste no uso de antibióticos durante 6 meses, sendo que nos primeiros dois meses é usada em associação a isoniazida, rifampicina e a pirazinamida. Nos restantes quatro meses, apenas é utilizada a associação da isoniazida com a rifampicina (Duarte *et al.*, 2010a).

Fases do tratamento	Fármacos utilizados
<b>Primeira fase- 2 meses</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rifampicina</li> <li>• Isoniazida</li> <li>• Pirazinamida</li> </ul>
<b>Segunda Fase- 4 meses</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isoniazida</li> <li>• Rifampicina</li> </ul>

Tabela 3- Esquema de tratamento habitual para o combate da tuberculose (Duarte *et al.*, 2010a).

Com a combinação da pirazinamida e rifampicina na terapêutica, a duração do tratamento reduziu drasticamente, passando de uma média de 18-24 meses para 6 meses, isto em 1970. Hoje em dia, a rifampicina e a isoniazida são os principais fármacos utilizados, sendo o primeiro, responsável pela redução do tempo de tratamento (Loddenkemper *et al.*, 2002). Estudos da British Medical Research Council mostraram que, se a pirazinamida fosse incluída no tratamento durante os primeiros dois meses, a duração do tratamento podia ser reduzida para seis meses e ainda manter as taxas de sucesso igual ou superior a 95% ( Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council, 1991).

De acordo com a sua eficácia terapêutica e respetiva toxicidade, os antibióticos antituberculosos têm sido classificados em dois grupos: os antibióticos de primeira linha, sendo estes mais potentes e com toxicidade aceitável e os antibióticos de segunda linha, sendo estes menos potentes. São considerados antibióticos de primeira linha a rifampicina, isoniazida, etambutol, pirazinamida e a estreptomicina (Arbex *et al.*, 2010a).

A grande dificuldade no tratamento da tuberculose reside no aparecimento de estirpes resistentes à terapêutica implementada. Este aparecimento deve-se essencialmente à aplicação de uma terapêutica desadequada. Existem três tipos de resistências:

- a) **Monorresistente.** Consiste na resistência a um único fármaco de primeira linha.
- b) **Multirresistente (MDR-TB).** Consiste na resistência a dois fármacos de primeira linha, nomeadamente, à isoniazida e à rifampicina (Howard *et al.*, 2003).
- c) **Extensivamente resistente (XDR-TB).** Trata-se de estirpes resistentes pelo menos à isoniazida, rifampicina, à qualquer fluoroquinolona e, também, a um dos seguintes fármacos de segunda linha: amicacina, canamicina ou capreomicina (Howard *et al.*, 2003). O termo XDR-TB surgiu em março de 2006, tendo sido isolado em África do Sul em 53 indivíduos, dos quais apenas um sobreviveu (Wright *et al.*, 2006).

No entanto, em 2009, surge o primeiro caso de XXDR-TB ou TDR-TB no mundo, mais especificamente no Irão, tratando-se de estirpes resistentes a todos os antibióticos de primeira linha e a todos de segunda linha (Udwadia *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, o número de casos de tuberculose resistente à terapêutica tem crescido para valores anormais, representando assim uma grande ameaça à saúde pública (Loddenkemper et al., 2002). Aquando da descoberta da estreptomicina como primeiro antibiótico para o tratamento da tuberculose, a taxa de sucesso era elevada. No entanto, em alguns casos, o sucesso era acompanhado por recaídas devido ao aparecimento de estirpes resistentes à estreptomicina, concluindo-se então que a monoterapia não seria eficaz para o tratamento da tuberculose e que este tipo de estratégia foi responsável pelo aparecimento dos primeiros casos de resistências (Howard et al., 2003).

As estirpes de TB do tipo selvagem são aquelas que nunca tiveram expostas a antibióticos antituberculosos. No entanto, dentro dessas estirpes, verificou-se a existência de pequenas populações espontaneamente resistentes aos antibióticos (Curry, 2008):

- $3,5 \times 10^{-6}$  são resistentes à isoniazida;
- $1,2 \times 10^{-8}$  são resistentes à rifampicina;
- $3,1 \times 10^{-5}$  são resistentes ao etambutol;
- $3,8 \times 10^{-6}$  são resistentes à estreptomicina;

Sabendo que numa lesão da cavidade pulmonar pode alojar cerca de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^9$  bacilos, constata-se que com a utilização de apenas um antibiótico na terapêutica, a probabilidade de haver bacilos resistentes é elevada (Loddenkemper et al., 2002). Com apenas este tratamento, somente os bacilos suscetíveis irão ser combatidos, permanecendo os bacilos resistentes, originando uma melhoria imediata dos sintomas mas, também, uma recaída com menor taxa de sucesso do tratamento (Curry, 2008).

Erros médicos associados à prescrição da terapêutica (monoterapia) e ao cumprimento do tratamento também se encontram associados com o aparecimento de resistências. Por sua vez, o doente também desempenha um papel importante no aparecimento de tuberculose resistente à terapêutica pelo facto de não cumprir rigorosamente o esquema posológico e a duração do tratamento (Howard et al., 2003, Loddenkemper et al., 2002).

A propagação de MDR-TB deve-se a falhas nos programas de controlo (muitas vezes inexistentes), falta de recursos financeiros ou na identificação tardia das estirpes

resistentes. O facto de viver em pequenas comunidades, como em prisões, aumenta a probabilidade de propagação de estirpes de Mtb resistentes.

## **1. Antibióticos de primeira linha**

### **1.1 Rifampicina**

A rifampicina é um dos derivados semissintéticos da rifamicina, sendo esta produzida pela bactéria *Amycolatopsis mediterranei* e é utilizada como antibiótico desde 1966 (Arbex et al., 2010a).

A rifampicina inibe RNA polimerase, impedindo assim a transcrição nas células bacterianas suscetíveis. A rifampicina, ao ligar-se à subunidade  $\beta$  da holoenzima  $\alpha_2 \beta \beta'$   $\sigma$  (RNA polimerase) ou à subunidade  $\alpha_2 \beta$ , inibe a ação desta enzima, não ocorrendo a síntese de mRNA. Uma das características mais importantes da rifampicina é a sua lipofilia. Esta característica permite ao fármaco atravessar a parede celular e atingir elevadas concentrações intracitoplasmáticas nos fagócitos, obtendo um efeito bactericida. A rifampicina também atua em Mtb em estado de dormência (baixa atividade metabólica). Esta característica, associado ao eficácia da pirazinamida, permitiu encurtar a duração do tratamento de um ano para seis meses (Somoskovi *et al.*, 2001).

A monorresistência à rifampicina é rara, ocorrendo mais frequentemente associada a resistência à isoniazida. Assim, a resistência à rifampicina pode ser usada como marcador substituto para a identificação de MDR-TB (Somoskovi et al., 2001). O aparecimento de resistência à rifampicina deve-se a mutações numa pequena região contendo 81 par de bases (pb) (27 codões) na zona central do gene *rpoB* que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase. Mais de 96% de as estirpes resistentes à rifampicina contêm uma mutação na região contendo os 81 pb (Somoskovi et al., 2001). Esta região é denominada de região determinante de resistência à rifampicina (RRDR) podendo ser considerado uma boa abordagem para a deteção rápida de resistência à rifampicina e/ou MDR-TB (Somoskovi et al., 2001, Afanas'ev *et al.*, 2007). As mutações mais frequentes (65-86%) são observados nos codões Ser-531, His-526 e na Asp-516 (Afanas'ev et al., 2007). No entanto, nem todas as mutações nesta região apresentam o mesmo nível de resistência.

MIC de Rifampicina	Nº de estirpes (total: 40)	Nº de estirpes contendo alterações (total: 20)	Posição do aminoácido substituído (nº de estirpes)
>512	2	2	Asp-526 (1), Trp-531 (1)
512	6	6	Leu-531 (3), Pro-526 (2), Arg-526 (1)
256	1	1	Tir-516 e Asn-526 (1)
128	3	3	Leu-531 (2), Tir-516 (1)
64	1	1	Leu-531 (1)
32	1	0	
16	1	1	Leu-526 (1)
8	2	1	Gli-526 (1)
4	2	1	Val-516 (1)
2	0	0	
1	2	1	Pro-533 (1)
0,5	1	1	Pro-533 (1)
0,25	1	0	
0,125	1	0	
0,063	16	2	Val-515 (1), Leu-521 (1)

Tabela 4- Relação entre os diversos MIC da rifampicina e as alterações genéticas no gene *RpoB* (Ohno et al., 1996).

