



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ESTUDO EXPLORATÓRIO DE BIOMARCADORES DA
EVOLUÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES COM TUBERCULOSE
MULTIRRESISTENTE (TBMR)

SILAS GABRIEL SOUZA DE OLIVEIRA

Salvador - Bahia

2019

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina

Investigativa

**ESTUDO EXPLORATÓRIO DE BIOMARCADORES DA
EVOLUÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES COM TUBERCULOSE
MULTIRRESISTENTE (TBMR)**

SILAS GABRIEL SOUZA DE OLIVEIRA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Theolis Costa Barbosa Bessa

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

Salvador - Bahia

2019

ESTUDO EXPLORATÓRIO DE BIOMARCADORES DA EVOLUÇÃO CLÍNICA
DE PACIENTES COM TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE (TBMR)

SILAS GABRIEL SOUZA DE OLIVEIRA

Folha de Aprovação

Comissão examinadora

FONTE DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

Multinational Organization Network Sponsoring Translational and Epidemiological Research - MONSTER

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela sua infinita misericórdia para comigo sempre.

Agradeço também à professora Dra Theolis, pela orientação dada ao longo desse tempo, de igual forma agradeço ao Dr. Bruno Bezerril e o seu estudante Paulo Mattos, por toda a colaboração e apoio cedido durante este tempo e a preocupação com os experimentos.

Sou grato ao IGM, por me oportunizar fazer o mestrado e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, aos professores da pós-graduação, aos colegas do LETI e do LIMI, em especial aos membros do grupo TB, Elissandro Miranda, Scarlet Mota, Clarissa Santana, aos estudantes de Iniciação científica, bolsistas e voluntários, que tiveram apoio fundamental no decorrer do projeto, captação dos pacientes, processamento das amostras, Lucas Vasconcelos, Paulo Sérgio do Valle, Yasmim Oliveira, Larissa São Paulo, Eliane Jiliane, Patrícia Chopanides, Nayara Yoro que de alguma forma me fizeram crescer e aprender com eles, aos colegas da pós, em especial Helenita e Vanessa. Agradeço à biblioteca do IGM, em especial à pessoa da Ana Maria Fiscina.

Agradeço ao HEOM por abrir o espaço e permitir recrutar os pacientes a participar do estudo, em especial às pessoas de Anildo Montes e Dra Eliana Matos, que tiveram papel essencial no decorrer do estudo. Sou grato à FAPESB, por ter concedido a bolsa na qual foi de muita importância para a minha permanência no programa.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe Edileusa Josefa, uma mulher guerreira e sábia a qual admiro, por sempre estar ao meu lado apoiando as minhas decisões e nas tomadas das mesmas, sou grato aos meus irmãos, Priscila, Sóstenes, Tafnes e Calebe, que cada um na sua particularidade teve a sua contribuição.

Sou grato ao meu amigo Elissandro, que entrou nesse barco comigo me dando todo o apoio e conselhos, estando presente o tempo todo, partilhando os momentos de alegria e adversos, Antonio Marcos sou grato pelo apoio de sempre, pelo suporte psicológico, Michael, Laércio e demais pelas conversas e por todo o apoio fornecido. Sou grato à mim, pelos meus esforços e dedicação. Obrigado!

OLIVEIRA, Silas Gabriel Souza de. Estudo exploratório de biomarcadores da evolução clínica de pacientes com Tuberculose Multirresistente (TBMR). 2019. 52 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)- Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A tuberculose (TB) é uma doença considerada como um grave problema de saúde pública, sendo a primeira causa de morte entre as doenças infecciosas. O uso inadequado dos medicamentos antituberculose relaciona-se ao aparecimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) resistentes a esses fármacos, sendo de especial interesse a resistência combinada a rifampicina e isoniazida, as drogas mais eficazes contra o bacilo, denominada tuberculose multirresistente (TBMR), que precisa ser tratada com um esquema terapêutico alternativo que apresentem menor taxa de cura, efeitos colaterais mais graves e frequentes, custo de tratamento mais elevado, e prognóstico menos favorável. Modificações do esquema terapêutico são realizadas quando se detecta falha em controlar a carga bacteriana no escarro, porém esse indicativo de falha é avaliado pela persistência de bacilos em cultura após seis meses de tratamento, um período longo em que pode ocorrer a transmissão de bacilos resistentes a partir do paciente índice. A identificação de outros parâmetros que possam sinalizar a falha terapêutica de forma precoce será muito útil para o manejo desses pacientes. **OBJETIVOS:** Avaliar os níveis séricos de moléculas relevantes para a imunopatogênese da tuberculose em uma coorte de pacientes com tuberculose multirresistente a fármacos (TBMR), como potenciais biomarcadores da falha terapêutica. **MÉTODOS:** Trata-se de um estudo observacional com coorte prospectivo, com seguimento de 18 meses, de forma a iniciar as análises preferencialmente no tempo zero de tratamento. Características sócio-demográficas e clínicas foram obtidas a partir de entrevista aos pacientes ou fontes secundárias utilizando questionário padronizado. O sangue dos pacientes foi coletado nos tempos zero, dois, seis, nove, doze e dezoito meses de tratamento para a obtenção do soro, plasma e pellet. As moléculas foram dosadas por ELISA ou CBA. **RESULTADOS:** Após seis meses de tratamento houve maior diferenciação dos níveis das moléculas estudadas em comparação aos níveis pré-tratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as proteínas e os desfechos clínicos. Não foram observadas separação muito distinta entre os níveis das proteínas apresentados por pacientes com desfecho desfavorável em relação àqueles com desfecho favorável. **CONCLUSÃO:** Houve diferenças nos níveis das moléculas aos seis meses após o tratamento quando comparados ao pré-tratamento. Não houve diferenciação nos níveis das moléculas quando comparamos desfechos clínicos favoráveis e desfavoráveis.

Palavras-chave: Tuberculose, Biomarcadores, Esquemas de tratamento, Multirresistência.

OLIVEIRA, Silas Gabriel Souza de. Exploratory study of biomarkers of the clinical evolution of patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB).2019. 52 p. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Tuberculosis (TB) is a disease considered to be a serious public health problem, being the leading cause of death among infectious diseases. The inadequate use of antituberculosis drugs is related to the development of resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), with the combined resistance to rifampicin and isoniazid, the most effective drugs against the bacillus, called multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB), which needs to be treated with an alternative therapeutic regimen that have a lower cure rate, more serious and frequent side effects, a higher treatment cost, and a less favorable prognosis. Modifications of the therapeutic regimen are performed when failure to control bacterial load in the sputum is detected, but this indicative of failure is assessed by the persistence of cultured bacilli after six months of treatment, a long period in which transmission of resistant bacilli may occur. From the index patient. The identification of other parameters that may signal the therapeutic failure in an early manner will be very useful for the management of these patients

OBJECTIVES: To explore the serum levels of molecules relevant for the immunopathogenesis of tuberculosis in a cohort of patients with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), as potential biomarkers of therapeutic failure. **METHODS:** It is an observational study with a prospective cohort, with a follow-up of 18 months, in order to initiate the analyzes preferentially at the zero treatment time. Socio-demographic and clinical characteristics were obtained from an interview with patients or secondary sources using a standardized questionnaire. The volunteers' blood was collected at zero, two, six, nine, twelve and eighteen months of treatment to obtain serum, plasma and pellet. The molecules were dosed by ELISA or CBA. **RESULTS:** After six months of treatment, there was a greater differentiation of the levels of the studied molecules in comparison to the pretreatment levels. There was no statistically significant difference between the proteins and clinical outcomes. No very distinct separation between the levels of the proteins presented by volunteers with unfavorable outcome was observed in relation to those with favorable outcome. **CONCLUSION:** There were differences in the levels of the molecules at six months after treatment when compared to pretreatment. There was no differentiation in the levels of the molecules when we compared favorable and unfavorable clinical outcomes.

Keywords: Tuberculosis, Biomarkers, Treatment schedules, Multiresistance

LISTA DE FIGURAS, TABELAS

Figura 1. Esquema de tratamento para TBMR.....	18
Figura 2. Fonte de dados para resistência a medicamentos contra a tuberculose.....	18
Figura 3. Estrutura básica do granuloma da tuberculose.....	22
Fluxograma 1. Cronograma de coletas de seguimento dos pacientes com TBMR participantes do estudo.....	28
Tabela 1. Mediadores analisados através do ELISA.....	31
Tabela 2. Mediadores analisados através do CBA.....	32
Tabela 3. Características sócio-demográficas dos pacientes com TBMR.....	35
Gráfico 1. Características laboratoriais e radiológicas dos pacientes com TBMR.....	36
Figura 4. Níveis séricos de HO-1 e MMP-1 em voluntários com TBMR nos períodos de seguimento (tempo zero, dois meses, seis meses, nove meses, doze meses e dezoito meses).....	37
Figura 5. Níveis séricos de HO-1 e MMP-1 em voluntários com TBMR, estratificados por desfecho clínico.....	37
Figura 6. Níveis séricos de biomarcadores em pacientes com TBMR nos períodos de seguimento (tempo zero, dois meses, seis meses, nove meses, doze meses e dezoito meses) e comparação dos mesmos com o tempo zero de tratamento.....	39
Figura 7. Matriz de correlações dos biomarcadores no tempo de zero, seis e dezoito meses de tratamento.....	40
Figura 8. Níveis de citocinas comparando os grupos de desfecho do tratamento dos pacientes com TBMR aos seis meses.....	41
Figura 9. Níveis plasmáticos de IL-28, IL-1RA, IL-8, IL-1 β , PCR e MMP-8 em pacientes com TBMR, estratificados por desfecho clínico.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO	Monóxido de Carbono
E	Etambutol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (<i>Thylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
H	Isoniazida
HEOM	Hospital Especializado Octávio Mangabeira
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HMGB1	Proteína da caixa 1 do grupo de alta mobilidade (<i>High-Mobility Group Box 1 Protein</i>)
HO-1	HemeOxigenase
IFN- γ	Interferon-Gamma
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IGRA	Ensaio de Liberação de Interferon-gama (<i>Interferon-Gamma Realease Assay</i>)
IL	Interleucina
IL-1RA	Receptor Antagonista de Interleucina1 (<i>Interleukin-1 Receptor Antagonist</i>)
MMP	Metaloproteínase de Matriz (<i>Matrix Metalloproteinases</i>)
MNT	Micobactéria Não Tuberculosa
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK	Natural Killer
NOS2	Óxido Nítrico Sintase 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Pirazinamida
PCR	Proteína C Reativa
PCT	Programa de Controle da Tuberculose
PPD	Derivado Protéico Purificado

PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
R	Rifampicina
RNI	Reativos Intermediários de Nitrogênio
ROI	Reativos Intermediários de Oxigênio
S	Estreptomicina
TB	Tuberculose
TBMR	Tuberculose Multirresistente
TBXDR	Tuberculose Extensivamente Resistente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th	T helper
TNF	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRM	Teste Rápido Molecular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	ASPECTOS GERAIS DA TUBERCULOSE.....	14
2.2	TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE.....	16
2.3	MECANISMOS IMUNES CONTRA A TUBERCULOSE.....	19
2.4	BIOMARCADORES.....	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	METODOLOGIA	27
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	27
4.2	CENÁRIO DO ESTUDO.....	28
4.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	29
4.3.1	Descrição do recrutamento realizado	29
4.3.1.1	<i>Critérios de inclusão e exclusão</i>	29
4.4	COLETA DE DADOS.....	30
4.4.1	Características sócio-demográficas e clínicas	30
4.4.2	Análises laboratoriais	30
4.5	PROPOSTA DE ANÁLISE.....	32
4.6	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	33
5	RESULTADOS	34
5.1	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	34
5.2	RELAÇÃO DOS NÍVEIS DE HO-1 E MMP-1 COM O TEMPO DE TRATAMENTO.....	36

5.3	ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE OUTROS BIOMARCADORES DURANTE NO SEGUIMENTO.....	38
6	DISCUSSÃO.....	43
7	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	APÊNDICE.....	52

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença considerada, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) como um grave problema de saúde pública, sendo a primeira causa de morte entre as doenças infecciosas causadas por um único agente infeccioso. O Brasil apresenta-se entre os 22 países responsáveis por 80% dos casos da doença (WHO, 2017). O uso inadequado dos medicamentos que estão padronizados como de primeira linha para o tratamento, relaciona-se ao aparecimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) resistentes, podendo esta ser resistente a um ou mais medicamentos, porém quando a resistência às medicações rifampicina e isoniazida, que são drogas mais potentes no tratamento, a tuberculose é denominada multirresistente (TBMR), tornando necessário um outro esquema terapêutico, alternativo, que comumente apresentam prognóstico menos favorável, uma menor taxa de cura, aumento dos efeitos colaterais, custo mais elevado (WHO, 2017; WHO, 2014).

A imunidade mediada por células T é o principal mecanismo de resposta contra a TB, mediada principalmente por uma resposta imune do tipo Th1 com níveis elevados de Interleucina-12 (IL-12) e Interferon-Gama (IFN- γ) que são citocinas pró-inflamatórias. Apesar de ser necessária uma resposta imune capaz de erradicar os bacilos, uma reação imune exagerada leva a uma forte resposta inflamatória com consequente dano aos tecidos do hospedeiro (LIM *et al.*, 2013).

As quimiocinas produzidas por macrófagos alveolares e pneumócitos atraem células inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos derivados de monócitos, células Natural Killer (NK) e células T $\gamma\delta$, que promovem uma maior inflamação e remodelação do tecido, sendo assim, a resposta inata à infecção com *Mtb* faz pouco para restringir e muito para promover a replicação do bacilo. Por conseguinte, uma acumulação focal das células mononucleares em diferentes estados de maturação, ou seja, a fase inicial de um granuloma, não é por si só protetora (EHLERS; SCHAIBLE, 2013).

Embora esta resposta imunitária seja essencial para a erradicação dos bacilos, uma reação imune desregulada e intensa e a consequente resposta inflamatória excessiva podem causar danos imunológicos aos tecidos do hospedeiro (LIM *et al.*, 2013). A patologia TB desencadeia a ativação de redes intracelulares, que resultam em danos. Estresse oxidativo com destruição dos tecidos pulmonar, a participação das MMPs

produzem cavitações nas quais os bacilos se proliferam. (ANDRADE *et al.*, 2015; ONG, 2014).

Macrófagos não-ativados são o habitat habitual do *Mtb*, que resiste no ambiente intracelular, bloqueando a fusão do fagossoma com o lisossomo, evitando assim a sua exposição ao pH baixo e os radicais oxidativos, responsáveis pela destruição de organismos intracelulares. Os macrófagos ativados por IFN- γ transpõem esse bloqueio, sendo assim, o IFN- γ é a citocina principal envolvida na resposta imunológica protetora inicial contra a infecção micobacteriana (CAVALCANTI *et al.*, 2012).

Estudos em pacientes com TB ativa demonstraram diminuição das concentrações sistêmicas de antioxidantes e aumento da geração espontânea de radicais livres em comparação com indivíduos sem TB, sugerindo assim que o estresse oxidativo excessivo pode estar associado com esta doença. (COSTA *et al.*, 2016), porém ainda não há biomarcadores derivados do hospedeiro bem estabelecidos e que sejam confiáveis para determinar o tratamento bem sucedido (MIRANDA *et al.*, 2017) por isso novos biomarcadores ou combinações destes para avaliação do risco e da doença são críticos para o controle urgentemente da pandemia de TB em curso (WEINER *et al.*, 2018; MAERTZDORF *et al.*, 2015).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ASPECTOS GERAIS DA TUBERCULOSE

A TB é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Ela geralmente afeta os pulmões (TB pulmonar), mas também pode acometer outros órgãos (TB extrapulmonar). Este bacilo é transmitido para o ar por pessoas que estão doentes com TB pulmonar na forma ativa que expulsam os bacilos, através da tosse (WHO, 2017). Após entrar nos pulmões humano, o *Mtb* depara com diferentes mecanismos de defesa do hospedeiro. O sucesso final da infecção depende do equilíbrio entre o crescimento e morte do bacilo e a extensão da necrose tecidual, fibrose e regeneração (CREVEL *et al.*, 2002). O escarro contendo sangue juntamente com tosse crônica, sudorese noturna, febre e perda de peso são sintomas clássicos de TB ativa (GUPTA e KAKKAR, 2018).

Os doentes bacilíferos, isto é, aqueles cuja baciloscopia de escarro é positiva, são a principal fonte de transmissão (BRASIL, 2011), e aqueles doentes com múltiplos sintomas comumente apresentam maiores cargas bacterianas, associados à um pior prognóstico transmitindo mais bacilos (HESLOP *et al.*, 2016). Doentes de TB pulmonar com baciloscopia negativa, mesmo que tenham resultado positivo à cultura, são muito menos transmissores, embora isso possa ocorrer. As formas exclusivamente extrapulmonares não transmitem a infecção (BRASIL, 2011).

A TB é uma doença considerada como um grave problema de saúde pública, só no ano de 2016 foram estimados 10.4 milhões de casos novos da doença, e esta ocupa o primeiro lugar entre a causa de morte por doenças infecciosas causadas por um único agente infeccioso, ultrapassando a infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (WHO, 2017).

O Brasil apresenta-se entre os 22 países responsáveis por 80% dos casos no mundo. No ano de 2016 foram notificados 82.676 casos da doença, com coeficiente de incidência de 42 casos para cada 100.00 habitantes e pelo menos 4.500 pessoas morrem por TB naquele Ano. Na região das Américas, estimativas mostram que houve 7.700 casos de tuberculose multirresistente (TBMR) no ano de 2016, estando o Brasil responsável por 1.077 casos desta, o estado da Bahia apresenta um coeficiente de incidência de TB entre

10-30 casos por 100.00 habitantes e coeficiente de mortalidade por TB de 2,1-3.0 por 100.00 habitantes. (WHO, 2017; BRASIL 2017)

A norma do Ministério da Saúde recomenda que associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo de 6 meses são os princípios básicos para o tratamento curativo da TB, evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos e, assim, assegurando a cura do paciente (BRASIL, 2011). No início da quimioterapia tuberculosa, no final da década de 40, os primeiros ensaios já demonstravam a necessidade de uma combinação farmacológica no tratamento como a principal medida para se prevenir a resistência (DALCOMO, 2012). O único mecanismo pelo qual emerge a resistência micobacteriana em um indivíduo portador de TB é por meio da seleção de bacilos mutantes primariamente resistentes em uma população selvagem. Assim, a forma de evitar a seleção de bacilos resistentes é a utilização de esquemas terapêuticos com diferentes fármacos anti-TB simultaneamente, uma vez que bacilos naturalmente resistentes a um medicamento podem ser sensíveis a outro (BRASIL, 2011).