Por exemplo, as alterações nos codões 511, 516, 518 e 522 confere um baixo nível de resistência para a rifampicina e no seu derivado rifamicina (rifapentina), mas permanecem suscetíveis a duas outras rifamicinas (rifabutina e rifalazina) (Somoskovi et al., 2001, Almeida Da Silva e Palomino, 2011). Ohno, no seu estudo, relacionou as diversas mutações no gene *rpoB* com a suscetibilidade à rifampicina (Ohno et al., 1996). O MIC é definido como a concentração mínima de fármaco com capacidade de inibir o crescimento de uma população de bactérias superior a 99% (Hwang et al., 2003). Como se pode verificar na tabela 4, 13 estirpes que necessitavam de um MIC igual ou superior a 64 µg/mL, continham uma mutação pontual ou nos codões 516, 526 ou 531. As 21 estirpes que necessitaram de um MIC igual ou inferior a 1 µg/mL não tinham mutações nesses codões. Das seis estirpes que necessitavam de um MIC compreendido entre 2 e 32 µg/mL, três destas apresentavam mutações no codão 516 ou 526. Todas as sete estirpes contendo uma mutação pontual no codão 531 mostraram um fenótipo altamente resistente à rifampicina, necessitando de um MIC igual ou superior a 64 µg / ml. Estas estirpes também apresentavam resistência cruzada à isoniazida e ao etambutol (Ohno et al., 1996). Assim, pode-se verificar que as mutações nos codões 516, 526 e 531 são as mais importantes para a aquisição de resistência à rifampicina.

## 1.2 Isoniazida

A isoniazida (INH) surge como um dos mais importantes fármacos no tratamento da tuberculose. É utilizada como tal desde 1952. Esta é uma hidrazida do ácido isonicotínico obtido por síntese (Arbex et al., 2010a).

Relativamente ao mecanismo de ação, a isoniazida possui ação tuberculostática contra os bacilos em repouso e ação bactericida contra os bacilos em multiplicação. A isoniazida atua contra os bacilos intracelulares nos fagócitos e nas lesões caseosas, onde o pH nessa região é ácido (Somoskovi et al., 2001).

A isoniazida é um pró-fármaco, pelo que necessita de ser ativada para possuir atividade antibacteriana. Esta ativação é realizada pela enzima catalase peroxidase codificada pelo gene *KatG*. A ativação da isoniazida mediada pela enzima leva a produção de diversas espécies altamente reativas que atacam diversos alvos do *Mtb*. O principal alvo de inibição da isoniazida é a enzima codificada pelo gene *inhA*. Como já foi referido anteriormente, esta enzima encontra-se envolvida na síntese das cadeias longas dos ácidos micólicos. As espécies reativas (radical acil-isonicotínico e o seu anião) provenientes da ativação da isoniazida reagem com o NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido hidreto) formando um inibidor competitivo para, de seguida inibir a enzima enoil-acil redutase (Zhang e Yew, 2009).

Middlebrook, na década de 1950, verificou que as estirpes resistentes à isoniazida tinham perdido a atividade da enzima catalase-peroxidase. No entanto, a associação desta enzima com a ativação da isoniazida só foi comprovada na década de 1990, quando o gene *KatG* foi clonado e sequenciado (Rouse *et al.*, 1996). Estudos revelam que 50-95% das estirpes resistentes à isoniazida apresentam mutações no gene *KatG*, tratando-se de mutações missense em que há substituição de um único aminoácido (Zhang e Yew, 2009). Existem diversos tipos de mutações neste gene, no entanto, realça-se a mutação Ser315Thr, presente em 40% das estirpes resistentes à isoniazida (Marttila *et al.*, 1998). Esta mutação consiste na incapacidade da enzima em ativar a isoniazida. No entanto, a enzima catalase-peroxidase ainda consegue obter 50% da sua atividade. Assim, a alteração da catalase-peroxidase impõe um elevado nível de resistência à isoniazida, permitindo também, proteção contra o stress oxidativo, sendo este suficiente para o organismo permanecer livre da ação das espécies reativas (Zhang e Yew, 2009, Rouse et al., 1996).

A isoniazida inibe, também, outra enzima envolvida na síntese de ácidos micólicos, a enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase codificada pelo gene *Kasa*. Esta enzima é responsável pela alongação das cadeias dos ácidos micólicos fazendo parte do conjunto de enzimas da fase II da síntese de ácidos micólicos (Swanson *et al.*, 2009). As mutações ocorrem mais frequentemente na região promotora dos genes que codificam estas proteínas.

A enzima alquilo hidroxidase redutase (*ahpC*) também desempenha um papel importante na resistência do *Mtb* à isoniazida, uma vez que se encontra envolvida na regulação celular do stress oxidativo (Dalla Costa *et al.*, 2009). Esta mutação leva a um aumento da expressão da respectiva enzima (Zhang e Yew, 2009).

### **1.3 Pirazinamida**

A pirazinamida é um derivado do ácido nicotínico, com uma estrutura molecular similar à da isoniazida. A pirazinamida foi sintetizada em 1936 e é utilizada como tuberculostático desde 1952 (Arbex *et al.*, 2010a).

A pirazinamida possui atividade bactericida, cujo mecanismo molecular de ação não se encontra bem esclarecido (Arbex *et al.*, 2010a). A pirazinamida possui atividade contra populações bacteriana em estado de semi-dormência que persistem num ambiente com pH relativamente baixo (pH=5), como no interior dos fagossomas dos macrófagos infetados e nas lesões caseosas, ou seja, apenas possui atividade bactericida em meio ácido (Scorpio *et al.*, 1997). A pirazinamida possui uma maior atividade esterilizante contra microrganismos intracelulares que contra os extracelulares (Arbex *et al.*, 2010a).

Tal como a isoniazida, a pirazinamida também necessita de ser convertida na sua forma ativa, o ácido pirazinóico, através da ação da enzima bacilar pirazinamidase, codificada pelo gene *pncA*.

Como referido anteriormente, o mecanismo de ação não se encontra bem esclarecido, no entanto, pensa-se que a conversão da pirazinamida em ambiente citoplasmático neutro origina ácido pirazinóico neutro, que não possui atividade antibacteriana. De seguida, esta molécula é excretada através de bombas de efluxo para o exterior da célula e, em condições ácidas, o ácido pirazinóico é convertido na sua forma protonada. De seguida, esta molécula entra no interior da célula e atinge concentrações intracelulares elevadas devido a uma ineficácia em excretar este

metabolito ativo para o exterior da célula (Zhang e Mitchison, 2003). A acumulação do ácido pirazinóico faz com que haja uma diminuição do pH intracelular, inativando

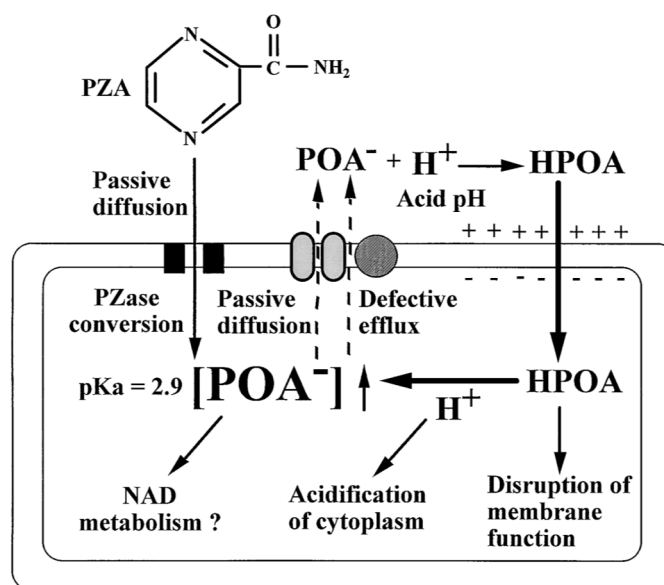


Figura 10- Mecanismo ação da pirazinamida. Legenda: POA-Ácido pirazinóico; HPOA- Ácido pirazinóico protonado; NAD- Nicotinamida adenina dinucleótido (Zhang e Mitchison, 2003).

assim algumas enzimas essenciais à produção de ácidos gordos e consequentemente, à biossíntese do ácido micólico (Arbex et al., 2010a). A figura 10 demonstra o mecanismo de ação da pirazinamida.

A resistência à pirazinamida deve-se essencialmente a mutações no gene *pncA*. Diversos estudos tem demonstrado que a perda da atividade da enzima pirazinamidase se encontra associada com a resistência à pirazinamida. Algumas estirpes de *Mtb* e *M. bovis* resistentes à pirazinamida ainda apresentam alguma suscetibilidade ao ácido pirazinóico, sugerindo que a resistência à pirazinamida deve-se a alterações da atividade da pirazinamidase devido a mutações no gene *pncA*, ou também do respetivo gene regulador. As mutações são na maioria das vezes missense, havendo substituição de aminoácidos. No entanto, podem surgir casos de ocorre inserções, deleções de nucleótidos ou mutações nonsense no gene estrutural *pncA*. As mutações encontram-se dispersas ao longo do gene *pncA*. No entanto, realçam-se três regiões com maior número de mutações: 3-17pb, 61-85pb e 132-142pb. Estas regiões correspondem a três dos quatro loops existentes que codificam o local ativo da enzima (Zhang e Mitchison, 2003).

Os inúmeros tipos de mutações sugerem que o gene *pncA* não é essencial à vida da micobactéria. Não havendo pressão seletiva, diversos tipos de mutações podem surgir. De acordo com esta possibilidade, a pirazinamidase é dispensável, não interferindo com a virulência da micobactéria (Zhang e Mitchison, 2003).

#### 1.4 Etambutol

O etambutol foi sintetizado em 1961 e é utilizado no tratamento da tuberculose desde 1966 (Arbex et al., 2010a).

Possui atividade bacteriostática, sendo apenas ativo contra bactérias em crescimento. O etambutol interfere na síntese de arabinogalactano, principal polissacarídeo da parede celular do *Mtb*. O etambutol atua inibindo a enzima arabinosil transferase codificada pelo gene *emb*, responsável pela polimerização de arabinose para arabinogalactano (Arbex et al., 2010a). Estudos vieram revelar a existência de três

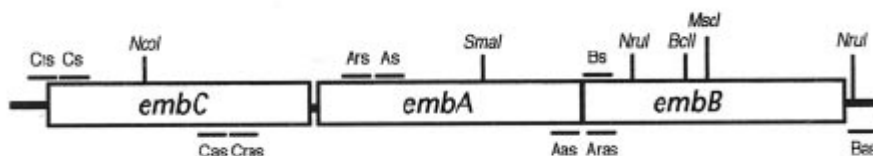


Figura 11- Gene *embCAB* (Hazbon et al., 2005).

genes presentes no operão *emb*, o gene *embA*, *embB* e *embC*, surgindo assim o gene *embCAB* (figura 11) (Hazbon et al., 2005).

Um estudo desenvolvido por Hazbon, permitiu diferenciar as funções dos diversos genes presentes no operão *emb* utilizando o *Mycobacterium smegmatis* (figura 12). A inibição do gene *embB* permitiu verificar alterações na morfologia (mais pequeno, distorcido) e na acumulação de inclusões citoplasmáticas. A inibição do gene *embB* permitiu verificar uma redução do tamanho mais significativo. A inativação do *embC* permitiu verificar, também, uma diminuição do tamanho. Neste estudo, verificou-se também que a inibição do operão bem resultou na perda de resistência da micobactéria ao ácido e aumento da sensibilidade aos fármacos hidrofóbicos, como a rifampicina (Hazbon et al., 2005).

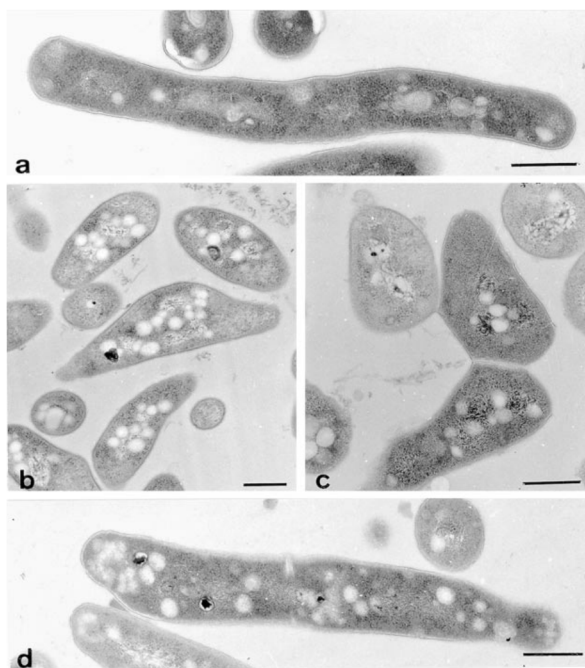


Figura 12- Aspeto morfológico do *M. smegmatis*. Legenda: a) *M. smegmatis*; b) com *embA* inibida; c) *M. smegmatis* com *embB* inibida; d) *M. smegmatis* com *embC* inibida. Barra: 0,5 $\mu$ m (Hazbon et al., 2005).

Quanto à resistência, diversos estudos sugerem que o operão *embCAB* se encontra envolvido na resistência ao etambutol. As mutações no códon 306 do gene *embB* (*embB306*) surgem em cerca de 30 a 68% de todos os casos de estirpes resistentes ao etambutol. Como tal, o gene bem tem sido utilizado como marcador para a identificação de estirpes resistentes ao etambutol. No entanto, têm surgido estirpes de *Mtb* com mutações no gene *embB306* sensíveis ao etambutol, representando cerca de 46% do total de estirpes com mutações no gene *embB306*. Safi, no seu estudo, refere que uma mutação no gene *embB306* não é suficiente para produzir estirpes com elevado nível de resistência ao etambutol, uma vez que confere apenas um pequeno aumento na MIC, havendo necessidade diversos passos para provocar várias mutações de forma a adquirir um elevado nível de resistência. No entanto, esta única mutação pode afetar a suscetibilidade a vários antibióticos (isoniazida e rifampicina), contribuindo assim para a formação de estirpes MDR (Safi et al., 2008).

## 2. Antibióticos de segunda linha

Os antibióticos de segunda linha são apenas utilizados quando se está perante uma estirpe resistente a um ou a vários antibióticos de primeira linha. Sendo assim, a tuberculose multirresistente é aquela que apresenta resistência à isoniazida e rifampicina, ou à rifampicina, isoniazida e a pelo menos outro fármaco de primeira linha (Arbex *et al.*, 2010b).

### 2.1 Etionamida

A etionamida é um antibiótico bacteriostático e atua nos bacilos intra e extracelulares (Arbex *et al.*, 2010b). Esta é utilizada no tratamento da tuberculose desde 1956 como droga de segunda linha.

Trata-se de um pró-fármaco com estrutura semelhante à isoniazida, no entanto sem resistência cruzada com a mesma, uma vez que estirpes contendo *Mtb* com resistência à isoniazida por alterações do gene *katG* permanecem suscetíveis à etionamida, confirmando assim, que as enzimas responsáveis pela ativação da isoniazida e da etionamida são diferentes. Estudos revelaram a existência de dois genes responsáveis pela ativação da etionamida, os genes *ethA* e *ethR*. A expressão do gene *ethA* resulta na formação de uma enzima monooxigenase EthA contendo um FAD, sendo este importante para a ativação da etionamida. A expressão do gene *ethR* resulta na formação da enzima repressora EthR que regula a expressão do gene *ethA*. Esta enzima apresenta semelhanças à família de reguladores de transcrição TetR e é responsável pela regulação da expressão do gene *ethA* (Dover *et al.*, 2004, Morlock *et al.*, 2003). Um aumento da expressão do gene *ethR* leva à resistência da etionamida. Por sua vez, uma inibição da sua expressão leva à sensibilidade da micobactéria à etionamida (Dover *et al.*, 2004).