Atualmente, a apresentação farmacológica do esquema básico para adultos e adolescentes preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e utilizado na maioria dos países é em comprimidos de doses fixas combinadas dos quatro medicamentos Isoniazida (H), Rifampicina (R), Pirazinamida (Z) e Etambutol (E) (WHO, 2017). H e R são os medicamentos de maior poder bactericida, sendo ativos em todas as populações bacilares sensíveis, quer intracavitárias, nos granulomas, ou intracelulares e R o medicamento com maior poder esterilizante. O etambutol é bacteriostático e é utilizado em associação com medicamentos mais potentes para prevenir a emergência de bacilos resistentes (BRASIL, 2011). O acréscimo do E ao esquema evita o risco de falência e reduz o risco de recidiva em casos de resistência primária à rifampicina ou isoniazida (DALCOMO, 2012).

Para o acompanhamento da evolução da doença em pacientes recém-diagnosticados com TB pulmonar faz-se o controle mensal da baciloscopia (BRASIL, 2011; WHO 2014), sendo indispensáveis as baciloscopias do segundo, quarto e sexto meses, no esquema básico. Em casos de baciloscopia positiva no final do segundo mês de tratamento, preconiza-se a cultura para micobactérias com identificação e teste de sensibilidade (TS) (BRASIL, 2011).

O uso adequado e as doses corretas, somados à adesão do paciente, resultam no sucesso terapêutico, e a negatificação ao final da fase intensiva do tratamento (após os primeiros 2 meses) prediz uma evolução favorável naqueles indivíduos bacilíferos. Os indicadores para determinar a efetividade de tratamento são a cura, tratamento completo, falha terapêutica, perda de seguimento e o óbito, (DALCOMO, 2012, WHO 2014) e se considera que um bom programa de controle da TB alcance pelo menos 85% de cura (DALCOMO, 2012; WHO, 2017).

Pacientes inicialmente bacilíferos deverão ter pelo menos duas baciloscopias negativas para comprovar cura, uma na fase de acompanhamento e outra ao final do tratamento (BRASIL, 2011), sendo que a febre persistente, perda de peso ou a recorrência de algum dos sintomas clássicos da TB precisa ser investigado e sugere falhas no tratamento ou comorbidades não tratadas. A recorrência dos sintomas após a conversão da baciloscopia pode ser o primeiro sinal de falha terapêutica (WHO, 2014), na qual uma maior carga bacilar tem sido um importante fator de risco para a falha terapêutica (HESLOP *et al.*, 2016).

2.2. TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE

No ano de 1946, com a descoberta da estreptomicina (S) e o seu uso no tratamento da TB, o fenômeno da resistência bacilar foi logo identificado. Esse fenômeno ocorre naturalmente por mutação genética do *Mtb* durante a sua replicação, principalmente em ambientes com condições favoráveis de nutrição, oxigenação e pH, como ocorre no interior da cavidade pulmonar (BRASIL, 2011).

O uso inadequado dos medicamentos que estão padronizados como de primeira linha para o tratamento relaciona-se ao aparecimento de cepas de *Mtb* resistentes aos fármacos anti-tuberculose. Pode ocorrer mono- ou polirresistência consoante o número de fármacos envolvidos, porém é de especial interesse a resistência que envolve as medicações rifampicina (um fármaco bactericida que age inibindo a atividade do RNA polimerase DNA-dependente em células sensíveis e interage especificamente com RNA polimerase bacteriana) e a isoniazida (que age inibindo a síntese do ácido micólico nas micobactérias) que são as duas drogas mais potentes no tratamento. Este perfil de resistência a R e H recebe a denominação de multirresistente, sendo definida a TBMR

como a TB em que se demonstra a ineficácia do tratamento e a ocorrência de bacilos multirresistentes (WHO, 2017; WHO, 2014).

A resistência aos fármacos anti-TB é classificada como resistência natural, quando a resistência surge naturalmente no processo de multiplicação do bacilo da TB, resistência primária que se verifica em pacientes nunca tratados anteriormente com fármacos anti-TB, contaminados por bacilos previamente resistentes, e a resistência adquirida ou secundária, na qual pacientes com TB inicialmente sensível tornam-se resistentes ao tratamento após a exposição aos medicamentos, sendo as principais causas do surgimento da resistência adquirida o uso de esquemas inadequados ou o uso irregular do esquema terapêutico por má adesão ou falta temporária de medicamentos que permite a seleção de cepas com mutações de resistência (WHO, 2014; BRASIL, 2011). A maioria dos casos de multirresistência no mundo é adquirida devido a tratamentos irregulares ou abandono (BRASIL, 2011). Esta resistência está fortemente associada aos casos de TB previamente tratados, sendo 10 vezes maior a probabilidade de surgirem cepas resistentes neste grupo do que nos casos novos (MOÇAMBIQUE, 2009). A TBMR e a Tuberculose Extensivamente Resistente (TBXDR) são doenças extremamente graves em todo o mundo e podem evoluir gravemente com mortalidade aparentemente maior do que o câncer até 2050 (HAMEED *et al.*, 2018).

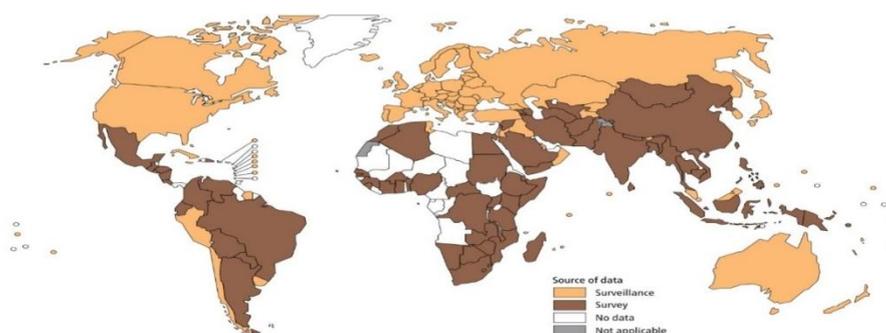
Pacientes com TBMR têm que fazer uso de um esquema terapêutico alternativo, em um regime que inclui fármacos anti-TB de segunda linha, ou seja, que comumente apresentam uma menor taxa de cura, aumento dos efeitos colaterais, custo mais elevado, além de necessitarem de um tempo de administração mais longo, de cerca de 20 meses, com um prognóstico menos favorável (WHO, 2014; WHO, 2017) (Figura 1). Um esquema para multirresistência deve ser composto por, pelo menos, quatro fármacos com atividades efetivas que, preferencialmente, não tenham sido utilizados anteriormente (WHO, 2014; BRASIL, 2011). O tratamento com TBMR é prolongado (9–24 meses), pouco eficaz (<50% de sucesso no tratamento), mal tolerado e bastante tóxico (HONG *et al.*, 2018). Quando a efetividade dos medicamentos é variável ou o padrão de resistência é incerto, mais do que quatro medicamentos podem ser utilizados (BRASIL, 2011).

Regime	Fármaco	Doses por faixa de peso				Meses
		Até 20kg	21 kg a 35kg	36kg a 50kg	> 50kg	
2 SSELZT Fase intensiva 1a etapa	Estreptomicona	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia a 1.000mg/dia	1.000mg/dia	2
	Etambutol	25mg/kg/dia	400mg/dia a 800mg/dia	800mg/dia a 1.200mg/dia	1.200mg/dia	
	Levofloxacina	10mg/kg/dia	250mg/dia a 500mg/dia	500mg/dia a 750mg/dia	750mg/dia	
	Pirazinamida	35mg/kg/dia	1.000mg/dia	1.500mg/dia	1.500mg/dia	
	Terizidona	20mg/kg/dia	500 mg/dia	750 mg/dia	750 mg/dia a 1.000 mg/dia	
4 S3ELZT Fase intensiva 2a etapa	Estreptomicona	20mg/kg/dia	500 mg/dia	750mg/dia a 1.000 mg/dia	1.000 mg/dia	4
	Etambutol	25mg/kg/dia	400mg/dia a 800mg/dia	800mg/dia a 1.200mg/dia	1.200mg/dia	
	Levofloxacina	10mg/kg/dia	250mg/dia a 500mg/dia	500mg/dia a 750mg/dia	750mg/dia	
	Pirazinamida	35mg/kg/dia	1.000mg/dia	1.500mg/dia	1.500mg/dia	
	Terizidona	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia	750mg/dia a 1.000mg/dia	
12 ELT Fase de manutenção	Etambutol	25mg/kg/dia	400mg/dia a 800mg/dia	800mg/dia a 1.200mg/dia	1.200mg/dia	12
	Levofloxacina	10mg/kg/dia	250mg/dia a 500mg/dia	500mg/dia a 750mg/dia	750mg/dia	
	Terizidona	20mg/kg/dia	500mg/dia	750mg/dia	750mg/dia a 1.000mg/dia	

Fonte: BRASIL, 2011

Figura 1. Esquema de tratamento para TBMR

A TBMR representa uma ameaça importante para o controle da TB no mundo todo (Figura 2). Em 2016 foram estimados 490.000 novos casos de TBMR em todo o mundo, e cerca de 240.000 mortes (WHO, 2017). A resistência aos medicamentos anti-TB constitui um desafio tanto para os clínicos quanto para os programas nacionais de controle da TB. Mais recentemente este problema aumentou e a TBMR é considerada atualmente uma epidemia, com surtos de TBMR resistente a fármacos de segunda linha contra a TB (MOÇAMBIQUE, 2009).



Fonte: WHO, 2017

Figura 2. Fonte de dados para resistência a medicamentos contra a tuberculose.

Em 2015, segundo a WHO (2017), estima-se que de cerca de 580 mil casos elegíveis para o tratamento da TBMR, destes 125 mil pessoas tinham sido detectados. A taxa de cura para esta forma da doença em 2013 foi de 52% (WHO, 2017). Para o tratamento completo exige-se que, após duas culturas negativas sucessivas para micobactérias, o paciente permaneça fazendo uso diário das drogas pelo menos por 12 meses, cumprindo um tempo total de tratamento igual ou superior a 18 meses (SILVA JR, 2004). O tratamento da TBMR deve ser realizado por 18 a 24 meses, a depender da curva de negativação bacteriológica, considerando-se também a evolução clínica e radiológica. Pacientes que apresentem baciloscopia e/ou cultura positiva no sexto mês deverão completar 24 meses de tratamento e como critério de cura o paciente deve apresentar três culturas negativas a partir do 12º mês de tratamento (12º, 15º e 18º), (BRASIL, 2011).

Devido ao número crescente destes casos resistentes aos medicamentos e à incapacidade das técnicas de diagnóstico atuais para detectar rapidamente *Mtb* nos estágios iniciais, muitos esforços têm sido feitos ao longo das últimas décadas no desenvolvimento de pontos de cuidados eficientes, baratos e rápidos técnicas de detecção para a gestão mundial da epidemia de TB (GUPTA e KAKKAR, 2018).

Os casos de TBMR e TBXDR estão a aumentar devido ao problema de disseminação da resistência aos antibióticos e tradicionalmente, a identificação de tais mutações resistentes a fármacos é feita através do TS, que requer o cultivo de bactérias (GUPTA e KAKKAR, 2018).

Reconhecer a doença e os agentes causadores de doenças nos estágios iniciais é uma tarefa crucial devido à falta de sintomas específicos. Assim, ferramentas modernizadas para detecção e diagnóstico de TB são necessárias para obter resultados precisos de maneira rápida, tendo em vista a restrição de custos (GUPTA e KAKKAR, 2018).

2.3. MECANISMOS IMUNES CONTRA A TUBERCULOSE

A patogênese da TB depende da interação entre a virulência bacteriana e resistência do hospedeiro (RAMAKRISHNAN, 2012), que são duas variáveis distintas e independentes (COOPER, 2009). A eliminação da infecção com *Mtb* depende principalmente do sucesso da interação entre os macrófagos infectados e linfócitos T

(KHAN *et al.*, 2016). As características da doença TB são, por sua vez, muito diversas. Eles diferem pelo tipo de patologia desenvolvida nos pulmões, extensão do tecido pulmonar afetado, taxa de progressão da doença, características de ativação imune e inflamação e quantidade de bacilos (LYADOYA; PANTELEEV, 2015). A característica patológica da doença é a formação de granulomas, que decorre de fatores inerentes aos bacilos com os do hospedeiro, nos pulmões de pacientes (PARASA *et al.*, 2017). Granulomas são estruturas imunológicas organizadas, dinâmicas e compactas, ricas em células imunes, tais como monócitos, células dendríticas, neutrófilos, células epitelióides, macrófagos espumosos, células gigantes multinucleadas, necrose caseosa e macrófagos que se deslocam para dentro e para fora em toda a estrutura. Esta estrutura inicial está rodeada por uma camada de linfócitos que lhe conferem uma estrutura sólida organizada (NDLOVU; MARAKALALA, 2016; RAMAKRISHNAN, 2012), porém a formação precoce do granuloma em TB pode favorecer a disseminação bacteriana no tecido, (DAVIS, 2009) através da saída de macrófagos infectados para novos sítios (RAMAKRISHNAN, 2012).

Após a inalação de aerossóis, as primeiras células hospedeiras dos *Mtb* são os macrófagos alveolares, que fagocitam, mas não conseguem matar as micobactérias invasoras, e produzem fatores quimioatraentes (EHLERS e SCHAIBLE, 2013) que recrutam células T. Depois de duas a três semanas de infecção, esses linfócitos T específicos com antígenos do bacilo que migram para o local da infecção se multiplicam nas lesões precoces e liberam citocinas pró-inflamatórias, como o Interferon-Gamma (IFN- γ), que por sua vez ativa os macrófagos para matar as micobactérias intracelulares (HOSSAIN e NORAZMI, 2013). As quimiocinas produzidas por macrófagos alveolares e pneumócitos atraem a primeira rodada de células inflamatórias, ou seja, neutrófilos, macrófagos derivados de monócitos, células Natural Killer (NK) e células T $\gamma\delta$, que promovem uma maior inflamação e remodelação do tecido. Sendo assim, a resposta inata à infecção com *Mtb* faz pouco para restringir e muito para promover a replicação do bacilo. Por conseguinte, uma acumulação focal das células mononucleares em diferentes estados de maturação, ou seja, a fase inicial de um granuloma, não é por si só protetora (EHLERS; SCHAIBLE, 2013).

A inflamação é indispensável para a defesa do hospedeiro, entretanto, a falha do organismo em interromper a resposta inflamatória terminará com a destruição descontrolada de células e tecidos e pode resultar no desenvolvimento de doenças

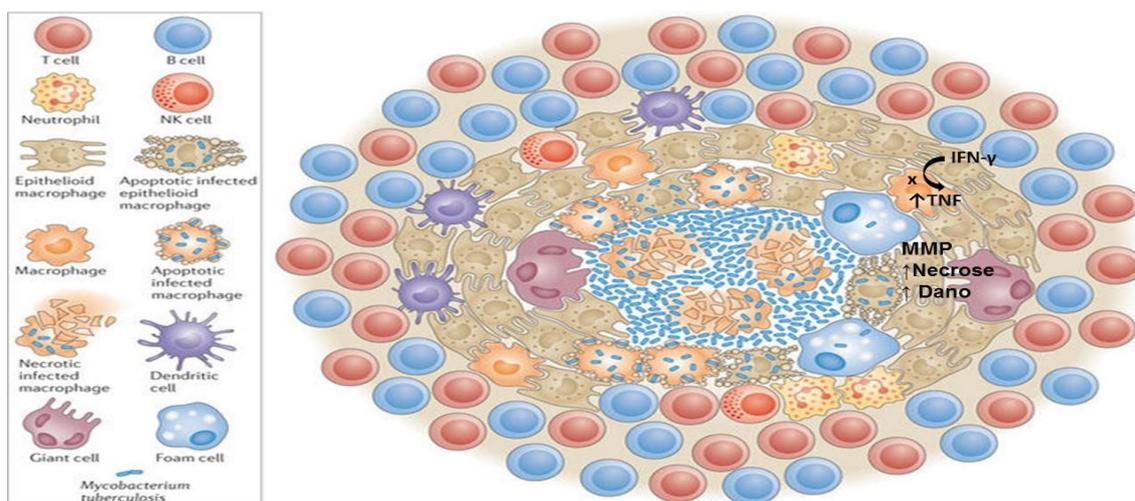
inflamatórias crônicas imunomediadas. As citocinas Interleucina (IL)-1 induzem respostas inflamatórias potentes e seu antagonista IL-1RA bloqueia as respostas por estas mediadas (PALOMO *et al.*, 2015).

A infecção disseminada leva a destruição pulmonar, resultando em cavitações, que são formadas quando o pulmão, que está amolecido, é fragmentado e expelido, podendo produzir sangramento em larga escala dando assim o primeiro sinal clínico da doença o que favorece o processo de tosse para o bacilo ser transmitido a novos hospedeiros através das vias aéreas, tal dano inflamatório do tecido é responsável pela morbidade e mortalidade nos pacientes. (ELKINGTON *et al.*, 2011; HUNTER, 2011)

Os bacilos replicam dentro macrófagos e as micobactérias direcionam o recrutamento e a motilidade de macrófagos não infectados para as áreas circunvizinhas de células infectadas. Além disso, a proteína micobacteriana ESAT-6 induz a secreção de Metaloproteinase de Matriz (MMP)-9 por células epiteliais para conduzir ao recrutamento de novos macrófagos no granuloma (NDLOVU; MARAKALALA, 2016; RAMAKRISHNAN, 2012). À medida que a doença da tuberculose avança, o granuloma pode sofrer eventos de remodelação complexos que resultam na formação de um cáseo, que contém material necrótico no centro do granuloma rico em lipídios e supostamente hipóxico. A destruição do cáseo resulta na liquefação e eventualmente na cavitação do granuloma, que permite a liberação de *Mtb* infecciosa nas vias aéreas onde são aerossolizadas em gotículas de tosse e pode facilitar a transmissão bacteriana a novos hospedeiros (NDLOVU; MARAKALALA, 2016). Macrófagos recrutados fagocitam vesículas de fagócitos infectados que morreram por apoptose e que contém bactérias viáveis que crescem nestes novos macrófagos ampliando a infecção e inativando as funções microbidas dos mesmos (RAMAKRISHNAN, 2012).

Embora esta resposta imunitária seja essencial para a erradicação dos bacilos, uma reação imune desregulada e intensa e a consequente resposta inflamatória excessiva podem causar danos imunológicos aos tecidos do hospedeiro (LIM *et al.*, 2013). Muito embora os componentes da imunidade inata e citocinas da imunidade adaptativas normalmente desempenham atividade protetora contra o bacilo, por vezes pode também facilitar a sobrevivência do mesmo, pois estas nem sempre são necessariamente favoráveis à proteção do hospedeiro e podem favorecer o patógeno (HOSSAIN e NORAZMI, 2013).

A matriz extracelular pulmonar é suportada por colágenos fibrilar, que são altamente resistentes à clivagem enzimática (ELKINGTON *et al.*, 2011) e a patologia TB desencadeia a ativação de redes intracelulares, que resultam em danos, estresse oxidativo com destruição dos tecidos pulmonar, pelas MMPs e a formação de cavitações em decorrência do dano nas quais os bacilos se proliferam. (ANDRADE *et al.*, 2015; ONG, 2014). Este mecanismo envolve a degradação enzimática do tecido pulmonar por MMP (ANDRADE *et al.*, 2015) enzimas hospedeiras que causam a degradação da matriz extracelular, pois degradam colágenos fibrilares em pH neutro e outros componentes da matriz extracelular e formação do granuloma e desempenham um papel na remodelação do tecido e na destruição destes para favorecer o espalhamento da micobactéria (ELKINGTON, 2011; PARASA *et al.*, 2017), estando a extensão do dano tecidual associado à carga bacilar e ao comprometimento da função pulmonar (HUNTER, 2011).



FONTE: Adaptado de RAMAKRISHNAN, 2012

Figura 3. Estrutura básica do granuloma da tuberculose

As Metaloproteínases de Matriz são uma família de proteases que são coletivamente capazes de degradar todos os componentes da matriz extracelular e são as únicas enzimas conhecidas por essa clivagem de colágenos fibrilares pulmonares em pH neutro e na TB foi demonstrado que o *Mtb* virulento regula a produção de MMP-1 (colagenase intersticial). Acredita-se que esta enzima tem um papel crítico na imunopatologia da

doença, pois a destruição da matriz extracelular é um dos eventos patológicos críticos na TB (ELKINGTON *et al.*, 2011).

Há evidências de que a MMP-1 (colagenase intersticial) desempenha um papel crítico na imunopatologia da TB pulmonar (KUBLER *et al.*, 2015). Pois a mesma é seletivamente induzida pela infecção por *Mtb*, já que a expressão de MMP-1 está associada à TB ativa e não à infecção latente, podendo estar correlacionada com a gravidade clínica da doença. Pacientes com TB pulmonar ativa apresentam níveis mais elevados de MMP-1 do que indivíduos saudáveis ou indivíduos com a forma latente (ANDRADE *et al.*, 2015), bem como esta enzima está up-regulada em macrófagos isolados a partir de tecidos infectados com o bacilo (PARASA *et al.*, 2017) e a expressão de MMP-1 é especificamente maior em cavidades em comparação com lesões granulomatosas (KUBLER *et al.*, 2015).

Reativos Intermediários de Oxigênio (ROI) e Reativos Intermediários de Nitrogênio (RNI) também são considerados importantes na patogênese da doença. Os macrófagos ativados geram radicais OH que são tóxicos para o *Mtb*. Após a inalação de *Mtb*, os macrófagos alveolares fagocitam os bacilos e iniciam a sua morte usando vários mecanismos, incluindo a geração de ROI e RNI os quais reagem com uma ampla gama de moléculas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos, resultando na morte do bacilo (MORTAZ *et al.*, 2015). No entanto, isso pode se tornar prejudicial para a própria célula hospedeira e pode promover lesão tecidual e inflamação nos indivíduos afetados e aumento de íons de cálcio intracelular e danos no DNA. Tal dano é controlado pela indução de mecanismos de defesa antioxidante (DANDEKAR *et al.*, 2017; MALIK *et al.*, 2014).

Na infecção com o *Mtb* os macrófagos, que são importantes células efetoras na imunidade contra bactérias intracelulares, reconhecem as micobactérias via Toll-Like Receptor (TLR) seguido de fagocitose e controle do crescimento micobacteriano (KHAN *et al.*, 2016). A imunidade mediada por células T é o principal mecanismo de resposta contra a TB e é mediada principalmente por uma resposta imune do tipo T helper (Th)-1 com níveis elevados de IL-12 e IFN- γ (LIM *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2016; SINGH, 2012; KLEINNIJENHUIS *et al.*, 2011) e produz várias citocinas pró-inflamatórias como Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6 que estão envolvidas no processo de morte do *Mtb* (HOSSAIN e NORAZMI, 2013).

Os macrófagos não-ativados são o habitat habitual do *Mtb*, que resiste no ambiente intracelular, bloqueando a fusão do fagossoma com o lisossomo, evitando assim a sua exposição ao pH baixo e a radicais oxidativos, importantes para sua destruição. Os macrófagos ativados por IFN- γ transpõem esse bloqueio, sendo assim, o IFN- γ é a citocina principal envolvida na resposta imunológica protetora inicial contra a infecção micobacteriana (CAVALCANTI *et al.*, 2012).

HOSSAIN e NORAZMI, 2013 afirmam que as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo reconhecimento micobacteriano de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) são os responsáveis por regular os mecanismos antimicobacterianos nos macrófagos, através da geração RNI e de ROI, e que o IFN- γ juntamente com o TNF- α aumenta a expressão de Óxido Nítrico Sintase 2 (NOS2) e a indução da produção de RNI no fagolisossomo, mediando a morte do *Mtb* intracelular (HOSSAIN e NORAZMI, 2013).

No processo de controle da infecção por micobactérias também há o envolvimento do TNF- α , que é produzido por células como os macrófagos ativados, linfócitos T e células dendríticas. Em sinergia com o IFN- γ esta citocina estimula a produção de radicais oxidativos, bem como induz a produção de quimiocinas que atraem as células imunes para o local da infecção, contribuindo assim com a formação do granuloma, bem como medeia a morte micobacteriana através do recrutamento de linfócitos T CD4+ (CAVALCANTI *et al.*, 2012; HOSSAIN e NORAZMI, 2013),

O nível de Proteína C Reativa (PCR) circulante geralmente reflete o grau de inflamação sistêmica, e Miranda *et al.* (2017) demonstraram que os níveis de PCR aumentaram nos pacientes com TB e diminuíram durante os primeiros 60 dias de tratamento, o que o levou a especular que o dano inflamatório do tecido provocado pela patologia pode desencadear uma produção robusta desta citocina (MIRANDA *et al.*, 2017). Já a Interleucina-6 (IL-6) desempenha, por vezes, no sistema imune múltiplos papéis incluindo inflamação, e a produção de citocinas como o TNF- α que são consideradas citocinas de proteção (HOSSAIN e NORAZMI, 2013). A Interleucina-10 (IL-10) por sua vez desativa a função dos macrófagos e leva a diminuição de ROI e RNI, regulando negativamente IL-12 e TNF- α , com a consequente redução de IFN- γ pelas células T, facilitando de tal modo a sobrevivência do *Mtb* (HOSSAIN e NORAZMI, 2013).

A proteína de alta mobilidade do grupo box1, do inglês High-Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) é uma citocina crucial que medeia a resposta à infecção, lesão e inflamação além de promover a produção local de citocinas Th-1 como TNF e IFN- γ (LOTZE, 2005; GROVER, 2013), em seus estudos Magryś (2012) e Zeng (2015), demonstraram que pacientes com TB pulmonar ativa apresentaram concentrações maiores de HMGB-1 quando comparados aos os controles saudáveis (MAGRYŚ, 2012; ZENG, 2015), sugerindo que o nível elevado da citocina pode estar relacionado à atividade de resposta inflamatória causada pela infecção pelo bacilo (ZENG, 2015), ao passo que KIM *et al.*, (2017) demonstraram que esta citocina é mais baixa nos pacientes com TB pulmonar ativa quando comparados aos controles saudáveis e aos pacientes infectados com Micobactéria Não Tuberculosa (MNT), e que os pacientes com doença estável apresentaram níveis menores do que aqueles com doença progressiva (KIM *et al.*, 2017).

Estudos em pacientes com TB ativa demonstraram diminuição das concentrações sistêmicas de antioxidantes e aumento da geração espontânea de radicais livres em comparação com indivíduos sem TB, refletindo o estresse oxidativo excessivo associado com esta doença. A Heme Oxigenase (HO-1) é um importante anti-oxidante altamente expresso em tecido do pulmão e é uma enzima chave de resposta ao estresse, que degrada moléculas de heme livre liberando assim o ferro, o monóxido de carbono (CO) e a biliverdina. A expressão de HO-1 é regulada positivamente e nos pacientes é um potencial biomarcador da doença ativa (COSTA *et al.*, 2016).

Andrade *et al.* (2013) demonstraram que indivíduos com TB pulmonar ou extrapulmonar ativa apresentam níveis sistêmicos significativamente mais elevados de HO-1. Entre aqueles com TB pulmonar ativa, os indivíduos com lesões pulmonares bilaterais tinham níveis sistêmicos de HO-1 superiores aos encontrados em pacientes com lesões unilaterais, indicando uma possível relação entre HO-1 e a extensão anatômica da doença. As concentrações de HO-1 também tendem a ser mais elevadas em indivíduos com maior carga bacilar no escarro (ANDRADE *et al.*, 2013).

O Heme desencadeia a produção de ROI tóxicas aos bacilos de *Mtb* e, portanto, o bloqueio da sua degradação pela HO-1 pode resultar em maior produção desses metabólitos e, conseqüentemente, maior morte bacteriana (COSTA *et al.*, 2016). A expressão de HO-1 induzida por *Mtb* requer produção de ROI dependentes de NADPH oxidase (ANDRADE *et al.*, 2017). A inibição química de HO-1 reduz a produção de

citocinas inflamatórias por macrófagos humanos e restringe o crescimento intracelular de micobactérias. Assim, a indução de HO-1 pela infecção por *Mtb* pode ser um mecanismo de virulência micobacteriana para aumentar a inflamação e o crescimento bacteriano (SCHARN *et al.*, 2016).

Após o tratamento há queda dos níveis plasmáticos de HO-1, retornando-se aos níveis normais após a quimioterapia anti-TB de sucesso. No entanto, indivíduos em falha terapêutica os níveis de HO-1 não se alteram significativamente, demonstrando assim a utilização da HO-1 como um potencial biomarcador (ANDRADE *et al.*, 2013). Porém ainda não há biomarcadores derivados do hospedeiro bem estabelecidos e que sejam confiáveis para determinar o tratamento bem sucedido (MIRANDA *et al.*, 2017)

2.4. BIOMARCADORES

Um biomarcador é definido como um indicador de uma determinada condição fisiológica normal ou fisiopatológica que pode informar sobre o prognóstico, a eficácia terapêutica e a evolução da patologia, sendo relevantes a sensibilidade e a especificidade em sua interpretação (BENVENISTE, 2019).

Em um estudo realizado por Chandrashekara *et al.* (2016) observou-se que a alteração do equilíbrio nos níveis de citocinas séricas pode ser indicativo da patogênese da TB. Assim, o perfil dinâmico de mudanças nos níveis de citocinas facilitaria um possível uso em estratégias efetivas de diagnóstico e tratamento da doença. (CHANDRASHEKARA *et al.*, 2016).

Até recentemente, níveis elevados de produção de IFN- γ no Ensaio de Liberação de Interferon-gama (IGRA) por estímulo com antígenos específicos do complexo *M. tuberculosis* em comparação com ausência de estímulo constituíam o único biomarcador associado ao aumento do risco de desenvolver ou estar com tuberculose (ANDREWS *et al.*, 2015). Entretanto, o IGRA falha em discriminar entre a infecção latente e a doença ativa, o que é uma grande desvantagem (MAERTZDORF *et al.*, 2015).

Biomarcadores poderão ser ferramentas críticas para encontrar novas abordagens para o controle da disseminação da tuberculose (ARAUJO *et al.*, 2019), principalmente na TBMR em que o paciente apresenta muitos efeitos colaterais adversos, utiliza em seu esquema terapêutico drogas de alto custo, algumas injetáveis, além de apresentar maior

taxa de morte (WHO, 2017). Os biomarcadores poderiam ser utilizados como ferramenta para o diagnóstico precoce de falha terapêutica e indicativo de mudança de esquema terapêutico, que atualmente é realizada apenas aos 12 meses de tratamento, com base em resultados positivos para cultura e baciloscopia (WHO, 2017).

O estabelecimento de biomarcadores associados à doença ativa, juntamente com o diagnóstico precoce e preciso da TB, poderá permitir o desenvolvimento de estratégias de controle da disseminação e monitoramento do tratamento para prevenir a progressão para estágios avançados da doença (WEINER *et al.*, 2018; MAERTZDORF *et al.*, 2015). Desta forma, o presente trabalho pretende contribuir para a investigação de potenciais biomarcadores de falha terapêutica em pacientes com TBMR, apresentando um estudo exploratório da evolução de níveis de mediadores plasmáticos implicados na patogênese da tuberculose.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os níveis séricos de moléculas relevantes para a imunopatogênese da tuberculose em uma coorte de pacientes com tuberculose multirresistente (TBMR), como potenciais biomarcadores da falha terapêutica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de biomarcadores séricos em indivíduos com TBMR em diferentes tempos de tratamento.
- Avaliar a possível associação entre os achados e desfecho clínico, extensão e gravidade da doença.
- Identificar possíveis biomarcadores precoce de falha terapêutica.

4. METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional com coorte prospectiva, com seguimento de 18 meses. O recrutamento foi realizado preferencialmente concomitante ao diagnóstico de TBMR, de forma a iniciar as análises no tempo zero de tratamento. Porém, foi estabelecida uma tolerância de até seis meses após o início do tratamento. Os tempos de acompanhamento foram: 0, 2 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses e 18 meses após o início do tratamento (Quadro 1). Para os pacientes recrutados após o início do tratamento foi realizada a coleta no momento do recrutamento e as demais coletas seguiram os tempos estabelecidos. A escolha dos períodos de avaliação levou em consideração a cinética esperada de negatificação da baciloscopia e cultura (em até 2 meses para um tratamento com curso favorável ou até seis meses como tempo limite antes de considerar a necessidade de mudança de esquema terapêutico), o período mínimo para a indicação de falha terapêutica (12 meses) e o período mínimo para alta por cura (18 meses), além de um tempo intermediário entre o prazo máximo de negatificação da baciloscopia/cultura e o primeiro ponto para avaliação de possível falha terapêutica (9 meses). A tolerância para a coleta em cada um desses pontos foi de 30 dias, por questões logísticas em função do agendamento das consultas no Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM).

Fluxograma 1. Cronograma de coletas de seguimento dos pacientes com TBMR participantes do estudo.



4.2 CENÁRIO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM), localizado na Praça Conselheiro João Alfredo, S/N, Bairro do Pau Miúdo, Salvador, Bahia. O HEOM é uma unidade de atenção terciária de referência em patologias respiratórias. A clientela atendida inclui pessoas provenientes de todo Estado da Bahia.

Porém, 80 % das pessoas atendidas residem na macrorregião leste do estado, onde está localizada a cidade de Salvador.

O estudo foi conduzido no Ambulatório de Tisiologia que é integrante do Programa de Controle da Tuberculose (PCT) no estado da Bahia, bem como em pacientes que estavam internados neste mesmo hospital. Atualmente o HEOM realiza o tratamento de acompanhamento da maioria dos casos de TBMR no estado.

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A nossa população de estudo é composta por pacientes atendidos no HEOM, preferencialmente recém-diagnosticados com TBMR, ou em tratamento, desde que não tenham iniciado o esquema de tratamento para TBMR há mais de 6 meses. Previu-se a inclusão de 20 a 25 pacientes recém-diagnosticados com TBMR, além de até 10 pacientes com tratamento já iniciado para TBMR, totalizando 30 pacientes. Dessa forma pretendíamos compensar possíveis perdas oriundas da desistência em participar do estudo ou abandono do tratamento durante o seguimento dos sujeitos da pesquisa.

4.3.1 Descrição do recrutamento realizado

O recrutamento para a participação no estudo constou de uma etapa de esclarecimento ao potencial participante, envolvendo informações sobre a sua doença e sobre os objetivos e procedimentos do estudo. Após este contato foi oferecido o estudo, cuja aceitação foi documentada por assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Ao potencial participante foi facultado a aceitação do estudo após discussão com seus familiares ou outras pessoas próximas de sua confiança. Os indivíduos que aceitaram participar do estudo foram submetidos à primeira entrevista e à coleta de sangue.