Como referido anteriormente, a ativação da isoniazida produz um radical acilo isonicotínico que reage com NADH, formando um inibidor competitivo da InhA. Em contraste com o mecanismo de ação da isoniazida, os mecanismos moleculares que conduzem à inibição da enzima por parte da etionamida ativada ainda se encontram pouco esclarecidos. No entanto, pensa-se que os metabolitos provenientes da ativação da etionamida inibem a enzima InhA (Hanouille *et al.*, 2006). Vanelli, no seu estudo, verificou que a enzima EthA é uma enzima bi-funcional que converte (com pouca eficiência) a etionamida no seu derivado S-óxido (ETH-SO) e hidroxilo (ETH-OH),

concentrando-se no exterior da célula (figura 13) (Vannelli *et al.*, 2002). O ETH-SO possui toxicidade para as bactérias e a sua MIC varia de acordo com os níveis de EthA na micobactéria (Hanouille *et al.*, 2006). Ainda nesse estudo, Verificou-se, in-vitro, que a enzima EthA possui ainda capacidade para converter o metabolito ETH-SO em outro metabolito ETH\*, possuindo igualmente toxicidade (Vannelli *et al.*, 2002).

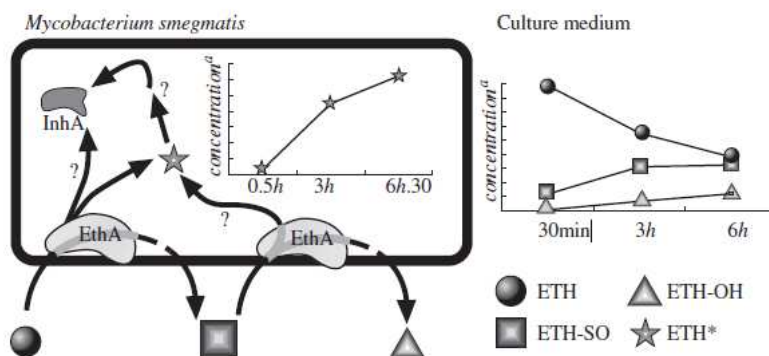


Figura 13- Mecanismo de ação da Etionamida (Hanouille *et al.*, 2006).

A resistência à etionamida ocorre geralmente devido a mutações na enzima EthA. No entanto, podem ocorrer mutações que levam à resistência cruzada com a isoniazida, nomeadamente, mutações na enzima InhA ou na região promotora que causam aumento da expressão do gene *inhA*, levando a uma maior quantidade da enzima InhA no interior da célula. Mutações no gene regulador da expressão *ethR* levam à resistência à etionamida (Brossier *et al.*, 2011).

## 2.2 PAS

O PAS ou ácido para-aminossalicílico é utilizado como tuberculostático desde 1946, tendo sido descontinuado pouco depois devido aos diversos efeitos adversos e à introdução da rifampicina e pirazinamida no tratamento da tuberculose. Com o aparecimento de elevado número de casos de tuberculose multirresistente, o PAS foi novamente introduzido na terapêutica em 1992 (Mathys *et al.*, 2009).

O PAS possui semelhanças estruturais com as sulfonamidas. Estas são análogas estruturais do ácido para-aminobenzóico, substrato da dihidropteroato sintase (codificado pelo gene *folP1/folP2*), pelo que o PAS é considerado um inibidor competitivo desta enzima. As enzimas FolP1 e FolP2 catalisam a condensação do ácido

para-aminobenzóico e 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina a 7,8-dihidropteroato, que é convertido em dihidrofolato e reduzido para gerar o cofator tetrahidrofolato (THF) pela enzima tetrahidrofolato redutase (codificada pelo gene *dfrA*) na via metabólica do ácido fólico. Esta via permite a síntese de ácido fólico bacilar que é essencial para a síntese e reparação do DNA da micobactéria (figura 14) (Arbex et al., 2010b, Mathys et al., 2009).

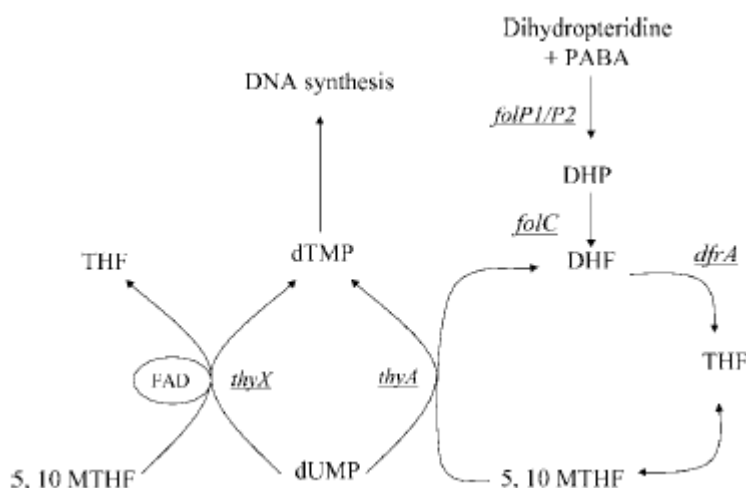


Figura 14- Via metabólica do ácido fólico e prováveis locais alvo do PAS (Mathys et al., 2009).

O PAS só se encontra ativo na presença da enzima ThyA, pelo que é considerado, tal como alguns outros antibacterianos, uma pródroga (Mathys et al., 2009).

Quanto ao aparecimento de resistências, estas ocorrem essencialmente devido a alterações de genes que codificam enzimas essenciais para a via metabólica do ácido fólico. Estes genes são o *thyA*, *dfrA*, *folC*, *folP1*, e o *folP2*. Estas mutações resultam na alteração tridimensional das enzimas, impedindo a ligação do PAS a estas (Mathys et al., 2009). Rengarajan, no seu estudo, demonstrou que na maioria dos casos de resistência ao PAS encontra-se associado a mutações do gene *thyA* que codifica a enzima timidilato-sintase A. Esta enzima é importante para a biossíntese de timina pela via metabólica do ácido fólico (com necessidade de THF como cofator) (Rengarajan et al., 2004).

### 2.3 Aminoglicosídeos

Neste grupo insere-se a estreptomicina, a amicacina e a canamicina.

A estreptomicina, isolada em 1944, foi o primeiro fármaco eficaz utilizado no tratamento da tuberculose. Mais tarde, foi sintetizada a canamicina em 1957 e em 1972, surge a amicacina, composto semissintético derivado da canamicina (Arbex et al., 2010b).

Relativamente ao mecanismo de ação, os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica ao ligar-se de forma irreversível à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, interferindo com a tradução (Sousa, 2006).

A maioria das resistências encontra-se associada a mutação A1401G do gene *rrs*, que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal. Esta mutação também confere resistência à capreomicina. Também surgem mutações no gene *rpsL*, ocorrendo mutação Lis-43-Arg na proteína ribossomal S12 (Arbex et al., 2010b, Alangaden *et al.*, 1998). Um estudo desenvolvido por Zaunbrecher revelou a existência de mais um mecanismo de resistência à canamicina. Este mecanismo consiste em mutações pontuais na região promotora do gene *eis*, sendo este responsável pela sobrevivência intracelular da micobactéria. Estas mutações na região promotora provoca um aumento da expressão do gene *eis*, e conseqüentemente, um aumento dos níveis de uma enzima (Eis) que acetila e inativa a canamicina. Este mesmo estudo revela que as estirpes com esta mutação são suscetíveis à amicacina. A ausência desta resistência cruzada deve-se a diferenças estruturais entre os dois fármacos, em que a amicacina possui um grupo amida L-hidroxiaminobuteriol de substituição na posição N1 do anel desoxistreptamina, que dificulta a acetilação pela enzima Eis (Zaunbrecher *et al.*, 2009).

### 2.4 Capreomicina

Antibiótico polipeptídico macrocíclico obtido a partir da bactéria *Streptomyces capreolus* e utilizado como tuberculostático desde 1959. A capreomicina possui uma estrutura química diferente dos aminoglicosídeos. No entanto, existe semelhanças relativamente à atividade antibacteriana e aos efeitos adversos. Não apresenta resistência cruzada com estreptomicina, contudo, pode acontecer com algumas estirpes resistentes à amicacina e canamicina (Arbex et al., 2010b).