4.3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes ambulatoriais ou internados, de ambos os sexos, atendidos no HEOM, com TB pulmonar confirmada por radiografia, mostrando infiltrações ou cavitações, com baciloscopia positiva, e que tinham realizado o Teste Rápido Molecular (TRM) GeneXpert ou cultura tipificada para o *M. tuberculosis* com

teste de sensibilidade aos fármacos de primeira linha (TSI) demonstrando resistência a ambas rifampicina e isoniazida. Critérios adicionais para a inclusão foram: período de tratamento inferior a 6 meses (preferencialmente sem tratamento prévio à coleta); e idade acima de 15 anos. Foram excluídos os participantes cujo resultado de TSI fosse discordante com o GeneXpert ou para os quais não tenha sido possível fazer o TSI por problema técnico; pacientes não aderentes ao tratamento em vigência e pacientes gestantes.

4.4 COLETA DE DADOS

4.4.1 Características sócio-demográficas e clínicas

Características sócio-demográficas e clínicas foram obtidas a partir de entrevista aos pacientes ou fontes secundárias utilizando questionário padronizado. A coleta de informações sócio-econômica e demográfica foi executada utilizando instrumento de coleta de dados padronizado, por pessoal devidamente treinado, por entrevista ou consulta a fontes secundárias de dados (prontuário do paciente ou informações no Sistema de Informação de Tratamentos Especiais da Tuberculose - SITE TB). Foram obtidos em prontuários os resultados de avaliações no escarro incluindo a baciloscopia, a cultura e o teste de sensibilidade do bacilo aos fármacos de primeira e segunda linha (TSI e TSII), realizados respectivamente no Laboratório Central do Estado da Bahia e no Centro de Referência Professor Hélio Fraga, além de informações sobre comorbidades, histórico de tuberculose pregressa, adesão ao tratamento e evolução clínica. Os desfechos clínicos avaliados são os resultados do tratamento, a evolução clínico-radiológica e o tempo de persistência de cultura positiva.

4.4.2 Análises laboratoriais

O sangue dos pacientes foi coletado nos tempos de 0, 2 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses e 18 meses em tubos seco de 4 mL para a obtenção soro, tubos com o anticoagulante EDTA de 4 mL para obtenção do plasma e pellet, a partir de centrifugações a 2.500 rpm durante 10 minutos, os soros e plasmas foram congelados em tubos eppendorfs de 1 mL e armazenado no freezer a -20°C e os pellets dos tubos de EDTA

foram armazenados em tubos de eppendorfs de 1 mL no freezer a -80°C . Foi coletado sangue no tubo de heparina de 10 mL para separação do plasma heparinizado através de centrifugações a 1.500 rpm por 5 minutos, e após isso o sangue foi diluído na proporção de 1:1 com salina estéril e levado a centrifugação a 1.200 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente, por meio do gradiente ficoll (Histopaque-1077 Sigma) para obtenção do anel de células que após processo de lavagens, um a 1.000 rpm por 10 minutos a 4°C e outra vez a 1.500 rpm por 10 minutos a 4°C com salina estéril gelada, separaram as Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs) e armazenou-se no freezer a -80°C em criotubos em meio com Soro Bovino Fetal e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) até os testes.

MMP-1, MMP-8, IL-28B, IL-1ra, HO-1 (R&D systems); PCR, Ensaio antioxidante (CaymanChemical); HMGB-1 (MyBioSource) foram determinados no plasma heparinizado por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando os kits de acordo com as instruções dos fabricantes.

Tabela 1. Mediadores analisados através do ELISA.

Mediadores analisados em ELISA	Função
PCR	A proteína C reativa (PCR) é uma proteína inflamatória inespecífica (proteína de fase aguda) que geralmente está elevada em pacientes com tuberculose.
IL-1 RA	Receptor Antagônico da IL-1, atua antagonizando o efeito inflamatório da IL-1.
GUANIDINA	Compostos nitrogenado que possui propriedades antioxidantes para reduzir a tensão oxidativa, quando induzida no soro do sangue utilizada para avaliar a capacidade antioxidante global.
HMGB-1	Possui capacidade para ligar e distorcer o DNA, mas não são por si fatores de transcrição, tem por principal função intranuclear distorcer a dupla hélice bruscamente para permitir as interações físicas adequadas entre muitos fatores de transcrição diferentes e a cromatina.
HO-1	Anti-oxidante altamente expresso em tecido do pulmão e é uma enzima chave de resposta ao estresse, que degrada moléculas de heme livre
MMP	Conjunto de proteínases que atuam sobre as proteínas decompondo-as em péptidos e aminoácidos, desempenhando um papel fundamental no processo de cicatrização. Degradação enzimática e destruição do tecido pulmonar.
IL-28	Pertence a família do IFF- λ produzidas principalmente pelas PBMCs e está relacionada ao aumento da atividade inflamatória.

Para o ensaio de CBA (Cytometric Bead Array System), foi utilizado o kit de Citocinas Inflamatórias Humanas BD, para medir quantitativamente as interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina10 (IL-10), Fator de

Necrose Tumoral (TNF) nas amostras de soro dos pacientes, de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 2. Mediadores analisados através do CBA.

Mediadores Analisados no CBA	Função
IL-1	Mediadora da inflamação local, induz a produção de neutrófilos.
IL-6	Citocina com potente atividade antiviral. Estimula a síntese de proteínas de fase aguda, produção de neutrófilos, crescimento de linfócitos B e inibe a geração de células t reguladoras.
IL-8	Secretada por vários tipos de células, em resposta a estímulos inflamatórios. Quando liberada na circulação, IL-8 atrai neutrófilos, basófilos, linfócitos T, e promovem a angiogênese até o foco infeccioso.
IL-10	Regula a resposta imune através do controle das reações da imunidade natural e da imunidade mediada por células Th1, inibe a síntese de outras citocinas, como o IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- β .
TNF	Mediador de resposta inflamatória aguda. Estimula a atividade microbicida de neutrófilos e macrófagos.

4.5 PROPOSTA DE ANÁLISE

Foi montado um banco de dados utilizando o software EpiData, versão 3.1 com as informações coletadas. Os resultados das dosagens laboratoriais foram igualmente inseridos em banco de dados neste mesmo programa.

As variáveis categóricas foram descritas com relação à sua frequência absoluta e relativa e razão de prevalência (RP) comparando o grupo com desfecho desfavorável (falha terapêutica, mudança de esquema, óbito e positividade na baciloscopia aos 2 meses) ao grupo com desfecho favorável (alta por cura e tratamento completo). As variáveis contínuas foram descritas por sua média e desvio-padrão ou mediana e intervalo interquartil, para variáveis paramétricas e não-paramétricas respectivamente.

Comparações entre medidas realizadas em diferentes tempos foram realizadas utilizando-se a ANOVA para medidas repetidas (para distribuições paramétricas) ou o teste de Friedman (para distribuições não paramétricas). Comparações post-hoc foram realizadas para identificar diferenças entre os subgrupos (pós-teste de Sidak-Newman-Keuls (SNK) para ANOVA ou pós-teste de Dunn para teste de Friedman). Foi também

analisada a possível correlação entre os níveis de citocinas e outros mediadores envolvidos na resposta imune contra a infecção micobacteriana, utilizando o teste de Mann-whitney.

Para todas as comparações, as diferenças foram consideradas significativas para erro alfa inferior a 0.05%.

4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo constitui um subprojeto associado a projeto em andamento com esta coorte de voluntários, intitulado “Associação entre níveis plasmáticos de hemoxigenase-1 (HO-1) e evolução clínica de pacientes com tuberculose multirresistente (TBMR)”, aprovado pelo Comitê de Ética do IGM (CAAE 08481112.5.0000.0040).

O protocolo foi conduzido observando a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que regulamenta as condutas em pesquisas envolvendo seres humanos.

Todos os indivíduos que consentiram participar do estudo foram informados sobre quais os objetivos do estudo e assinaram o TCLE. A guarda dos questionários, TCLEs e códigos necessários para associação dos dados e identificação dos pacientes foi realizada no IGM, que dispõe de infraestrutura que permite a guarda sigilosa destas informações pela equipe de pesquisa. Todas as análises de dados desse estudo foram realizadas com as informações codificadas, com acesso exclusivo pela equipe de pesquisa.

5. RESULTADOS

5.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Trinta e três pacientes foram recrutados para o estudo, dos quais 11 tinham sido recém-diagnosticados (virgens de tratamento). Dois pacientes foram excluídos por apresentarem cultura negativa para *Mtb* e outros dois pacientes foram excluídos por apresentarem isolados sensíveis aos fármacos de primeira linha, apesar da falha documentada ao esquema terapêutico. Um paciente foi excluído por apresentar tuberculose resistente a ofloxacino, e ter sido tratado com esquema terapêutico para tuberculose extremamente resistente (XDR), de forma que o seu tratamento diferiu dos demais pacientes nos períodos de avaliação. Houve três perdas de seguimento, sendo que destes dois pacientes não compareceram às consultas no prazo previsto e não se conseguiu contato com os mesmos, e um paciente desistiu de participar do estudo. Um paciente veio a óbito ainda durante o tratamento. Vinte e um pacientes atingiram 12 meses de seguimento, sendo que vinte completaram os 18 meses de seguimento previstos e um teve alta por cura com base no histórico clínico de progressão da doença, porém não compareceu à consulta de 18 meses. Um paciente faleceu logo após o término do tratamento e dois pacientes apresentaram falha do tratamento para TBMR, cinco apresentaram baciloscopia positiva no segundo mês de tratamento, sendo considerados pacientes com desfecho desfavorável, juntamente com o paciente que faleceu antes dos 18 meses previstos de tratamento. As características sócio-demográficas e clínicas são descritas na tabela 1, estratificadas por pacientes com desfecho favorável (alta por cura) e pacientes com desfecho desfavorável.

A maioria dos participantes são homens, e a média de idade é de 42 anos. Os estratos sócio-econômicos mais frequentes são os estratos D e E. Sete pacientes referiram consumo de bebidas alcoólicas, sendo 5 positivos a pelo menos um componente do questionário CAGE (*Cutdown, Annoyedbycriticism, Guiltyand Eye-opener*) (ABEP,2015). Sete participantes referiram uso de drogas ilícitas não injetáveis, dos quais 2 referiram uso combinado ao álcool. A grande maioria dos participantes (96%) referiu perda de peso corporal acima de 10% nos últimos trinta dias, na ausência de diarreia. Quatro participantes são diabéticos, dos quais um obteve desfecho desfavorável por falha terapêutica; 1 é hipertenso e 1 participante referiu infarto agudo

do miocárdio antes do início do tratamento. Dois participantes estão co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Tabela 3. Características sócio-demográficas dos pacientes com TBMR.

Variável	Desfecho favorável N=14	Desfecho desfavorável N=9
Sexo		
Masculino	10 (71%)	6 (67%)
Idade¹	42 (17 - 66)	44.4 (28 - 61)
Escolaridade		
Analfabeto	1 (7%)	1 (11%)
Ensino fundamental incompleto	7 (50%)	5 (56%)
Ensino fundamental completo	2 (14%)	1 (11%)
Ensino médio completo	3 (22%)	2 (22%)
Ignorado	1 (7%)	0 (%)
Classe social²		
Classe B	1(7%)	0(0%)
Classe C	4(29%)	3(33%)
Classe D-E	9(64%)	6(67%)
Fuma		
Sim	1 (7%)	2 (22%)
Consome bebidas alcoólicas*		
Sim	3 (22%)	4 (44%)
Uso de drogas ilícitas		
Sim	3 (22%)	4 (44%)
Vacinado com BCG³		
Sim	12 (86%)	8 (88%)
IMC¹	20.3 (14.4 - 32.0)	19.9 (17.2 - 25.0)
IMC < 18.5	3(22%)	6(66%)
Diabetes		
Sim	2 (14%)	2 (22%)
HIV		
Sim	2 (14 %)	0 (0%)

¹ Média (intervalo de confiança a 95%); ²Segundo os critérios de Classificação Econômica Brasil (ABEP, 2015), ³ Todos com cicatriz vacinal, * 5 pacientes CAGE positivo.

No início de tratamento a maioria dos pacientes (62,5%) apresentaram baciloscopia positiva, sendo que destes, mais da metade apresentavam três cruces de baciloscopia (gráfico 1a). À medida em que o tempo de tratamento avança, o número de pacientes com negatificação da baciloscopia vai aumentando, chegando a um percentual de 70% após dois meses de tratamento e 89,5% após dezoito meses. Nenhum paciente apresentou três cruces de baciloscopia após dezoito meses de tratamento. Verificamos que 43% dos pacientes que possuíam lesão unilateral apresentaram baciloscopia positiva no tempo zero

de tratamento, e 67% dos pacientes com lesão bilateral no tempo zero de tratamento apresentaram baciloscopia positiva (gráfico 1b).

Observou-se ainda que ao longo do tempo, os pacientes evoluíram a lesão pulmonar, aumentando os casos de cavitação bilateral dos pulmões (gráfico 1 c).

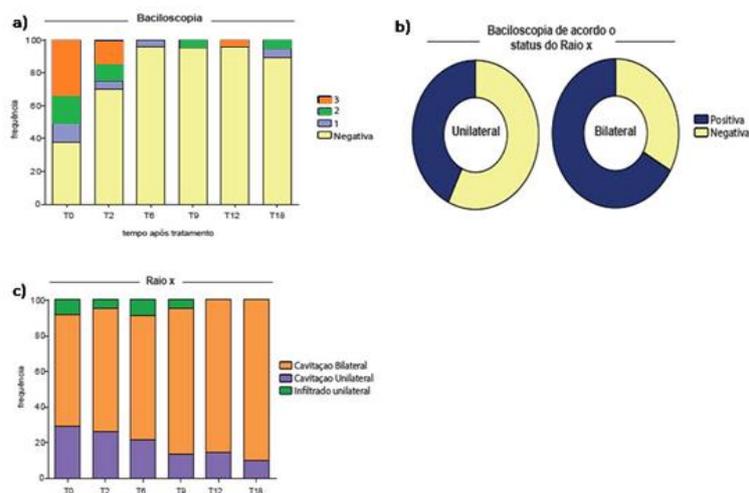


Gráfico 1. Características laboratoriais e radiológicas dos pacientes com TBMR.

5.2 RELAÇÃO DOS NÍVEIS DE HO-1 E MMP-1 COM O TEMPO DE TRATAMENTO.

Os níveis séricos de HO-1 e metaloproteinase de matriz (MMP)-1 foram avaliados durante o tratamento, sendo analisados estratificados por grupo de desfecho clínico (favorável x não favorável). Os resultados são apresentados nas Figuras 4 e 5.

É possível observar que os níveis de HO-1 e MMP-1 em geral são baixos em todos os períodos de avaliação, e diminuem no decorrer do tratamento, embora haja pacientes que se destacam com níveis mais elevados de MMP-1 (Figura 4).

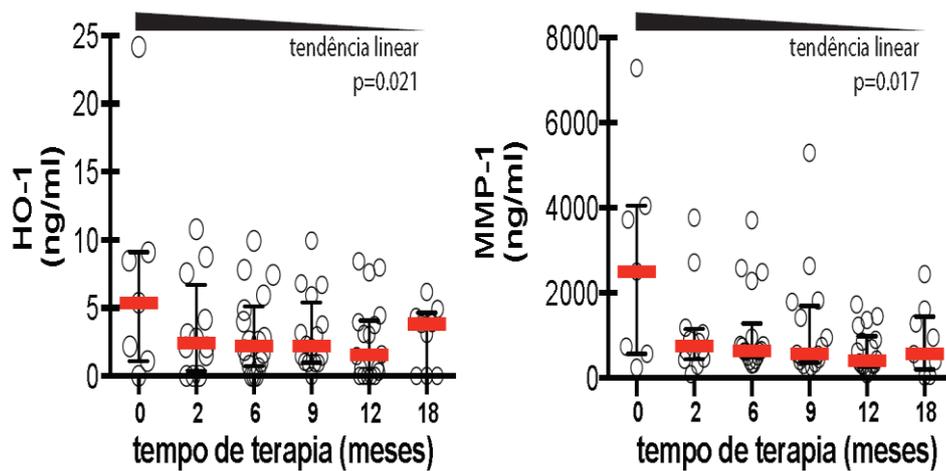


Figura 4. Níveis séricos de HO-1 e MMP-1 em pacientes com TBMR nos períodos de seguimento (tempo zero, dois meses, seis meses, nove meses, doze meses e dezoito meses). Os valores individuais são representados por círculos vazados, as medianas estão representadas por barras horizontais vermelhas e o intervalo interquartil está destacado em preto.

Não houve uma separação muito distinta entre os níveis de HO-1 e MMP-1 apresentados por pacientes com desfecho desfavorável em relação àqueles com desfecho favorável (Figura 5).

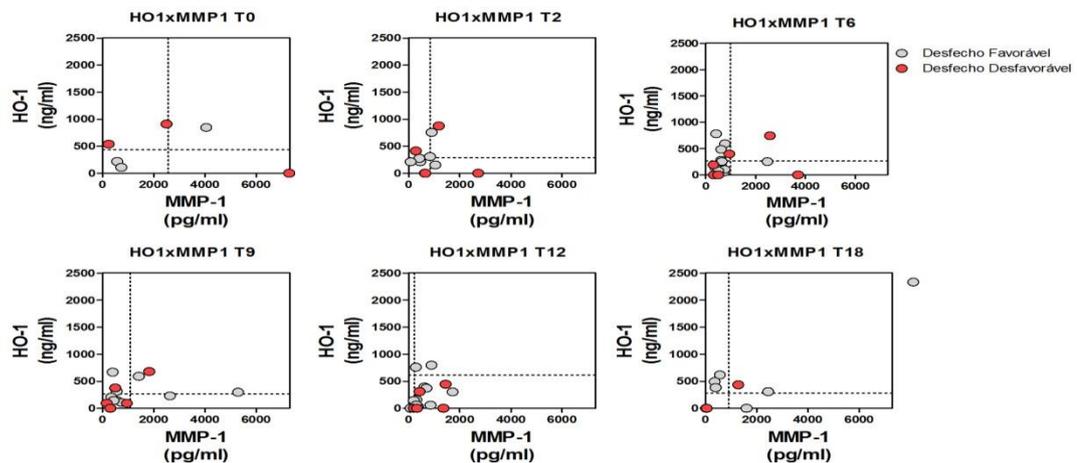


Figura 5. Níveis séricos de HO-1 e MMP-1 em pacientes com TBMR, estratificados por desfecho clínico (círculos cinza-claro – desfecho favorável; círculos vermelhos – desfecho desfavorável), nos períodos de seguimento (tempo zero, dois meses, seis meses, nove meses, doze meses e dezoito meses). As linhas pontilhadas representam o valor mediano de dosagem para cada uma das proteínas, considerando os valores obtidos em todos os tempos de avaliação.

5.3 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE OUTROS BIOMARCADORES DURANTE NO SEGUIMENTO.

Foram adicionalmente avaliados os níveis séricos de proteínas indicadoras de inflamação: proteína C reativa (PCR), interleucina(IL)-28B (também denominada interferon-lambda 3), e receptor alfa de IL-1 (IL1-RA). Foi dosada outra metaloproteinase de matriz, a MMP-8, e uma proteína nuclear associada à morte celular programada em contexto inflamatório, denominada *high mobility group box 1* (HMGB-1), que age como alarmina. Foi também avaliada a atividade antioxidante total no soro, utilizando um ensaio que compara a inibição da reação de oxidação de um substrato cromógeno por metamioglobina obtida com a amostra àquela alcançada com um análogo solúvel do tocoferol e outros marcadores inflamatórios como o TNF e as IL-1 β , 6, 8 e 10. Os níveis desses marcadores foram correlacionados temporalmente utilizando os resultados obtidos em todos os períodos de avaliação (Figura 6).

Verificamos que os níveis de MMP-8 comporta-se temporalmente de forma muito semelhante ao observado para HO-1 e MMP-1, IL-1RA e IL-28 sugerindo uma diminuição desses níveis com o tratamento, mas se mantinham níveis ainda elevados em alguns dos pacientes. Em relação a HMGB1, TNF e ao potencial antioxidante total do soro, os níveis máximos são obtidos dois meses após o início do tratamento, com uma tendência de queda ao longo do restante do tratamento. IL-8, IL-6 e IL-1 β apresentam níveis máximos aos dois meses, e os níveis diminuem ao longo do tratamento. A proteína C reativa apresenta níveis máximos antes do tratamento, e os níveis caem ao longo do tratamento. As demais moléculas estudadas não apresentam variação consistente ao longo do tratamento (Figura 6).

Observamos que após seis meses de tratamento houve maior diferenciação dos níveis das moléculas estudadas em comparação aos níveis pré-tratamento. Para algumas dessas moléculas, os níveis observados em períodos posteriores (nove e doze meses de tratamento) também diferiram, porém de forma menos intensa. Os níveis de MMP-1 apresentaram-se diferenciados apenas após doze meses de tratamento, e os níveis de IL-6 se distinguiram dos níveis pré-tratamento após nove meses de tratamento. Após 18 meses não houve diferença nas dosagens das moléculas avaliadas em relação aos níveis pré-tratamento. O tempo de seis meses foi então melhor avaliado enquanto a correlação com os marcadores.

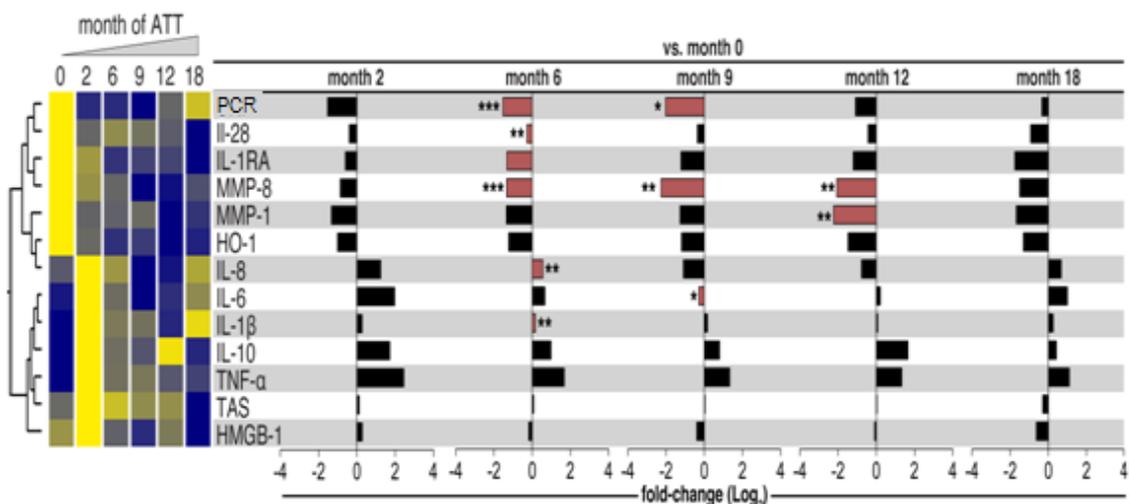


Figura 6. Níveis séricos de biomarcadores em pacientes com TBMR nos períodos de seguimento (tempo zero, dois meses, seis meses, nove meses, doze meses e dezoito meses) e comparação dos mesmos com o tempo zero de tratamento. A escala de cores representa a distância em desvios-padrão do valor médio obtido para o biomarcador nos soros dos participantes em cada tempo de avaliação em relação à concentração média do mesmo, considerando a distribuição total em todos os períodos avaliados. Os marcadores são agrupados no dendrograma em função da similaridade nos padrões temporais de concentração sérica. (* p valor = 0,05; **p valor = 0,01; ***p valor = 0,001).

A análise bivariada das correlações entre as moléculas são apresentadas na figura 7. No tempo zero, nós apresentamos que tem correlação positiva mais importantes entre HO-1 e MMP-8, HO-1 e PCR, IL-1 β e IL-6, IL-1RA e IL-28, IL-1RA e TNF- α , IL-28 e IL-8, IL-28 e TNF- α e entre IL-8 e TNF- α , essas correlações não se mantêm no demais tempos de seguimento, exceto pela correlação IL-1RA e IL-28 após seis meses de tratamento. No tempo de dezoito meses após o tratamento, surgem as correlações IL-1 β e TNF- α e a correlação de MMP-8 com Atividade antioxidante.

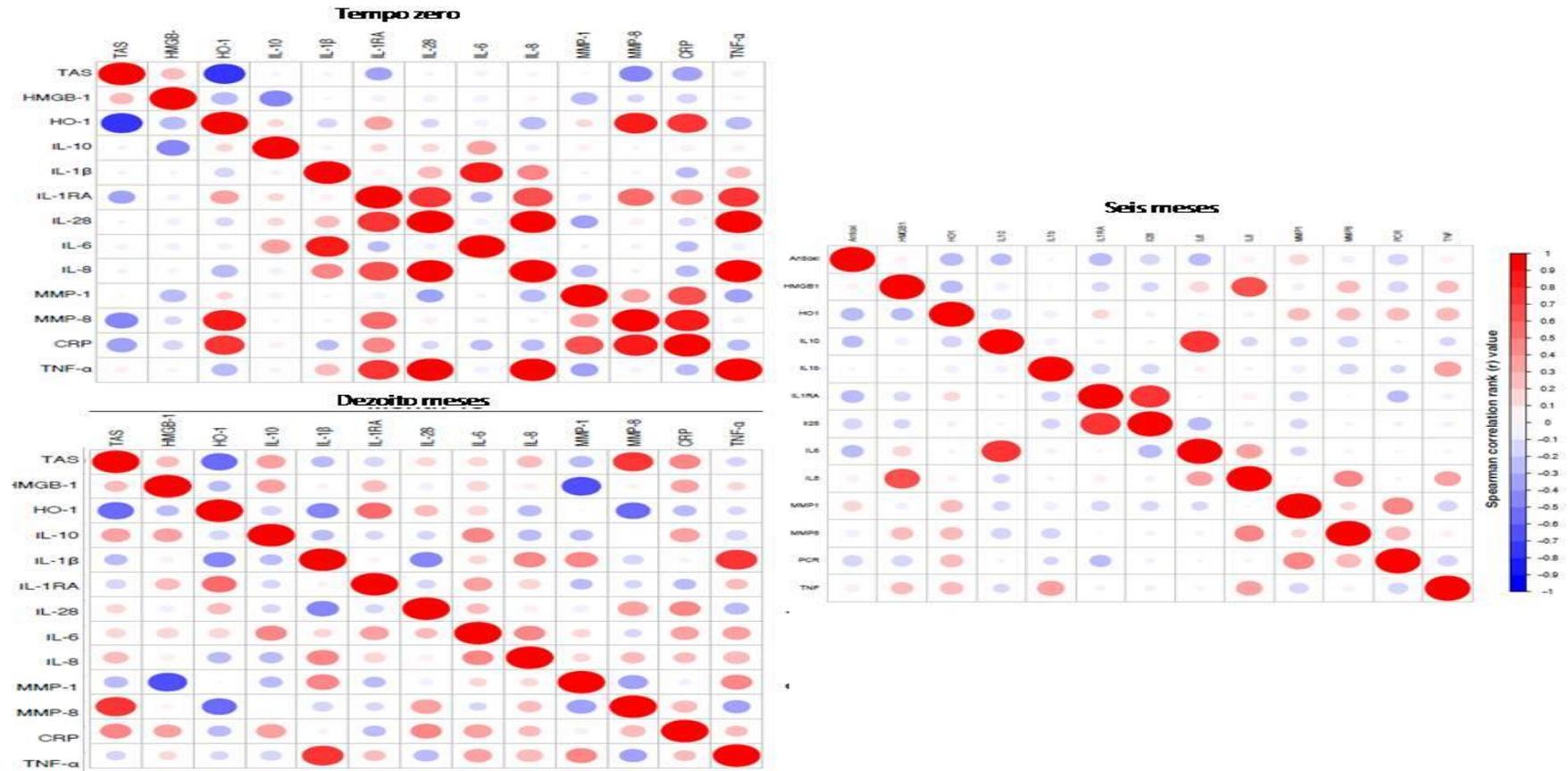


Figura 7. Matriz de correlações dos biomarcadores no tempo de zero, seis e dezoito meses de tratamento. Circulos vermelhos representam correlação positiva, círculos azuis representam correlações negativas. O diâmetro está inversamente proporcional aop valor, e r está associado a intensidade da cor.

Realizamos uma análise univariada para analisar se existe correlação com os parâmetros clínicos entre os que tiveram desfecho desfavorável e desfecho favorável. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as proteínas e os desfechos clínicos (Figura 8).

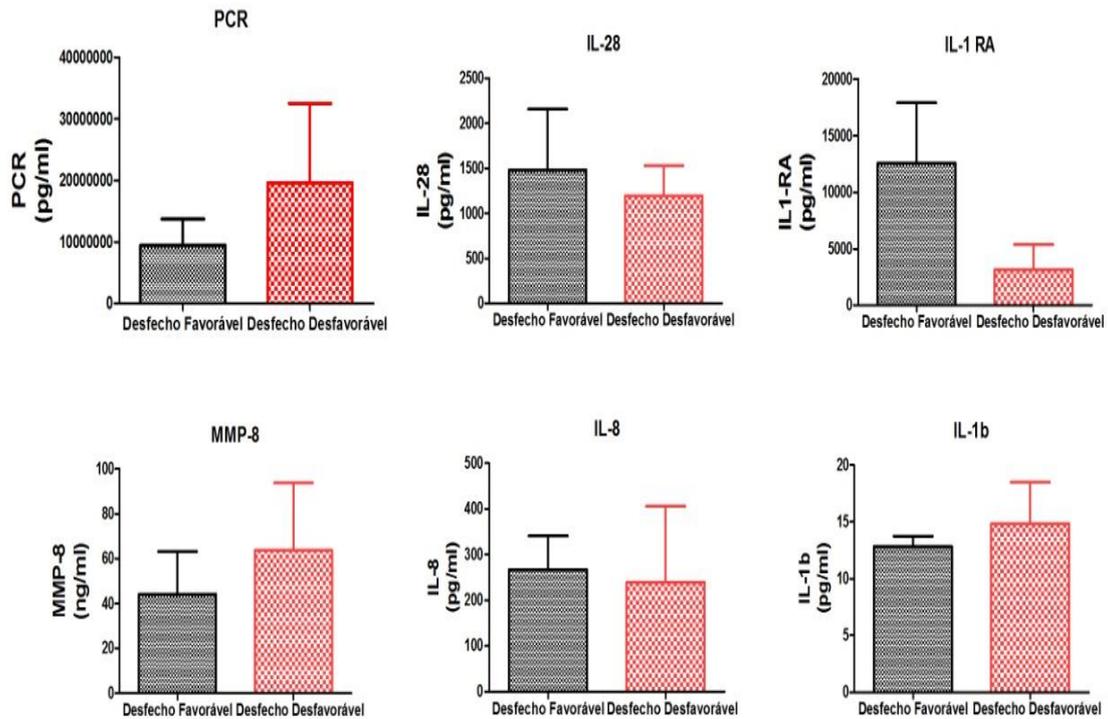


Figura 8. Níveis de citocinas comparando os grupos de desfecho do tratamento dos pacientes com TBMR aos seis meses.

A análise da correlação bivariada dos marcadores não mostraram um padrão claro. Não foram observadas separação muito distinta entre os níveis das proteínas apresentados por pacientes com desfecho desfavorável em relação àqueles com desfecho favorável (Figura 9).

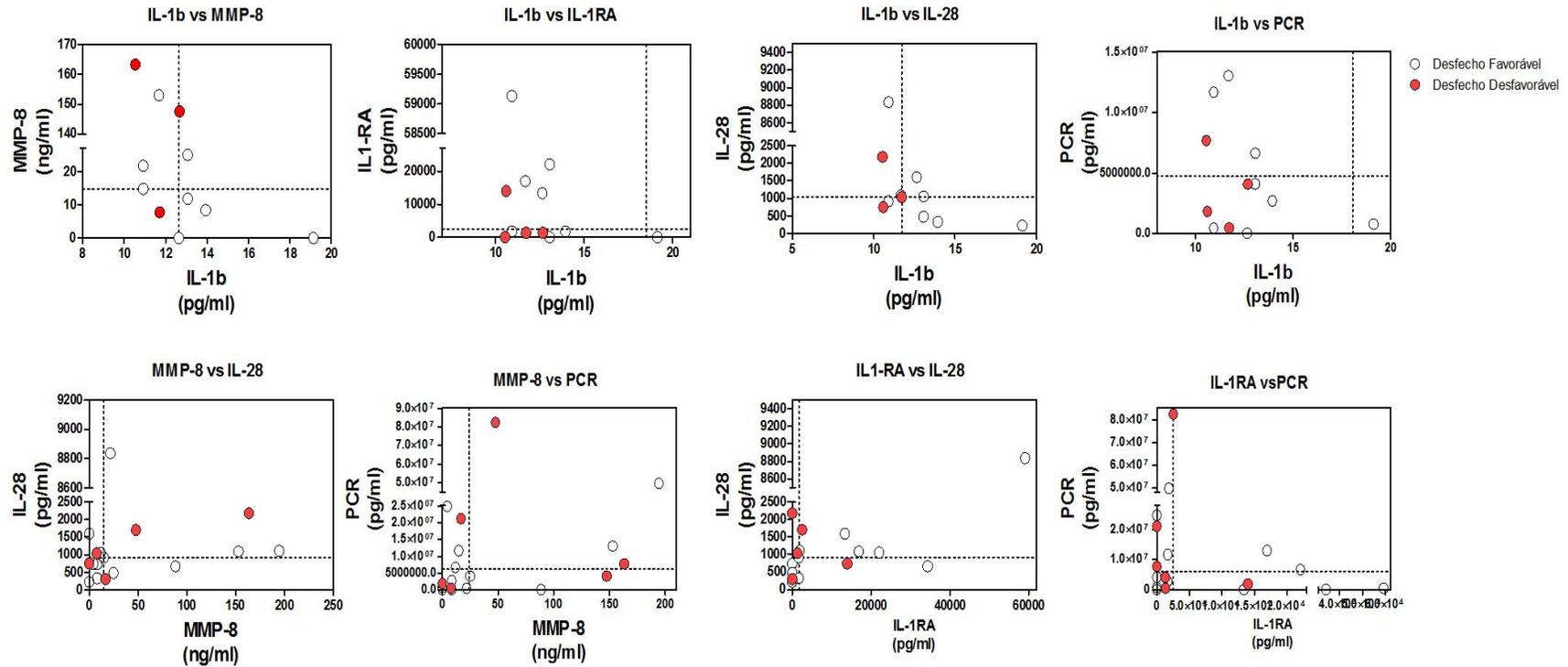


Figura9. Níveis plasmáticos de IL-28, IL-1RA, IL-8, IL-1 β , PCR e MMP-8 em pacientes com TBMR, estratificados por desfecho clínico. (círculos branco – desfecho favorável; círculos vermelhos – desfecho desfavorável), no período de seguimento de seis meses. As linhas pontilhadas representam o valor mediano de dosagem para cada uma das proteínas, considerando os valores obtidos em todos os tempos de avaliação.

6. DISCUSSÃO

Os pacientes recrutados apresentaram características sócio-econômicas e demográficas bastante similar aos encontrados ao redor do mundo, que normalmente são do sexo masculino, possuem baixa escolaridade, e baixa renda, mas diferem com relação ao percentual de cura (WHO, 2017). Essa coorte surpreendentemente teve uma taxa de cura muito mais alta do que o esperado, no qual um estudo de coorte realizado em 2014 demonstrou que a taxa de cura foi de 54% (WHO, 2017), que no nosso estudo pode estar relacionada a um viés de seleção (participantes com maior adesão ao tratamento e maior observância de cuidados à saúde podem ter aceito o estudo em maior proporção, entre a população com TBMR), o que prejudicou um pouco a nossa análise em relação ao desfecho clínico. Devido a isso determinamos e avaliamos como desfecho clínico desfavorável aqueles que apresentaram manutenção da baciloscopia do escarro positiva após dois meses de tratamento, mudança de esquema terapêutico por falha terapêutica e óbito.