Quanto ao mecanismo de ação, este não se encontra bem esclarecido. No entanto, pensa-se que atua da mesma forma que os aminoglicosídeos. Um estudo revelou que, *in vitro*, a capreomicina inibe a síntese de fenilalanina, interferindo assim com a tradução, mas que não interfere com a ligação do mRNA ao ribossoma (Maus *et al.*, 2005).

O aparecimento de resistências à capreomicina deve-se a mutações do gene *tlyA*. Este gene codifica a enzima rRNA metiltransferase essencial para a metilação da ribose em rRNA ribossomal. Como já foi referido anteriormente, a mutação A1401G do gene *rrs* também confere resistência à capreomicina, evidenciando a existência de resistência cruzada entre os aminoglicosídeos e a capreomicina (Maus *et al.*, 2005, Almeida Da Silva e Palomino, 2011).

### 2.3 Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas têm sido o centro de grande interesse científico e clínico desde da descoberta do ácido nalidíxico na década de 1960 (Andersson e MacGowan, 2003).

Data	Quinolona
1960-1969	Ácido nalidixico
1970-1975	Cinoxacina
1975-1985	Norfloxacina
1985-1990	Ciprofloxacina, ofloxacina
1990-1995	Temafloxacina, sparfloxacina
1995-2000	Grepafloxacina, levofloxacina, trovafloxacina
2000-2005	Moxifloxacina, gemifloxacina, garenoxacina

Tabela 5- Cronologia de entrada das quinolonas no mercado do Reino Unido (Andersson e MacGowan, 2003)

O uso de fluoroquinolonas têm sido mencionadas como excelente alternativa para o tratamento de estirpes de *Mtb* resistentes aos antibióticos de primeira linha, uma vez que, após a sua administração, estes distribuem-se amplamente no organismo, incluindo no interior das células, mais especificamente nos macrófagos (apresentam elevada lipossolubilidade) (Arbex *et al.*, 2010b). Estudos recentes demonstraram que as fluoroquinolonas tem potencial para encurtar o tratamento da tuberculose (Rustomjee *et al.*, 2008). Neste grupo, os antibióticos mais efetivos contra o *Mtb* são a moxifloxacina e a gatifloxacina, seguindo-se da levofloxacina, da ofloxacina e da ciprofloxacina. As

fluoroquinolonas não apresentam resistência cruzada com outros antibióticos (Arbex et al., 2010b).

O mecanismo de ação das fluoroquinolonas consiste na inibição da atividade da enzima DNA girase ou da topoisomerase II bacteriana, interferindo com a replicação, transcrição e reparação do DNA. Esta enzima é constituída por duas subunidades, a subunidade A e B, importantes para o funcionamento da enzima. A primeira possui o centro ativo para o desdobramento, rutura e junção do DNA e a segunda promove a hidrólise de ATP. As subunidades A e B são codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respetivamente (Von Groll *et al.*, 2009).

Grande parte das mutações ocorrem no gene *gyrA*, principalmente nos codões 90, 91 e 94. Esta região é denominada de região de determinação de resistência às quinolonas (QRDR, do inglês, quinolone resistance-determining region) (Devasia *et al.*, 2012, Lau *et al.*, 2011). Menos frequentemente surgem mutações no gene *gyrB*, sendo a mais importante a mutação Asn-533-thr. Esta mutação confere resistência à moxifloxacina e gatifloxacina mas não à ofloxacina. Este facto deve-se, provavelmente, a diferenças estruturais das moléculas, em que a moxifloxacina e gatifloxacina possuem o derivado metoxi na posição C-8 ou metil na posição C-7 do anel de piperazina, ausentes na molécula de ofloxacina (Von Groll *et al.*, 2009).

### 3. DOTS

A OMS declarou a tuberculose como uma emergência de saúde pública mundial, em 1993. Como tal, a meio da década de noventa, a OMS desenvolveu uma estratégia que visa reduzir o número de casos infetados em todo o mundo. Para tal, desenvolveram a estratégia DOTS, sigla proveniente do inglês (Directly Observed treatment short-course) que significa tratamento diretamente observado de curta duração. Esta estratégia baseia-se em cinco pilares:

1. Compromisso político e financeiro;
2. Detecção dos casos e sua confirmação através de exames bacteriológicos;
3. Padronização dos tratamentos de curta duração com a introdução da estratégia DOT (toma diretamente observada);
4. Fornecimento regular dos fármacos;
5. Um sistema padronizado de recolha de dados que permite a avaliação dos doentes, quanto aos seus desempenhos no tratamento.

Com a aplicação desta estratégia, a OMS pretende combater eficazmente a tuberculose, tratando a infeção, impedindo o aparecimento de casos de resistência e de propagação. Em apenas uma década, quase todos os países implementaram a estratégia DOTS, resultando num enorme progresso relativamente às metas globais estabelecidas para 2005: Detecção de 70% do número de casos estimados e sucesso no tratamento em 85% dos casos (WHO, 2010).

## V. Novos fármacos

Com a problemática das resistências, surge a necessidade de delinear novas estratégias de forma a combater mais eficazmente a tuberculose. Como se pode verificar na figura 6, tem surgido um esforço para a descoberta de novas moléculas, manipulação dos fármacos já existentes no sentido de aumentar a sua eficácia e na diminuição da toxicidade no tratamento da tuberculose. Também tem havido grande esforço na descoberta de novos alvos/recetores para futuros antibióticos (tabela 6).

Molécula	Ano de descoberta	Classe química	Alvo	Estado de desenvolvimento	Laboratório
<b>Fluoroquinolonas</b>	1970	Fluoroquinolonas	DNA girase topoisomerase II	Fase III- ensaios clínicos	Vários
<b>TMC-207</b>	2005	Diarilquinolonas	Subunidade c da ATP sintase	Fase II- ensaios clínicos	J&J Tibotec e TB Alliance
<b>PA824</b>	2000	Nitroimidazois	Biossíntese ácido micólico	Fase II- ensaios clínicos	TB Alliance
<b>OPC67683</b>	2006	Nitroimidazois	Biossíntese ácido micólico	Fase II- ensaios clínicos	Otsuka
<b>SQ109</b>	2004	Etilenodiamina	Não definido	Fase I/II- ensaios clínicos	Sequella
<b>Linezolida</b>	2005	Oxazolidinonas	Subunidade 50s ribossomal	Fase II- ensaios clínicos	Pfizer
<b>PNU-100480</b>	2010	Oxazolidinonas	Subunidade 50s ribossomal	Fase I- ensaios clínicos	Pfizer
<b>AZD5847</b>	2009	Oxazolidinonas	Subunidade 50s ribossomal	Fase I- ensaios clínicos	AstraZeneca
<b>Benzotiazinona</b>	2009	Bezotiazinonas	DprE1 epimerase	Fase pré-clínica	Alere
<b>Dinitrobenzamida</b>	2009	Dinitrobenzamidas	DprE1 epimerase	Fase pré-clínica	nenhum
<b>VI-9376</b>	2010	Nitro-bromoquinoxalina	DprE1 epimerase	Fase pré-clínica	Vichem

Tabela 6- Principais moléculas em estudo para o combate da tuberculose. (Cole e Riccardi, 2011).