Os pacientes com TBMR apresentam níveis séricos mais modestos de marcadores associados à resposta inflamatória do que os previamente observados em pacientes com TB sensível a fármacos de primeira linha (ANDRADE, 2013; 2015).

Os baixos níveis de HO-1 e MMP-1 podem estar correlacionados ao elevado tempo de doença e cronicidade da mesma nos pacientes com TBMR, onde a maioria possui resistência secundária aos fármacos. Isso poderia justificar a ausência do padrão observado em TB sensível. Em outras patologias, como a infecção na fase aguda por *Strongyloides stercoralis*, ocorre aumento nos níveis de HO-1 e MMP-1 (ANDRADE *et al.*, 2015; RAJAMANICKAM, *et al.*, 2016). A atividade excessiva de MMP-1 poderia aumentar o risco de disseminação de *Mtb* (ZHOU *et al.*, 2017).

O tempo de seis meses foi o período em que se teve uma maior diferença na expressão da PCR, IL-28, IL-1RA, MMP-8, IL-8 e IL-1 β . Já foi demonstrada associação entre o aumento da carga micobacteriana em pacientes com TB e o aumento dos níveis de IL-1 β (VINHAES *et al.*, 2019). Em um estudo com macrófagos derivados de monócitos co-infectados com TB e HIV foi demonstrado aumento na produção de IL-8 quando comparado com macrófagos não infectados (CHOL *et al.*, 2019). Também se

verificou níveis aumentados de PCR nos pacientes com TB, que diminuem após 60 dias de tratamento (MIRANDA *et al.*, 2017). Por outro lado, em nosso estudo, PCR e MMP-8 permaneceram aumentados, respectivamente, por mais 3 e 6 meses, quando comparados ao pré-tratamento, sugerindo que, se estes se confirmarem como bons biomarcadores, seria possível um melhor monitoramento para determinação do prognóstico clínico.

Ao comparar os participantes classificados como desfecho desfavorável em relação aos classificados como desfecho favorável, as análises univariadas não demonstraram diferença estatística. A possibilidade de uma diferença na expressão de IL-1RA nos pacientes com desfecho favorável quando comparado aos pacientes com desfecho desfavorável deve ser investigada, pela amplitude dos níveis obtidos e frente ao baixo poder da nossa amostra. Em um estudo realizado com crianças com pneumonia na Índia observou-se níveis de IL-1RA mais elevados para crianças com desfechos desfavoráveis que apresentavam determinado genótipo (AWASTHI *et al.*, 2018). Igualmente, nas análises bivariadas, não foi possível distinguir padrões, fazendo-se necessário uma nova investigação em uma coorte com maior frequência de ocorrência de desfechos desfavoráveis com implicações no tratamento (em termos de tempo até a negatificação da carga bacilar, falha terapêutica e óbito).

Os estudos que trabalham com coorte de pacientes com TBMR, analisando biomarcadores, são muito escassos. Pretendemos validar nossos achados em estudo com uma coorte maior. Por outro lado, os biomarcadores avaliados e identificados como promissores são marcadores de inflamação, que estão relacionados ao dano tecidual (ANDRADE, 2015; 2017; KIM, 2017). Elementos relacionados à resposta T regulatória ao dano tecidual poderiam igualmente ser investigados como biomarcadores interessantes, possivelmente associados aos marcadores descritos no presente trabalho.

7. CONCLUSÃO

Os níveis das moléculas PCR, IL-28, IL-1RA, MMP-8, IL-8 e IL-1 β aos seis meses após o tratamento apresentam modificações significativas, quando comparados aos níveis pré-tratamento, e deverão ser melhor investigados quanto ao seu potencial como biomarcadores da evolução clínica em pacientes com TBMR. Não houve diferenciação nos níveis das moléculas quando comparamos desfechos clínicos favoráveis e desfavoráveis, provavelmente devido à baixa ocorrência de desfechos desfavoráveis em nossa coorte, o que poderá ser verificado em um novo estudo.

REFERÊNCIAS

- ABEP. Associação Brasileira de Empresas e Pesquisas. **Critério de Classificação Econômica BRASIL**.2015 Disponível em: <http://www.abep.org/Servicos/Download.aspx?id=09>. Acesso em: 15 maio 2018.
- ANDRADE,B.B. *et al.* Heme oxygenase-1 regulation of matrix metalloproteinase-1 expression underlies distinct disease profiles in tuberculosis. **Journal of Immunology**, v. 195, n. 6, p. 2763–2773. 2015.
- ANDRADE,B.B. *et al.* Plasma heme oxygenase-1 levels distinguish latent or successfully treated human tuberculosis from active disease. **PLoS ONE**,v. 8, n. 5, p. e62618. 2013.
- ANDRADE,B. B. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* induction of heme oxygenase-1 expression is dependent on oxidative stress and reflects treatment outcomes. **Frontiers Immunology**,v. 8, p. 542,2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00542.
- ANDREWS, J. R. *et al.* The Dynamics of QuantiFERON-TB gold in-tube conversion and reversion in a Cohort of South African adolescents.**American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 191, n. 5, p. 584–591,2015.
- ARAUJO,Z. *et al.* Evaluation of the transcriptional immune biomarkers in peripheral blood from Warao indigenous associate with the infection by *Mycobacterium tuberculosis*.**Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**,v. 52, p. e20180516,2019.DOI: 10.1590/0037-8682-0516-201.
- AWASTHI, S. *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist (*IL1RA*) gene polymorphism and levels associated with adverse outcome in severe community-acquired pneumonia in children: A hospital-based study in India. **Pediatric Pulmonology**, v. 53, 2018.
- BASILE,J. I. *et al.**Mycobacterium tuberculosis* multi-drug-resistant strain M induces IL-171IFN γ - CD41 T cell expansion through an IL-23 and TGF β - dependent mechanism in patients with MDR-TB tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, 2016. DOI: 10.1111/cei.12873.
- BENVENISTE,O. *et al.* Biomarkers in inflammatory myopathies – an expanded definition. **Frontiers in Neurology**, 2019.DOI: 10.3389/fneur.2019.00554.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Recomendações Para o Controle de Tuberculose no Brasil**. 2011. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculosis_brasil.pdf. Acesso em: 24 maio 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Brasil livre da tuberculose. Plano Nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública**. 2017. Disponível em:

<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/24/Plano-Nacional-Tuberculose.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2019.

CAVALTANTI, Y. V. N. *et al.* Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in development of pulmonary tuberculosis. **Pulmonary Medicine**, 2012, article ID 745483. DOI:10.1155/2012/745483.

CHANDRASHEKARA, S. *et al.* High IL-6 and low IL-15 levels mark the presence of TB infection: A preliminary study. **Cytokine**, v. 81, p. 57-62, 2016. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.02.003

CHOL, S. *et al.* Treatment of virulent *Mycobacterium tuberculosis* and HIV coinfecting macrophages with gallium nanoparticles inhibits pathogen growth and modulates macrophage cytokine production. **mSphere**, 2019.

COOPER A. M. Cell mediated immune responses in Tuberculosis. **Annual Review Immunology**, v. 27, p. 393–422, 2009.

COSTA, D. L. *et al.* Pharmacological inhibition of host heme oxygenase-1 suppresses *Mycobacterium tuberculosis* Infection *In Vivo* by a mechanism dependent on T Lymphocytes. **MBIO**, v. 7, n.5, p. e01675-16, 2016.

CREVEL, R. V. *et al.* Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**. p. 294–309, 2002. DOI: 10.1128/CMR.15.2.294–309.2002.

DALCOLMO, M.P. **Tratamento da Tuberculose Sensível e Resistente**. Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: http://www.sopterj.com.br/profissionais/_revista/2012/n_01/13.pdf. Acesso em: 25 maio 2019.

DANDEKAR, S.P. *et al.* Oxidative stress markers in tuberculosis and HIV/TB Co-Infection. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 8, p. BC24-BC28, 2017. DOI: 10.7860/JCDR/2017/28478.10473.

DAVIS, J. M.; RAMAKRISHNAN, L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. **Cell**, v. 136, n. 1, p. 37–49, 2009. DOI:10.1016/j.cell.2008.11.014.

DIMITRIOS *et al.* Increased thioredoxin-1 production in human naturally occurring regulatory T cells confers enhanced tolerance to oxidative stress. **Blood Journal**, 2011,

EHLERS S.; SCHAIBLE U. E. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host–pathogen collusion. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2013. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00411.

ELKINGTON, P. T.; D'ARMIENTO, J. M.; FRIEDLAND, J. S. Tuberculosis immunopathology: the neglected role of extracellular matrix destruction. **Science Translation Medicine**, v. 3, p. 71, 2011.

GROVER, A. *et al.* High mobility group box 1 acts as an adjuvant for tuberculosis subunit vaccines. **Immunology**, 2013. DOI:10.1111/imm.12236

GUPTA, S.; KAKKAR, V. Recent technological advancements in tuberculosis diagnostics – A review. **Biosensors and Bioelectronics**, 2018. DOI.org/10.1016/j.bios.2018.05.017

HAMEED, H. M. A. *et al.* Molecular targets related drug resistance mechanisms in MDR-,XDR-, and TDR-Mycobacterium tuberculosis Strains. **Frontiers Cellular Infection Microbiology**, v. 8, p.114, 2018.

HESLOP, R. *et al.* Changes in host cytokine patterns of TB patients with different bacterial loads detected using 16S rRNA analysis. **PLoS ONE**, 2016. | DOI:10.1371/journal.pone.0168272

HONG, H. *et al.* Increased risk of aminoglycoside-induced hearing loss in MDR-TB patients with HIV coinfection. **International Journal Tuberculosis Lung Disease**, v. 22, n. 6, p. 667–674, 2018. DOI:10.5588/ijtld.17.0830.

HOSSAIN, M.M; NORAZMI, M. Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection - The double-edged sword? **BioMedical Research International**, 2013.

HUNTER, R.L. Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review. **Tuberculosis**, v. 91, n. 6, p. 497–509, 2011. DOI:10.1016/j.tube.2011.03.007.

KHAN, A. T. *et al.* Interferon-Gamma improves macrophages functions against *M. tuberculosis* in multidrug-resistant tuberculosis patients. **Chemotherapy Research and Practice**. Article ID, 7295390, 2016. DOI: 10.1155/2016/7295390.

KIM, S. *et al.* Down-regulation of serum high-mobility group box 1 protein in patients with pulmonary Tuberculosis and *Nontuberculous Mycobacterial* lung disease. **Tuberculosis Respiratory Disease**, 2017. DOI: 10.4046/trd.2017.80.2.153.

KLEINNIJENHUIS, J. *et al.* Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Hindawi Publishing Corporation Clinical and Developmental Immunology**, 2011. doi:10.1155/2011/405310.

KUBLER, A. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* dysregulates MMP/TIMP balance to drive rapid cavitation and unrestrained bacterial proliferation. **Journal of Pathology**, v. 235, n. 3, p. 431–444, 2015. DOI:10.1002/path.4432.

LIM H. J. *et al.* CD4(+) FoxP3(+) T regulatory cells in drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis. **Tuberculosis**, 2013 DOI: 10.1016/j.tube.2013.06.001.

LOTZE, M. T.; TRACEY, K. J. High-Mobility group box 1 protein (Hmgb1): Nuclear weapon in the immune arsenal. **Nature Reviews**, 2005. DOI:10.1038/nri1594

MAERTZDORF, J. *et al.* Toward a unified biosignature for tuberculosis. **Cold Spring Harb Perspective Medicine**, v. 5, p. a018531, 2015. DOI: 10.1101/cshperspect.a018531.

MAGRYŚ, A. *et al.* Evaluation of high-mobility group box 1 protein concentration in serum of patients with m. tuberculosis infection. **Immunological Investigations**, v. 42, p. 49-60, 2012. DOI: 10.3109/08820139.2012.723769

MALIK, A.B. *et al.* reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 7, 2014. DOI: 10.1089/ars.2012.5149.

MIRANDA, P. *et al.* Sustained elevated levels of C-reactive protein and ferritin in pulmonary tuberculosis patients remaining culture positive upon treatment initiation. **Plos ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175278, 2017. DOI: org/10.1371/journal.pone.0175278

MOÇAMBIQUE. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento da tuberculose resistente e multi-droga resistente**. 2009. Disponível em: < <http://docplayer.com.br/7243221-Manual-de-diagnostico-e-tratamento-de-tuberculose-resistente-e-multi-droga-resistente.html>>. Acesso em: 24 jan 2017.

MORTAZ, E. *et al.* Interaction of pattern recognition receptors with *Mycobacterium Tuberculosis*. **Journal of Clinical Immunology**, v. 35, 2015. DOI 10.1007/s10875-014-0103-7

NDLOVU, H.; MARAKALALA, M. J. Granulomas and inflammation: host-directed therapies for tuberculosis. **Frontiers on Immunology**, 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00434.

ONG, C. W. M.; ELKINGTON, P. T.; FRIEDLAND, J.S. Tuberculosis, pulmonary cavitation, and matrix metalloproteinases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2014. DOI:10.1164/rccm.201311-2106PP

PALOMO, J. *et al.* The interleukin (IL)-1 cytokine family – Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 76, p. 25–37, 2015.

PARASA, V. R. *et al.* Inhibition of tissue matrix metalloproteinases interferes with *Mycobacterium tuberculosis*-induced granuloma formation and reduces bacterial load in a human lung tissue model. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2370, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02370.

POURGHOLAMINEJAD, A. *et al.* Is TGFβ as an anti-inflammatory cytokine required for differentiation of inflammatory TH17 cells?. **Journal of Immunotoxicology**, v. 13, n. 6, p. 775-783, 2016. DOI: 10.1080/1547691X.2016.1193574.

RAJAMANICKAM, A. *et al.* Microbial translocation associated with an acute-phase response and elevations in MMP-1, HO-1, and proinflammatory cytokines in *Strongyloides stercoralis* infection. **Infection and Immunity**, 2016. /doi.org/10.1128/IAI.00772-16.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature**, 2012. DOI:10.1038/nri3211

REN, N. *et al.* Identification of new diagnostic biomarkers for *Mycobacterium tuberculosis* and the potential application in the serodiagnosis of human tuberculosis. **Microbial Biotechnology**, p. 1–12, 2018. DOI:10.1111/1751-7915.13291.

SCHARN, C. R. *et al.* Heme oxygenase-1 regulates inflammation and mycobacterial survival in human macrophages during *M. tuberculosis* infection. **Journal of Immunology**, v. 196, n. 11, p. 4641–4649, 2016. DOI:10.4049/jimmunol.1500434

SHENETAL. The beneficial effects of adjunctive recombinant human interleukin-2 for multidrug resistant tuberculosis. **Clinical Research**, v. 11, n. 3, p. 584-590, 2015. DOI: 10.5114/aoms.2015.52362.

SILVA JR. J. B. Tuberculose: guia de vigilância epidemiológica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, Suppl1:S57- 86, 2004.

SINGH, A. *et al.* Foxp3+ Regulatory T cells among tuberculosis patients: impact on prognosis and restoration of antigen specific IFN- γ producing T Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44728, 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0044728.

UGART-GIL, C. A. *et al.* Induced sputum MMP-1, -3 & -8 concentrations during treatment of tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61333, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0061333

VINHAES, C. *et al.* Changes in inflammatory protein and lipid mediator profiles persist after antitubercular treatment of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: A prospective cohort study. **Cytokine**, 2019. DOI:org/10.1016/j.cyto.2019.154759.

WEINER, J. *et al.* Metabolite changes in blood predict the onset of tuberculosis. **Nature Communications**, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-07635-7.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2017**. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acesso em: 10 jan 2019.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis**. Geneva: World Health Organization; 2014. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/130918/1/9789241548809_eng.pdf?ua=1. Acesso em: 01 dez 2018.

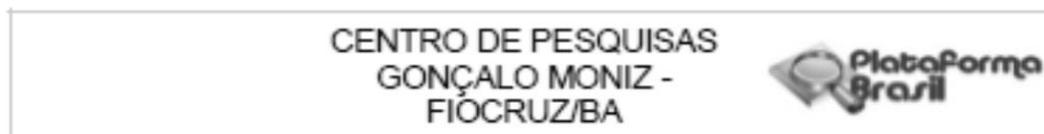
WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis**. Geneva: World Health Organization; 2014. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/pmdt_companionhandbook/en/. Acesso em: 10 jan 2019.

ZENG.J-C. Elevated HMGB1-related interleukin-6 is associated with dynamic responses of monocytes in patients with active pulmonary tuberculosis. **International Journal of Clinical Experimental Pathology**, 2015.

ZHOU, Y. *et al.* Matrix metalloproteinase-1 promoter -1607 bp 1G/2G polymorphism associated with increased risk of spinal tuberculosis in Southern Chinese Han population. **Journal Clinical Laboratory Analysis**, v. 31, p. e22136, 2017. DOI: 10.1002/jcla.22136.

9. APÊNDICE

APÊNDICE –Parecer do Comitê de Ética, TCLE, questionários aplicados aos participantes do estudo e questionário clínico.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre níveis plasmáticos de hemoxigenase (HO)-1 e evolução clínica de pacientes com tuberculose multirresistente (TBMR)

Pesquisador: THEOLIS COSTA BARBOSA BESSA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 08481112.5.0000.0040

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

Patrocinador Principal: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 378.960

Data da Relatoria: 29/08/2013

Apresentação do Projeto:

Conforme descrito no projeto, a tuberculose segue como um dos principais problemas mundiais de saúde pública, relacionados a doenças infecciosas. Apesar da queda na incidência da doença nas duas últimas décadas, o Brasil continua entre os 22 países responsáveis por 80% dos casos em todo o mundo. Uma das questões consideradas prioritárias pela Organização Mundial de saúde para o controle deste agravo é a detecção precoce e tratamento adequado de casos com falência de tratamento. Estes casos estão associados à resistência aos fármacos mais eficazes no combate ao bacilo, rifampicina (R) e isoniazida (H), o que traz como consequências o aumento da duração do tratamento, um maior risco de disseminação de formas resistentes e o aumento em mais de vinte vezes nos custos do tratamento dos pacientes, além do risco de desenvolvimento de resistência adicional aos fármacos de segunda escolha (tuberculose extensivamente resistente, TBXDR). O grupo de pesquisa em questão demonstrou a ocorrência de TBXDR em 7% dos casos de TBMR no Estado da Bahia. O tratamento da TBMR tem a duração de 18 meses, e o critério utilizado para avaliar a sua eficácia ao longo deste período é a obtenção de escarro negativo para o bacilo em exames de controle mensais (baciloscopia e cultura). O tempo de negatificação é longo, por vezes superando 12 meses, e enquanto a negatificação não ocorre há risco de transmissão de bacilos resistentes para comunicantes. A sinalização precoce de possível falha terapêutica é

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121
 Bairro: Candeal CEP: 40.296-710
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3176-2327 Fax: (71)3176-2285 E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA**



Continuação do Parecer: 378.960

desejável para redirecionar o tratamento a fármacos alternativos, de forma a reduzir o risco de transmissão e a aquisição de resistência adicional a fármacos (que reduz ainda mais as opções terapêuticas e tem sido associada a elevadas taxas de óbito).