## 1. Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas tem evoluído muito desde da sua descoberta. Como o passar dos anos, tem-se manipulado a molécula original (figura 15) de forma a obter um

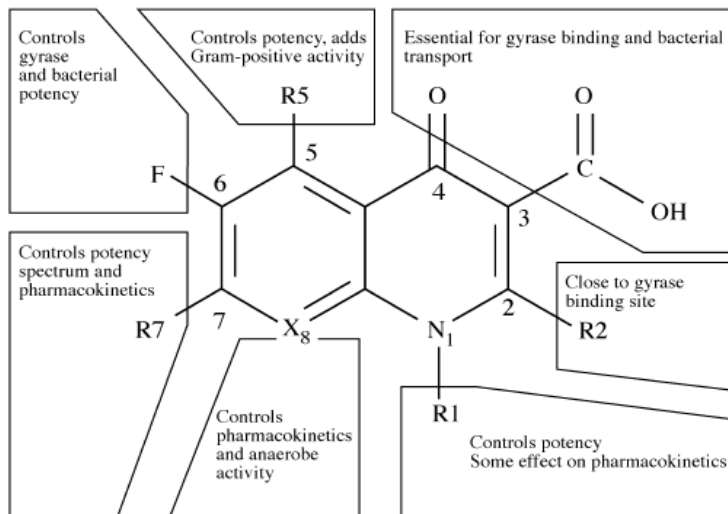


Figura 15- Estrutura básica das quinolonas (Andersson eMacGowan, 2003).

antibiótico mais eficaz no combate, com uma menor toxicidade para o indivíduo e com maior comodidade na toma. As modificações na estrutura básica das quinolonas (figura 8) permitiram a descoberta de novos antibióticos com maior espectro de atividade, maior potência antibacteriana e melhor biodisponibilidade (Andersson e MacGowan, 2003).

Deste grupo, os fármacos mais recentes são a moxifloxacina e a gatifloxacina. Estes, tal como foi referido anteriormente, apresentam elevada eficácia no tratamento da tuberculose (Arbex et al., 2010b).

## 2. Bedaquilina (TMC-207)

Este fármaco foi aprovado pela agência americana do medicamento FDA (do inglês, food and drug administration) no dia 31 de Dezembro de 2012 (Rubinstein e Keynan, 2013). A bedaquilina destina-se ao tratamento de tuberculose multirresistente em associação com outros fármacos antituberculosos. Relativamente ao mecanismo de ação, a bedaquilina inibe a enzima micobacteriana ATP sintase (Ma *et al.*, 2010). A bedaquilina permite reduzir significativamente o tempo de conversão para uma expectoração com exame cultural negativo, diminuindo assim a probabilidade de transmissão da infeção (Rubinstein e Keynan, 2013).

### 3. Nitroimidazóis

Neste grupo inserem-se duas novas drogas, o PA-824 e o OPC-67683 (também conhecido por delamanida). O Pa-824 necessita de ser ativada pela enzima micobacteriana glucose-6-fosfato desidrogenase (FDG1) ou pelo seu cofator, a coenzima F<sub>420</sub>. Quanto ao mecanismo de ação, O PA-824 inibe a síntese proteica e dos lípidos da parede celular. A atividade deste fármaco encontra-se limitada ao *Mycobacterium complex*. Apesar de não existir resistência cruzada com outros fármacos, mutações nos genes *fbiA*, *fbiB* e *fbiC* (genes responsáveis pela síntese da coenzima F<sub>420</sub>), conferem resistência ao PA-824. Este fármaco tem demonstrado elevada eficácia em infecções no estado latente. Relativamente à delamanida, esta inibe a síntese de ácidos micólicos e apresenta melhor atividade esterilizante que a isoniazida (van den Boogaard *et al.*, 2009, Ma *et al.*, 2010).

### 4. SQ-109

Trata-se de um derivado do etambutol, no entanto apresenta diferenças quanto ao mecanismo de ação. O SQ-109 liga-se a um transportador transmembranar MmpL3 (codificado pelo gene *mmpL*) que impede a ligação do ácido micólico com o arabinogalactano da parede celular, não interferindo com a síntese de ácidos micólicos (Tahlan *et al.*, 2012). O SQ-109 é mais bem tolerado do que o etambutol, pelo que poderá, futuramente, substituir este último (van den Boogaard *et al.*, 2009).

### 5. Sudoterb (LL-3858)

O sudoterb apresenta atividade bactericida semelhante à isoniazida e sinergismo com a rifampicina. Um estudo efetuado com ratos evidenciou que uma terapêutica com sudoterb em combinação com rifampicina e pirazinamida curou a tuberculose em todos os animais ao fim de três meses (Lee e Krilov, 2006).

### 6. Benzotiazinona (BTZ043)

A benzotiazinona é um novo fármaco que inibe a síntese da parede celular. A benzotiazinona inibe a enzima DprE1 responsável pela conversão do decaprenilfosforil ribose a decaprenilfosforil arabinose para incorporação na parede celular (Lamichhane,

2010). A benzotiazinona apresenta um MIC relativamente baixo, apresentando assim, baixa toxicidade (Batt *et al.*, 2012).

## 7. Oxazolidinonas

Neste grupo encontra-se a linezolida. Este fármaco inibe a síntese proteica através da sua ligação à subunidade 50S ribossomal, mais especificamente, no centro peptidiltransferase, bloqueando assim a ligação do tRNA ao ribossoma. A linezolida tem sido utilizada em combinação com outros antibióticos para o tratamento da tuberculose multi e extensivamente resistente. No entanto, tem sido descrito diversos efeitos adversos, nomeadamente, neurotoxicidade e mielossupressão. Apesar deste antibiótico apresentar uma elevada eficácia, têm sido descritos casos de resistência. Estas devem-se à mutação do gene *rplC* (que codifica proteínas ribossomais) (Beckert *et al.*, 2012, Ma *et al.*, 2010). Neste grupo, também se encontra o PNU-100480, um análogo da linezolida. Este fármaco tem demonstrado maior atividade contra a tuberculose do que a linezolida e apresenta um MIC 3,2 vezes inferior (Alffenaar *et al.*, 2011). Outro fármaco deste grupo, o AZD-5847, também tem demonstrando uma boa eficácia e menor toxicidade (Grosset *et al.*, 2012).

## VI. Novos locais alvo

Com a recente preocupação na descoberta de novos fármacos para combater a tuberculose, torna-se também importante a descoberta de novos locais alvo. A sequenciação do genoma do *Mtb* permitiu identificar novos alvos essenciais à sobrevivência do *Mtb* (figura 16).

Diversos estudos identificaram novos possíveis alvos, incluindo o metabolismo da parede celular, respiração celular e a síntese proteica.

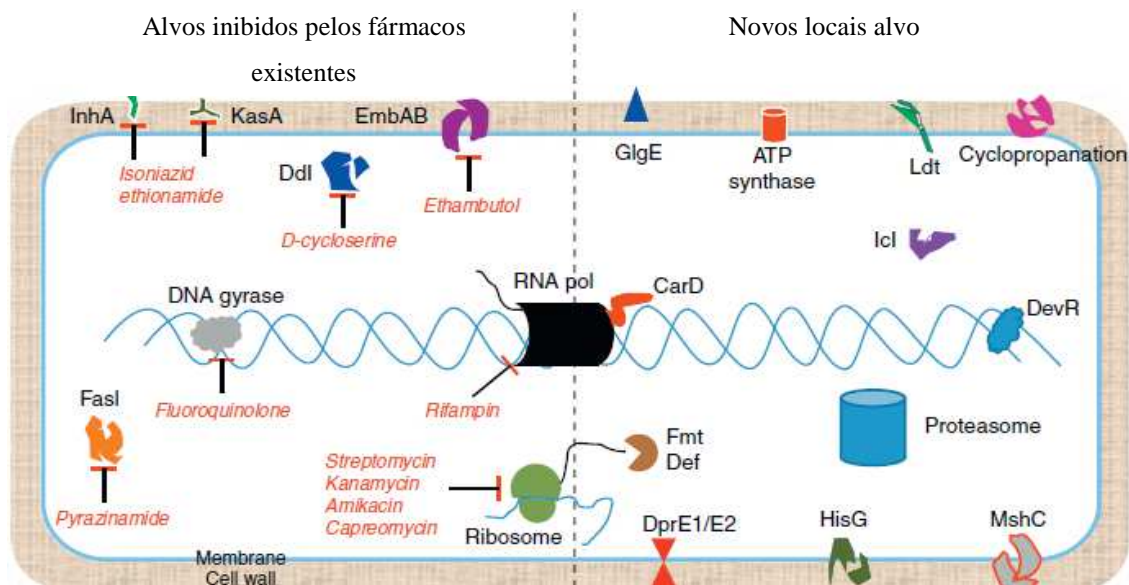


Figura 16- Novos locais-alvo identificados em fase de estudo (Lamichhane, 2010).