Os colaboradores internacionais do grupo estão demonstrando a possível utilidade da mensuração de níveis plasmáticos da enzima hemoxigenase(HO)-1 como biomarcador de falha terapêutica na tuberculose, associado à ocorrência de resistência a fármacos e ao desfecho clínico. Nesta proposta, pretendemos estender estes achados para a TBMR, verificando a possível aplicação deste marcador de fácil mensuração no seguimento clínico de pacientes atendidos no hospital de referência para o tratamento da tuberculose resistente no Estado da Bahia.

Objetivo da Pesquisa:

a. Objetivo geral:

Avaliar a possível associação entre os níveis de hemoxigenase antes e durante o tratamento de pacientes com tuberculose pulmonar multirresistente e a evolução clínica destes pacientes.

b. Objetivos específicos:

- Avaliar a possível associação entre os níveis plasmáticos de HO-1 e carga bacilar, extensão radiográfica da doença, tempo de negativação do escarro e da cultura, e níveis plasmáticos de proteínas de fase aguda e mediadores inflamatórios nas diferentes fases do tratamento.
- Avaliar a possível associação entre os níveis plasmáticos de HO-1 e a expressão sistêmica de citocinas indicativas da resposta imune ao bacilo.
- Avaliar a possível associação entre os níveis plasmáticos de HO-1 e parâmetros associados à evolução do tratamento, incluindo a ocorrência de resistência aos fármacos de primeira e segunda linha utilizados no tratamento anti-tuberculose, eventos adversos, negativação do escarro e desfecho clínico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue será de risco mínimo, pois será feita por técnico treinado. Possível desconforto inerente a este procedimento será explicitado aos sujeitos de pesquisa para consideração do aceite em participar do estudo. O laboratório apresenta as condições necessárias para a manipulação de sangue humano por pessoal treinado, segundo as normas internacionais de biossegurança no manejo e descarte de amostras biológicas. As técnicas envolvidas nos experimentos descritos são realizadas rotineiramente no CPqGM, onde serão realizados os

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121
 Bairro: Candeal CEP: 40.298-710
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3176-2327 Fax: (71)3176-2285 E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA**



Continuação do Parecer: 373.960

experimentos. Para minimizar a possibilidade de problemas com Importação e materiais, a compra dos mesmos será realizada prioritariamente no primeiro ano de atividades do projeto. Para facilitar a adesão dos voluntários ao seguimento pela equipe de estudo todas as coletas de dados e amostras serão realizados no HEOM de forma a coincidir com o agendamento das consultas normais de acompanhamento terapêutico dos pacientes.

Benefícios:

Apesar de não haverem benefícios diretos previstos aos pacientes, a demonstração de biomarcadores que possam sinalizar precocemente a falha terapêutica tem potencial de auxiliar na avaliação do prognóstico de pacientes com TBMR de forma a direcionar o tratamento para esquemas alternativos, aumentando as chances de sucesso da terapia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta adequação a princípios científicos e relevância social. Pretende recrutar pacientes de ambos os sexos, de idade acima de 15 anos, com tuberculose pulmonar confirmada, atendidos no Hospital Otávio Mangabeira, aderentes ao tratamento e que apresentarem falha ao tratamento indicando resistência combinada a Isoniazida e Rifampicina. Os participantes serão entrevistados, através de questionário padronizado e submetidos a coleta de sangue, no momento do recrutamento e 2,6,9,12 e 18 meses após o início do tratamento. Serão utilizados dados de prontuários médicos, informações cadastradas no banco do Laboratório Central(LACEN BA) e do Sistema de Vigilância Epidemiológica para Tuberculose Multirresistente.

Apresenta Colaboração estrangeira no desenho do estudo, análise e interpretação dos dados, com: Bruno de Bezerra Andrade, Médico, Pesquisador Doutor. National Institutes of Health (NIH) Bethesda, MD, Estados Unidos da América. <http://lattes.cnpq.br/5853710848006520>.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta: Folha de Rosto, TCLE, Questionário, Cronograma, Orçamento e Cartas de Anuência, à exceção a do LACEN/BA.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Última pendência Atendida - Carta de colaboração pelo Laboratório Central do Estado da Bahia.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121
Bairro: Candeal CEP: 40.298-710
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3178-2327 Fax: (71)3178-2285 E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA



Continuação do Parecer: 378.960

Considerações Finais a critério do CEP:

Apresentar relatórios parciais em 02/2014; 09/2014; 02/2015 e, final em 11/2015.

SALVADOR, 30 de Agosto de 2013

Assinador por:
Adriana Lanfredi Rangel
(Coordenador)

Endereço: Rua Wlademar Falcão, 121
Bairro: Candeal CEP: 40.298-710
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3178-2327 Fax: (71)3178-2285 E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre níveis plasmáticos de hemoxigenase (HO)-1 e evolução clínica de pacientes com tuberculose multirresistente (TBMR)

Pesquisador: THEOLIS COSTA BARBOSA BESSA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 08481112.5.0000.0040

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

Patrocinador Principal: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Comunicação de início e pedido de aprovação de revisão de questionários

Justificativa: Gostaria de notificar o início das atividades do Projeto supracitado, que se encontra

Data do Envio: 11/02/2015

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 974.399

Data da Relatoria: 26/02/2015

Apresentação da Notificação:

A notificação está apresentada de forma clara e objetiva e anexa o "Questionário do Prontuário" proposto e nova versão do "Questionário do Estudo".

Objetivo da Notificação:

A proponente notifica o início das atividades do projeto supracitado, que se encontra financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (Edital PP-GUS N° 020/2013) e solicita aprovação das versões revisadas dos questionários. As revisões foram realizadas para 1) evitar repetir informações já solicitadas em prontuário eletrônico específico para a notificação e tratamento de pacientes com tuberculose multirresistente a fármacos (Sistema de Informação de Tratamentos Especiais da Tuberculose, Ministério da Saúde, Brasil); 2) para atualizar as questões relacionadas à

Endereço: Rua Waldemar Fickção, 121
Bairro: Candeal CEP: 40.296-710
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3176-2327 Fax: (71)3176-2285 E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA**



Continuação do Parecer: 874.399

classificação de renda familiar, seguindo o Critério de Classificação Econômica Brasil de 2015 (disponível em: <<http://www.abep.org/criterioBrasil.aspx>>); 3) para detalhar melhor comportamentos de risco para co-infecção com tuberculose e vírus da imunodeficiência humana.

Atualização dos Riscos e Benefícios:

Não alterados em relação à proposta original.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

São apresentados uma versão revisada do "Questionário do Estudo" revisada e incluído um "Questionário do Prontuário". As questões referentes a antecedentes, situação clínica, tratamento e presença de co-morbidades para tuberculose compõem o "Questionário do Prontuário". As demais questões relacionadas a dados socio-demográficos e fatores de risco são mantidas no "Questionário do Paciente", com atualização das questões relacionadas à renda familiar e detalhamento daquelas relacionadas a fatores de risco.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As modificações propostas foram consideradas pertinentes e não alteram objetivos, metodologia do estudo e o escopo do questionário original.

Recomendações:

Postar na Plataforma Brasil o "Questionário do Paciente" revisado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em cumprimento da Res. 466/2012 e Norma Complementar vigente, enviar relatórios semestrais a partir desta data, e relatório final em até um mês após o término da vigência do projeto conforme cronograma aprovado neste protocolo.

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121

Bairro: Candeal

CEP: 40.296-710

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3178-2327

Fax: (71)3178-2285

E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA



Continuação do Parecer: 674.399

SALVADOR, 05 de Março de 2015

Assinado por:
Adriana Lanfredi Rangel
(Coordenador)

Endereço: Rua/Waldemar Falcão, 121
Bairro: Candeal CEP: 40.296-710
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3176-2327 Fax: (71)3176-2385 E-mail: oep@bahia.fiocruz.br

**ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HEMOXIGENASE (HO)-1 E
EVOLUÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES COM TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE
(TBMR)**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA VOLUNTÁRIOS
COM 18 ANOS COMPLETOS OU MAIS**

Convidamos, _____ para participar deste estudo que tem por objetivo avaliar a possível utilidade da medição de proteínas no sangue para o acompanhamento do sucesso do tratamento de pacientes com tuberculose pulmonar multirresistente. Este convite é feito apenas às pessoas que tiveram exame positivo para a bactéria resistente a rifampicina e isoniazida.

- 1) A participação neste estudo é inteiramente voluntária e não remunerada, e você é livre para recusar participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que você esteja recebendo ou que possa necessitar em decorrência dos procedimentos realizados no âmbito do estudo.
- 2) Os resultados deste estudo não irão beneficiá-lo diretamente. Eles ajudarão com informações valiosas para conhecermos melhor a tuberculose e a resposta ao tratamento contra esta doença, para poder combater e prevenir a resistência e a falha do tratamento.
- 3) Caso aceite participar deste estudo, serão solicitados a você:
 - a) o fornecimento de informações sobre você e sobre a sua doença, relacionadas à sua pessoa, atividade profissional saúde, ao possível contato com pacientes com tuberculose, e aos efeitos do tratamento, por entrevista ou por observação das anotações médicas e exames realizados durante o seu tratamento;
 - b) a coleta de 15 ml de sangue, equivalente a meio copinho de café, neste mesmo dia e nas avaliações médicas futuras que você realizará durante o acompanhamento no hospital.

- 4) Nas suas consultas de acompanhamento, será verificado quanto tempo de tratamento você já realizou para a tuberculose multirresistente. Se você começou agora o tratamento, será solicitado nova coleta de sangue daqui a 2 meses, depois novamente daqui a seis meses, daqui a 9 meses, daqui a um ano e daqui a um ano e meio. Se você iniciou o tratamento antes de hoje, serão feitas somente as coletas dos meses que ainda faltam para terminar o seu tratamento.
- 5) A coleta de sangue será realizada por pessoal com experiência. Pode ocorrer um pequeno desconforto pela picada com agulha e mais raramente uma mancha roxa (hematoma) pode aparecer no local.
- 6) Algumas das perguntas que faremos durante a entrevista podem ser mais pessoais e você pode não ter vontade de responder. Você é livre para não fornecer informações que não tiver vontade de revelar.
- 7) Todos os demais exames que lhe serão pedidos pelo seu médico não serão realizados para a pesquisa, são para seu cuidado médico e tratamento. Qualquer procedimento médico será autorizado e realizado apenas pela equipe médica que está lhe acompanhando. A equipe do estudo não terá nenhuma participação na decisão de realizar qualquer tipo de exame ou tratamento.
- 8) Você poderá, em qualquer tempo, desistir de participar do estudo, devendo avisar a equipe de estudo. Caso você falte a alguma das coletas, mas ainda queira participar das coletas que faltam você poderá também avisar à equipe de estudo.
- 9) Todas as informações que permitam identificar seus resultados e seus dados serão mantidas confidenciais, com acesso apenas pela equipe de estudo. As amostras e dados registrados receberão um número específico para assegurar esse segredo. Os resultados serão divulgados na forma de publicações científicas, não permitindo a identificação individual dos participantes. Qualquer teste que seja feito com suas amostras que dê resultados que possam ser úteis para seu acompanhamento e tratamento serão fornecidos a você e ao seu médico.
- 10) Estamos entregando a você uma cópia deste formulário para que possa lê-lo cuidadosamente. Estamos também lendo com você todas essas informações para que você tenha a oportunidade de tirar todas as dúvidas com a equipe do projeto, mas a qualquer momento você pode contatar a equipe e questionar e tirar dúvidas sobre o estudo.

11) Em caso de qualquer dúvida sobre o estudo, ou caso você desista de participar por qualquer motivo, estes são os contatos da equipe:

TheolisBessa, coordenadora do estudo: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, R. Waldemar Falcão, 121, Candeal, Tel. (71) 3176-2215 ou 3176-2259, e-mail theolis@bahia.fiocruz.br.

Elisabete Conceição, estudante de doutorado responsável pelo estudo: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, R. Waldemar Falcão, 121, Candeal, Tel. (71) 3176-2249 ou 9972-5949, e-mail betejc@gmail.com.

Jamocyr Marinho, médico pneumologista responsável pelo estudo: Hospital Especializado Octávio Mangabeira, Praça Conselheiro João Alfredo, s/nº, Pau Miúdo, Tel. 3386-4122, e-mail jamocyr@uol.com.br.

12) Caso deseje, você pode também solicitar maiores esclarecimentos sobre o estudo ao Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz Bahia, cujos contatos seguem abaixo:

CEP-CPqGM, R. Waldemar Falcão, 121, Candeal, Tel. (71) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

CONSENTIMENTO

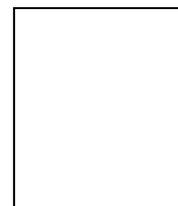
Pela presente, consente voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados.

Data: / /

NOME: _____

ASSINATURA: _____

RG: _____



Polegar direito

Integrante da equipe que leu comigo as informações acima e tirou as minhas dúvidas:

Nome por extenso: _____

Assinatura: _____ RG: _____

Testemunha:

Nome por extenso: _____

Assinatura: _____ RG: _____

**ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HEMOXIGENASE (HO)-1 E
EVOLUÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES COM TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE
(TBMR)**

**TERMO DE ASSENTIMENTO PARA VOLUNTÁRIOS COM 18 ANOS
INCOMPLETOS OU MENOS**

Convidamos, _____ para participar deste estudo que busca entender se a medida de alguns componentes no sangue pode nos ajudar a saber com antecedência se haverá sucesso no tratamento em pacientes com tuberculose pulmonar multirresistente. Este convite é feito apenas às pessoas que tiveram exame positivo para a bactéria resistente aos medicamentos rifampicina e isoniazida.

- 13) A participação neste estudo é inteiramente voluntária e não remunerada, e você é livre para recusar participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que você esteja recebendo ou que possa necessitar em decorrência dos procedimentos realizados no âmbito do estudo.
- 14) Os resultados deste estudo não irão beneficiá-lo diretamente. Eles ajudarão com informações valiosas para conhecermos melhor a tuberculose e a resposta ao tratamento contra esta doença, para poder combater e prevenir a resistência e a falha do tratamento.
- 15) Caso aceite participar deste estudo, serão solicitados a você:
- a) o fornecimento de informações sobre você e sobre a sua doença, relacionadas à sua pessoa, atividade profissional saúde, ao possível contato com pacientes com tuberculose, e aos efeitos do tratamento, por entrevista ou por observação das anotações médicas e exames realizados durante o seu tratamento;
 - b) a coleta de 15 ml de sangue, equivalente a meio copinho de café, neste mesmo dia e nas avaliações médicas futuras que você realizará durante o acompanhamento no hospital.
- 16) Nas suas consultas de acompanhamento, será verificado quanto tempo de tratamento você já realizou para a tuberculose multirresistente. Se você começou agora o tratamento, será solicitado nova coleta de sangue daqui a 2 meses, depois novamente daqui a seis meses, daqui a 9 meses, daqui a um ano e daqui a um ano e meio. Se você iniciou o tratamento antes de hoje, serão feitas somente as coletas dos meses que ainda faltam para terminar o seu tratamento.

- 17) A coleta de sangue será realizada por pessoal com experiência. Pode ocorrer um pequeno desconforto pela picada com agulha e mais raramente uma mancha roxa (hematoma) pode aparecer no local.
- 18) Algumas das perguntas que faremos durante a entrevista podem ser mais pessoais e você pode não ter vontade de responder. Você é livre para não fornecer informações que não tiver vontade de revelar. Essa entrevista é feita na presença apenas do(a) pesquisador(a) da equipe do estudo.
- 19) Todos os demais exames que lhe serão pedidos pelo seu médico não serão realizados para a pesquisa, são para seu cuidado médico e tratamento. Qualquer procedimento médico será autorizado e realizado apenas pela equipe médica que está lhe acompanhando. A equipe do estudo não terá nenhuma participação na decisão de realizar qualquer tipo de exame ou tratamento.
- 20) Você poderá, em qualquer tempo, desistir de participar do estudo, devendo avisar a equipe de estudo. Caso você falte a alguma das coletas, mas ainda queira participar das coletas que faltam você poderá também avisar à equipe de estudo.
- 21) Todas as informações que permitam identificar seus resultados e seus dados serão mantidas confidenciais, com acesso apenas pela equipe de estudo. As amostras e dados registrados receberão um número específico para assegurar esse segredo. Os resultados serão divulgados na forma de publicações científicas, não permitindo a identificação individual dos participantes. Qualquer teste que seja feito com suas amostras que dê resultados que possam ser úteis para seu acompanhamento e tratamento serão fornecidos a você e ao seu médico.
- 22) Estamos entregando a você uma cópia deste formulário para que possa lê-lo cuidadosamente. Estamos também lendo com você todas essas informações para que você tenha a oportunidade de tirar todas as dúvidas com a equipe do projeto, mas a qualquer momento você pode contatar a equipe e questionar e tirar dúvidas sobre o estudo. Seu pai, mãe ou responsável também está com uma cópia e deverá lê-lo e tirar todas as suas dúvidas conosco, e caso concorde deverá permitir que você participe do estudo.
- 23) Em caso de qualquer dúvida sobre o estudo, ou caso você desista de participar por qualquer motivo, estes são os contatos da equipe:

TheolisBessa, coordenadora do estudo: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, R. Waldemar Falcão, 121, Candeal, Tel. (71) 3176-2215 ou 3176-2259, e-mail theolis@bahia.fiocruz.br.