## 1. Maltosiltransferase

A maltosiltransferase (GlgE) é uma enzima essencial para o metabolismo da maltose. A inibição desta enzima resulta na acumulação de maltose-1-fosfato no interior da célula, culminando na inibição da respiração celular e morte da micobactéria (Lamichhane, 2010).

## 2. Ciclopropanação

A ciclopropanação consiste numa modificação fisiológica realizada por oito enzimas S-adenosilmetionina ácido micólico transferase (MAMTs) nas moléculas de ácidos micólicos, através da introdução de um anel de ciclopropano, metilação das ramificações e oxigenação. Estas enzimas têm capacidade de atenuar a proliferação e persistência do *Mtb* nos pulmões, mas também aumentar a virulência do *Mtb*. Um estudo revelou que a dioctilamina possui propriedades bacteriostáticas, uma vez que têm capacidade de inibir a enzima ácido micólico metiltransferase Cma2 e assim inibir a ciclopropanação e metilação dos ácidos micólicos (Barkan *et al.*, 2012, Lamichhane, 2010).

### **3. *MshC***

A enzima codificada pelo gene *MshC* apresenta uma grande importância para o crescimento do *Mtb*. Esta enzima, a micotiol ligase catalisa a penúltima etapa da biossíntese de micotiol. Estudos revelaram que o cloreto de dequalínio possui capacidade para inibir esta enzima, tornando-se num potencial fármaco para o combate da tuberculose (Lamichhane, 2010).

### **4. Fosforilribosiltransferase**

A histidina é um aminoácido essencial para o *Mtb*. A enzima ATP fosforilribosiltransferase (HisG) é responsável pela primeira etapa da biossíntese deste aminoácido. A inibição da enzima compromete a biossíntese da histidina, pelo que é considerado um excelente local alvo. Um estudo realizado por Cho demonstrou a existência de dois compostos derivados do nitrobenzotiazol capazes de inibirem a enzima HisG (Cho *et al.*, 2008).

## VII. Conclusão

Apesar do declínio, a tuberculose continua com elevada taxa de mortalidade. O seu controlo baseia-se numa identificação e tratamento rápido e eficaz.

Um método de diagnóstico ideal teria de identificar a presença de *Mtb* diretamente da amostra, evitando assim, o tempo de demora do exame cultural. Nos últimos anos, a comunidade científica têm-se esforçado para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico da tuberculose com maior sensibilidade, especificidade e rapidez. No entanto, estes novos testes apresentam uma importante desvantagem: o custo, inviabilizando a sua utilização nos países pobres, onde a taxa de incidência ainda se encontra elevada.

Na viragem do século XX para o XXI, e por culpa do Homem (tratamentos mal prescritos, deficiente qualidade dos fármacos e má adesão por parte dos doentes, ao longo dos anos), desenvolveu-se a maior ameaça de sempre da tuberculose, a tuberculose multirresistente. Os fármacos utilizados para o tratamento da tuberculose multirresistente são geralmente menos eficazes, mais tóxicos e mais dispendiosos do que os fármacos do esquema terapêutico básico. Estas características tornam o tempo de tratamento mais longo, com custo superior e com maior probabilidade de não adesão ao tratamento por parte do doente. Com esta problemática, o arsenal disponível para o tratamento da tuberculose multirresistente tem diminuindo drasticamente, uma vez que praticamente todos os fármacos aprovados apresentam casos de resistência.

Embora estimulada pelos governos e organizações não-governamentais, o recente interesse pela indústria farmacêutica tem resultado em efeitos muito promissores com a descoberta de novos fármacos capazes de combater estirpes de *Mtb* multirresistentes e de novos locais alvo como base para o desenvolvimento de novas moléculas. Os novos fármacos apresentam resultados muito positivos, uma vez que atuam em locais alvo ainda não explorados pelos fármacos convencionais. No entanto, estes novos fármacos terão de ser utilizados com muita cautela de maneira a não ocorrer o aparecimento de resistência a estes novos fármacos.

Por fim, o maior desafio do combate da tuberculose será ultrapassar os obstáculos sociais e económicos de forma a garantir o acesso adequado aos fármacos antituberculosos para toda a população mundial.

### VIII. Bibliografia

- Afanas'ev, M. V. *et al.* (2007). Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation. *J Antimicrob Chemother*, 59, pp. 1057-1064.
- Alangaden, G. J. *et al.* (1998). Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, pp. 1295-1297.
- Alffenaar, J. W. *et al.* (2011). Susceptibility of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates to a potentially less toxic derivate of linezolid, PNU-100480. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, pp. 1287-1289.
- Almeida Da Silva, P. E. e Palomino, J. C. (2011). Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, pp. 1417-1430.
- Andersson, M. I. e Macgowan, A. P. (2003). Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother*, 51 Suppl 1, pp. 1-11.
- Antunes, A. F. (2011). Ponto da Situação Epidemiológica e de Desempenho. *Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose*, pp. 5-7.
- Arbex, M. A. *et al.* (2010a). Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 1: fármacos de primeira linha. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 36, pp. 626-640.
- Arbex, M. A. *et al.* (2010b). Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 2: fármacos de segunda linha. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 36, pp. 641-656.
- Barkan, D. *et al.* (2012). *Mycobacterium tuberculosis* lacking all mycolic acid cyclopropanation is viable but highly attenuated and hyperinflammatory in mice. *Infect Immun*, 80, pp. 1958-1968.
- Batt, S. M. *et al.* (2012). Structural basis of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* DprE1 by benzothiazinone inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, pp. 11354-11359.
- Beckert, P. *et al.* (2012). rplC T460C identified as a dominant mutation in linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, pp. 2743-2745.
- Bento, J. *et al.* (2011). Métodos diagnósticos em tuberculose. *Acta Médica Portuguesa*, 24, pp. 145-154.
- Bombarda, S. *et al.* (2001). Imagem em tuberculose pulmonar. *Jornal de Pneumologia*, 27, pp. 329-340.
- Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 83, pp. 91-97.
- Brennan, P. J. e Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*, 64, pp. 29-63.
- Brossier, F. *et al.* (2011). Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, pp. 355-360.

- Cantaloube, S. *et al.* (2011). The Mycobacterium Tuberculosis FAS-II Dehydratases and Methyltransferases Define the Specificity of the Mycolic Acid Elongation Complexes. *PLoS ONE*, 6, pp. e29564.
- Cho, Y. *et al.* (2008). Discovery of novel nitrobenzothiazole inhibitors for Mycobacterium tuberculosis ATP phosphoribosyl transferase (HisG) through virtual screening. *J Med Chem*, 51, pp. 5984-5992.
- Cole, S. T. e Riccardi, G. (2011). New tuberculosis drugs on the horizon. *Current Opinion in Microbiology*, 14, pp. 570-576.
- Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council (1991). Controlled trial of 2, 4, and 6 months of pyrazinamide in 6-month, three-times-weekly regimens for smear-positive pulmonary tuberculosis, including an assessment of a combined preparation of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide. Results at 30 months. Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council. *Am Rev Respir Dis*. 1991/04/01 ed.
- Curry, F. J. (2008). *Drug-Resistant Tuberculosis: A Survival Guide for Clinicians, Second Edition*, pp. 2-122.
- Dalla Costa, E. R. *et al.* (2009). Correlations of mutations in katG, oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility in Mycobacterium tuberculosis clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol*, 9, pp. 39.
- De Chastellier, C. (2009). The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages. *Immunobiology*, 214, pp. 526-542.
- Devasia, R. *et al.* (2012). High proportion of fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates with novel gyrase polymorphisms and a gyrA region associated with fluoroquinolone susceptibility. *J Clin Microbiol*, 50, pp. 1390-1396.
- Dover, L. G. *et al.* (2004). Crystal structure of the TetR/CamR family repressor Mycobacterium tuberculosis EthR implicated in ethionamide resistance. *J Mol Biol*, 340, pp. 1095-1105.
- Duarte, R. *et al.* (2010a). Abordagem terapêutica da tuberculose e resolução de alguns problemas associados à medicação. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 16, pp. 559-572.
- Duarte, R. *et al.* (2010b). Tratamento da tuberculose de infecção latente: As recomendações actuais. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 16, pp. 809-814.
- Esin, S. *et al.* (2013). Interaction of Mycobacterium tuberculosis cell-wall components with the human natural killer cell receptors NKp44 and Toll like receptor 2. *Scand J Immunol*, 77, pp. 460-469.
- Ferreira, A. e Ávila, S. (2001). *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Ferreira, W e Sousa, J (2000). *Microbiologia, Volume 2*, Lisboa, Lidel, edições técnicas,Lda.

- Frehel, C. e Rastogi, N. (1987). Mycobacterium leprae surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. *Infect Immun*, 55, pp. 2916-2921.
- Goncalves, M. G. *et al.* (2012). Fast test for assessing the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and rifampin by real-time PCR. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107, pp. 903-908.
- Grosset, J. H. *et al.* (2012). New drugs for the treatment of tuberculosis: hope and reality. *Int J Tuberc Lung Dis*, 16, pp. 1005-1014.
- Hanouille, X. *et al.* (2006). Selective intracellular accumulation of the major metabolite issued from the activation of the prodrug ethionamide in mycobacteria. *J Antimicrob Chemother*, 58, pp. 768-772.
- Hazbon, M. H. *et al.* (2005). Role of embB codon 306 mutations in Mycobacterium tuberculosis revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, pp. 3794-3802.
- Howard, D. H. *et al.* (2003). The global impact of drug resistance. *Clin Infect Dis*, 36, pp. S4-10.
- Huggett, J. F. *et al.* (2003). Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35, pp. 1407-1412.
- Hwang, H. Y. *et al.* (2003). Characterization of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis in Taiwan. *J Med Microbiol*, 52, pp. 239-245.
- Jankute, M. *et al.* (2012). Arabinogalactan and lipoarabinomannan biosynthesis: structure, biogenesis and their potential as drug targets. *Future Microbiol*, 7, pp. 129-147.
- Jarlier, V. e Nikaido, H. (1994). Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett*, 123, pp. 11-18.
- Jou, N. T. *et al.* (1997). Single-tube, nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 35, pp. 1161-1165.
- Lamichhane, G. (2010). Novel targets in M. tuberculosis: search for new drugs. *Trends Mol Med*, 17, pp. 25-33.
- Lau, R. W. *et al.* (2011). Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis: functional analysis of gyrA mutation at position 74. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, pp. 608-614.
- Lee, P. J. e Krilov, L. R. (2006). Developing Infectious Disease Strategies for the Developing World. In: ANTHONY, W. (ed.) *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 41, pp. 275-285.
- Ling, D. I. *et al.* (2008). Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression. *PLoS ONE*, 3, pp. e1536.
- Loddenkemper, R. *et al.* (2002). Strategies against multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J Suppl*, 36, pp. 66-77.

- Ma, Z. *et al.* (2010). Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *Lancet*, 375, pp. 2100-2109.
- Marttila, H. J. *et al.* (1998). A Ser315Thr substitution in KatG is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, pp. 2443-2445.
- Mathys, V. *et al.* (2009). Molecular genetics of para-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates and spontaneous mutants of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, pp. 2100-2109.
- Maus, C. E. *et al.* (2005). Mutation of tlyA confers capreomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, pp. 571-577.
- Molle, V. *et al.* (2010). Phosphorylation of InhA inhibits mycolic acid biosynthesis and growth of Mycobacterium tuberculosis. *Molecular Microbiology*, 78, pp. 1591-1605.
- Morlock, G. P. *et al.* (2003). ethA, inhA, and katG loci of ethionamide-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, pp. 3799-3805.
- Nathan, C. *et al.* (2008). A philosophy of anti-infectives as a guide in the search for new drugs for tuberculosis. *Tuberculosis*, 88, Supplement 1, pp. 25-33.
- Ohno, H. *et al.* (1996). Relationship between rifampin MICs for and rpoB mutations of Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, 40, pp. 1053-1056.
- Ojha, A. K. *et al.* (2008). Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol*, 69, pp. 164-174.
- Parsons, L. M. *et al.* (1997). DRUG RESISTANCE IN TUBERCULOSIS. *Infectious disease clinics of North America*, 11, pp. 905-928.
- Portugal, I. *et al.* (2008). Epidemiologia molecular de Mycobacterium tuberculosis em Lisboa. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, XIV, pp. 240-241.
- Prabowo, S. A. *et al.* (2012). Targeting multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) by therapeutic vaccines. *Med Microbiol Immunol*, I, pp. 4-6.
- Rastogi, N. *et al.* (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech*, 20, pp. 21-54.
- Rengarajan, J. *et al.* (2004). The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Mol Microbiol*, 53, pp. 275-282.
- Rouse, D. A. *et al.* (1996). Site-directed mutagenesis of the katG gene of Mycobacterium tuberculosis: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol Microbiol*, 22, pp. 583-592.
- Rubinstein, E. e Keynan, Y. (2013). Quinolones for mycobacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*, 42, pp. 2-4.
- Russell, D. G. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol*, 5, pp. 39-47.

- Rustomjee, R. *et al.* (2008). A Phase II study of the sterilising activities of ofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 12, pp. 128-138.
- Safi, H. *et al.* (2008). Transfer of embB codon 306 mutations into clinical Mycobacterium tuberculosis strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, pp. 2027-2034.
- Scorpio, A. *et al.* (1997). Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 41, pp. 540-543.
- Singh, P. e Kant, L. (2002). What is new in the Diagnosis of Tuberculosis? Part I: Techniques for diagnosis of Tuberculosis. *Indian Council of Medical Research*, 32, pp. 1-8.
- Somoskovi, A. *et al.* (2001). The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. *Respir Res*, 2, pp. 164-168.
- Sousa, J. C. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos, 2ª edição*. Edições Universidade Fernando Pessoa.
- Swanson, S. *et al.* (2009). KasA, Another Brick in the Mycobacterial Cell Wall. *Structure*, 17, pp. 914-915.
- Tahlan, K. *et al.* (2012). SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, pp. 1797-1809.
- Theron, G. *et al.* (2012). The use of an automated quantitative polymerase chain reaction (Xpert MTB/RIF) to predict the sputum smear status of tuberculosis patients. *Clin Infect Dis*, 54, pp. 384-388.
- Udwadia, Z. F. *et al.* (2012). Totally drug-resistant tuberculosis in India. *Clin Infect Dis*, 54, pp. 579-581.
- Van Den Boogaard, J. *et al.* (2009). New drugs against tuberculosis: problems, progress, and evaluation of agents in clinical development. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, pp. 849-862.
- Van Rie, A. *et al.* (2010). Xpert((R)) MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? *Expert Rev Mol Diagn*, 10, pp. 937-946.
- Vander Beken, S. *et al.* (2011). Molecular structure of the Mycobacterium tuberculosis virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern. *Eur J Immunol*, 41, pp. 450-460.
- Vannelli, T. A. *et al.* (2002). The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. *J Biol Chem*, 277, pp. 12824-12829.
- Vega, A. *et al.* (2005). Micobacterias. In: CERCENADO R, C. R., EDITORS (ed.) *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología*.
- Von Groll, A. *et al.* (2009). Fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis and mutations in gyrA and gyrB. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, pp. 4498-4500.

- WHO, World health Organization (2010). Global Tuberculosis Control: key findings from the December 2009 WHO report. *Weekly epidemiological record*, 85, pp. 69-80.
- Wright, A. *et al.* (2006). Emergence of Mycobacterium tuberculosis with extensive resistance to second-line drugs--worldwide, 2000-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 55, pp. 301-305.
- Zaunbrecher, M. A. *et al.* (2009). Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, pp. 20004-20009.
- Zhang, M. *et al.* (1998). Growth of virulent and avirulent Mycobacterium tuberculosis strains in human macrophages. *Infect Immun*, 66, pp. 794-799.
- Zhang, Y. e Mitchison, D. (2003). The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*, 7, pp. 6-21.
- Zhang, Y. e Yew, W. W. (2009). Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 13, pp. 1320-1330.
- Zhang, Y. *et al.* (2003). Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to weak acids. *J Antimicrob Chemother*, 52, pp. 56-60.