Elisabete Conceição, estudante de doutorado responsável pelo estudo: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, R. Waldemar Falcão, 121, Candeal, Tel. (71) 3176-2249 ou 9972-5949, e-mail betejc@gmail.com.

Jamocyr Marinho, médico pneumologista responsável pelo estudo: Hospital Especializado Octávio Mangabeira, Praça Conselheiro João Alfredo, s/nº, Pau Miúdo, Tel. 3386-4122, e-mail jamocyr@uol.com.br.

24) Caso deseje, você pode também fazer perguntas sobre o estudo ao Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz Bahia, cujos contatos seguem abaixo:

CEP-CPqGM, R. Waldemar Falcão, 121, Candeal, Tel. (71) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

CONSENTIMENTO

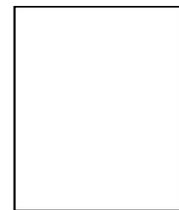
Pela presente, consente voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados.

Data: / /

NOME:

ASSINATURA:

RG: _____



Polegar direito

Integrante da equipe que leu comigo as informações acima e tirou as minhas dúvidas:

Nome por extenso: _____

Assinatura: _____ RG: _____

Testemunha:

Nome por extenso: _____

Assinatura: _____ RG: _____

**ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HEMOXIGENASE (HO)-1 E
EVOLUÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES COM TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE
(TBMR)**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS
POR VOLUNTÁRIOS COM 18 ANOS INCOMPLETOS OU MENOS**

Solicitamos a _____,
como responsável pelo(a) menor _____, o consentimento para que possa participar deste estudo que tem por objetivo avaliar a possível utilidade da medição de proteínas no sangue para o acompanhamento do sucesso do tratamento de pacientes com tuberculose pulmonar multirresistente. Este convite é feito apenas às pessoas que tiveram exame positivo para a bactéria resistente a rifampicina e isoniazida.

- 25) A participação neste estudo é inteiramente voluntária e não remunerada, e o menor é livre para recusar participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que ele(a) esteja recebendo ou que possa necessitar em decorrência dos procedimentos realizados no âmbito do estudo.
- 26) Os resultados deste estudo não irão beneficiar o(a) menor diretamente. Eles ajudarão com informações valiosas para conhecermos melhor a tuberculose e a resposta ao tratamento contra esta doença, para poder combater e prevenir a resistência e a falha do tratamento.
- 27) Caso aceite participar deste estudo, serão solicitados ao(a) menor:
- a) o fornecimento de informações sobre ele(a) e sobre a sua doença, relacionadas à sua pessoa, atividade profissional e saúde, ao possível contato com pacientes com tuberculose, e aos efeitos do tratamento, por entrevista ou por observação das anotações médicas e exames realizados durante o seu tratamento;
 - b) a coleta de 15 ml de sangue, equivalente a meio copinho de café, neste mesmo dia e nas avaliações médicas futuras que ele(a) realizará durante o acompanhamento no hospital.
- 28) Nas consultas de acompanhamento do(a) menor, será verificado quanto tempo de tratamento ele(a) já realizou para a tuberculose multirresistente. Se ele(a) começou agora o tratamento, será solicitado nova coleta de sangue daqui a 2 meses, depois novamente daqui a seis meses, daqui a 9 meses, daqui a um ano e daqui a um ano

e meio. Se ele(a) iniciou o tratamento antes de hoje, serão feitas somente as coletas dos meses que ainda faltam para terminar o seu tratamento.

- 29) A coleta de sangue será realizada por pessoal com experiência. Pode ocorrer um pequeno desconforto pela picada com agulha e mais raramente uma mancha roxa (hematoma) pode aparecer no local.
- 30) Algumas das perguntas que faremos durante a entrevista podem ser mais pessoais e ele(a) pode não ter vontade de responder. Ele(a) é livre para não fornecer informações que não tiver vontade de revelar, e a entrevista será feita apenas na presença do(a) pesquisador(a) da equipe de estudo.
- 31) Todos os demais exames que serão pedidos pelo médico ao(à) menor não serão realizados para a pesquisa, são para seu cuidado médico e tratamento. Qualquer procedimento médico será autorizado e realizado apenas pela equipe médica que o(a) está acompanhando. A equipe do estudo não terá nenhuma participação na decisão de realizar qualquer tipo de exame ou tratamento.
- 32) O(a) menor poderá, em qualquer tempo, desistir de participar do estudo, devendo avisar a equipe de estudo. Caso ele(a) falte a alguma das coletas, mas ainda queira participar das coletas que faltam ele(a) poderá também avisar à equipe de estudo.
- 33) Todas as informações que permitam identificar os resultados e os dados do(a) menor serão mantidas confidenciais, com acesso apenas pela equipe de estudo. As amostras e dados registrados receberão um número específico para assegurar esse segredo. Os resultados serão divulgados na forma de publicações científicas, não permitindo a identificação individual dos participantes. Qualquer teste que seja feito com suas amostras que dê resultados que possam ser úteis para seu acompanhamento e tratamento serão fornecidos a ele(a) e ao seu médico.
- 34) Estamos entregando a você uma cópia deste formulário para que possa lê-lo cuidadosamente. Estamos também lendo com você todas essas informações para que você tenha a oportunidade de tirar todas as dúvidas com a equipe do projeto, mas a qualquer momento você pode contatar a equipe e questionar e tirar dúvidas sobre o estudo.
- 35) Em caso de qualquer dúvida sobre o estudo, ou caso o(a) menor desista de participar ou você ache que ele(a) não deve participar por qualquer motivo, estes são os contatos da equipe:

TheolisBessa, coordenadora do estudo: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, R. Waldemar Falcão, 121, Candeal, Tel. (71) 3176-2215 ou 3176-2259, e-mail theolis@bahia.fiocruz.br.

Elisabete Conceição, estudante de doutorado responsável pelo estudo: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, R. Waldemar Falcão, 121, Candeal, Tel. (71) 3176-2249 ou 9972-5949, e-mail betejc@gmail.com.

Jamocyr Marinho, médico pneumologista responsável pelo estudo: Hospital Especializado Octávio Mangabeira, Praça Conselheiro João Alfredo, s/nº, Pau Miúdo, Tel. 3386-4122, e-mail jamocyr@uol.com.br.

36) Caso deseje, você pode também solicitar maiores esclarecimentos sobre o estudo ao Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz Bahia, cujos contatos seguem abaixo:

CEP-CPqGM, R. Waldemar Falcão, 121, Candeal, Tel. (71) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

CONSENTIMENTO

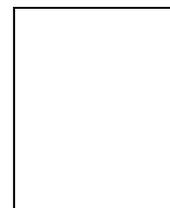
Pela presente, permite que o(a) menor voluntário participe deste estudo, e que os procedimentos descritos acima sejam realizados.

Data: / /

NOME: _____

ASSINATURA: _____

RG: _____



Polegar direito

Integrante da equipe que leu comigo as informações acima e tirou as minhas dúvidas:

Nome por extenso: _____

Assinatura: _____ RG: _____

Testemunha:

Nome por extenso: _____

Assinatura: _____ RG: _____



Questionário nº _____

Associação entre níveis plasmáticos de hemoxigenase (HO)-1 e evolução clínica de pacientes com tuberculose multirresistente (TBMR).

QUESTIONÁRIO DO PACIENTE

Registro: _____

I. DADOS DEMOGRÁFICOS

1. Sexo: () masculino () feminino

2. Idade: _____ anos

II. DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS

1. Profissão: _____

2. Tempo de estudo:

- (a) nenhum
- (b) de 1 a 3 anos
- (c) de 4 a 7 anos
- (d) de 8 a 11 anos
- (e) de 12 ou mais anos
- (f) ignorado

3. Escolaridade (marque apenas 1 alternativa):

- (a) Analfabeto/Fundamental I incompleto
- (b) Ensino fundamental I completo/Fundamental II incompleto
- (c) Ensino fundamental II completo/Médio incompleto
- (d) Ensino médio completo/Superior incompleto
- (e) Superior completo

4. Qual o rendimento mensal da sua família?

- (a) Sem renda (b) Menos de R\$788,00
(c) De R\$788,00 a R\$1576,00 (d) De R\$1577 a R\$3152,00
(e) De R\$3153,00 a R\$4728,00 (f) De R\$4729,00 a R\$7980,00
(g) De R\$7981,00 a R\$11820,00 (h) De R\$11821,00 a R\$15760,00
(i) Mais de R\$15760,00 (j) Prefiro não responder

5. Quantas pessoas moram com você na sua residência? _____

6. Está trabalhando atualmente? () Sim () Não

7. Possui automóveis de passeio? () Sim () Não

Caso sim, quantas? _____

8. Possui empregados mensalistas? () Sim () Não

Caso sim, quantos? _____

9. Possui máquina de lavar roupa? () Sim () Não

Caso sim, quantos? _____

10. Possui banheiro? () Sim () Não

Caso sim, quantas? _____

11. Possui DVD? () Sim () Não

Caso sim, quantas? _____

12. Possui geladeiras? () Sim () Não

Caso sim, quantas? _____

13. Possui freezers? () Sim () Não

Caso sim, quantos? _____

14. Possui microcomputadores, notebook, netebook, laptops? () Sim () Não

Caso sim, quantos? _____

15. Possui lavadora de louças? () Sim () Não

Caso sim, quantos? _____

16. Possui forno de micro-ondas? () Sim () Não

Caso sim, quantos? _____

17. Possui motocicletas? () Sim () Não

Caso sim, quantos? _____

18. Possui máquina secadora de roupa? () Sim () Não

Caso sim, quantos? _____

19. Água utilizada no domicílio é proveniente de:

() Rede geral de distribuição () Poço ou nascente () Outro meio

20. A rua do local de sua moradia é?

() Asfaltada/Pavimentada () Terra/Cascalho

III. FATORES DE RISCO

1. Tem ou teve contato com pessoas com tuberculose?

() Não () Sim

2. Esteve com estas pessoas:

() Em sua casa () Em seu trabalho () Em sua escola

() Familiares ou pessoas próximas fora da sua casa () Outros. Qual? _____

3. Esse contato com paciente com tuberculose foi:

() todos os dias () quase todos os dias () semanal

() quinzenal () raro () não sabe informar

Por quanto tempo? _____ semanas () não sabe informar

4. Trabalha em hospitais ou outros serviços de atendimento a pacientes?

() Não () Sim

IV. DADOS CLÍNICOS:

1. Foi vacinado com BCG?

() Não () Sim () Não sabe

2. Possui cicatriz BCG? () Não

() Sim. Diâmetro: _____ mm

ATENÇÃO: O ENTREVISTADOR DEVE MEDIR A CICATRIZ

3. Já teve algum problema nos pulmões?

() Não () Sim

4. Se a resposta foi sim:

Em que mês e ano? _____

Qual o problema? _____

Que tratamento foi feito? _____

Que remédios tomou? _____

Que médico o atendeu (especialidade)? _____

5- Estado civil:

() Solteiro () Casado () Divorciado () Viúvo () União estável

() Não informou

6. Está tomando algum medicamento?

() Não () Sim. Qual? _____

Há quanto tempo? _____

7. Usa contraceptivo? () Não () Sim.

Qual? _____

Injetável? () Não () Sim.

8. Faz uso de medicações controladas?

() Não () Sim. Qual? _____

Há quanto tempo? _____

9. Usa medicamentos sem receita?

() Não () Sim.

Medicamento injetável? () Não () Sim.

Qual? _____

10. Usa ou já foi usuário de drogas? () Não () Sim.

Injetável? () Não () Sim.

11. Usa outros tipos de droga injetável (anabolizante)?

() Não () Sim. Qual? _____

12. Compartilha seringas com outras pessoas? () Não () Sim.

13. Tem ou já teve alguma destas doenças:

- (a) Diabetes / açúcar alto no sangue (b) Câncer
(c) Imunodeficiência (d) infectado HTLV (e) infectado hepatite B e/ou C

14. É hemofílico? () Não () Sim.

15. É doador de sangue? () Não () Sim.

16. Já recebeu sangue? () Não () Sim. Por quê? _____

17. Você tem HIV?

() Não (passe para a questão 21)

() Sim. Há quanto tempo foi confirmado? _____

18. Está em tratamento para o HIV? () Não (passe para a questão 21)

() Sim. Há quanto tempo? _____ anos _____ meses

19. Possui alguma reação adversa ao tratamento para o HIV? () Não

() Sim. Qual? _____

20. Alguma vez interrompeu o tratamento para o HIV?

() Não () Sim. Por quê? _____

21. MEDIR O PESO _____ kg

22. MEDIR A ALTURA _____ metros

23. Perdeu peso nos últimos seis meses?

() Não () Sim. Quantos quilos? _____

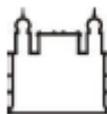
24. Nos últimos seis meses chegou a ter diarreia por mais de 30 dias?

() Não () Sim

V. USO DE FUMO E BEBIDAS ALCÓOLICAS

1. Fuma? Sim Não (passe para a questão 4).
2. Qual a quantidade diária?
 1-5 cigarros 5-10 cigarros 10 a 15 cigarros
 15 a 20 cigarros mais de 20 cigarros
3. Qual o tipo de fumo?
 cigarro charuto outros. Qual? _____
4. Toma bebidas alcoólicas (cerveja, cachaça, vodca, whisky, outras)?
 Não (terminar a entrevista) Sim
5. Quantas vezes por semana toma bebidas alcoólicas?
 1 vez/mês 1 vez por semana mais de 1 vez/semana
 diariamente
6. Alguma vez sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida alcoólica ou parar de beber? Não Sim
7. As pessoas o(a) aborrecem porque criticam o seu modo de tomar bebida alcoólica?
 Não Sim
8. O(a) senhor(a) se sente chateado(a) consigo mesmo(a) pela maneira como costuma tomar bebidas alcoólicas? Não Sim
9. Costuma tomar bebidas alcoólicas pela manhã para diminuir o nervosismo ou ressaca? Não Sim

Voluntário n°: _____



Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz

Associação entre níveis plasmático de Hemoxigenase (HO)-1 e evolução clínica de pacientes com Tuberculose Multirresistentes (TBMR).

QUESTIONÁRIO DO PRONTUÁRIO

Í-DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Voluntário n°: _____

Grupo: _____

Data: ____/____/____ Internamento Não____ Sim____ Data internamento: ____/____/____

Nome: _____

Nome da mãe: _____

Data do Nascimento: _____

Ala e leito de internamento: _____

Nº Prontuário: _____

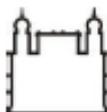
Endereço residencial: _____

Telefone: _____

Celular: _____

Seu questionário não será identificado. Os dados constantes são confidenciais. Você pode não responder a qualquer uma destas perguntas. Em caso de dúvidas consulte o pesquisador responsável. 1

Voluntário n°: _____



Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz

Associação entre níveis plasmático de Hemoxigenase (HO)-1 e evolução clínica de pacientes com Tuberculose Multirresistentes (TBMR).

QUESTIONÁRIO DO PRONTUÁRIO

I-DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Voluntário n°: _____

Grupo: _____

Data: ___/___/___ Internamento Não ___ Sim ___ Data internamento: ___/___/___

Nome: _____

Nome da mãe: _____

Data do Nascimento: _____

Ala e leito de internamento: _____

N° Prontuário: _____

Endereço residencial: _____

Telefone: _____

Celular: _____

Seu questionário não será identificado. Os dados constantes são confidenciais. Você pode não responder a qualquer uma destas perguntas. Em caso de dúvidas consulte o pesquisador responsável. 1

Voluntário n°: _____

- () Linfonodomegalia hilar () Linfonodomegalia mediastinal
 () Derrame pleural () Outras _____

8- Apresenta alguma co-morbidade.

- () HIV () Alcoolismo () Insuficiência Renal () HAS () DM () Insuficiência Renal/ Hemodiálise () Neoplasia () Silicose () Tabagismo () Transplantado
 () Transtorno Mental () Corticoterapia Prolongada () HBV () HCV
 () Usuário de drogas ilícitas () Usuário de inibidores de TNF
 Outras _____

9- Se portador de HIV, realizou exame para avaliação da carga viral?

Nadir () Sim () Não

Nos últimos três meses () Sim () Não

10- Se a resposta anterior for sim, qual o resultado?

CV: Valor _____ / Data: ____/____/____

CD4 nadir: _____ CD4: _____ CD8: _____ Data: ____/____/____

II. Estado nutricional:

11- Qual o peso medido? _____ 16- Qual a altura medida? _____

12- Perdeu peso nos últimos seis meses? Sim ___ Não ___. Caso sim, quantos quilos? _____

III. Avaliação da função hepática.

13- Apresenta alterações hepáticas?

() sim () não

14- Exames laboratoriais:

- () TGO _____ () TGP _____
 () Fosfatase Alcalina _____ () Bilirrubina Total _____
 () Bilirrubina conjugada _____ () Bilirrubina não conjugada _____
 () Gama GT _____
 () Proteínas totais: albuminas _____ globulina _____
 () Proteínas frações: albuminas _____ globulina _____

Seu questionário não será identificado. Os dados constantes são confidenciais. Você pode não responder a qualquer uma destas perguntas. Em caso de dúvidas consulte o pesquisador responsável. 3

Voluntário n°: _____

- () Hematócrito _____ () Hemoglobina _____ () VCM _____ () Hemácia _____
 () Leucócitos _____ () Linfócitos _____ () Linfócitos típicos _____
 () Linfócitos atípicos _____ () Monócitos _____ () Basófilos _____
 () Plaquetas _____ () Glicemia em jejum _____

IV. Avaliação da função renal.

15- Apresenta algum problema renal

- () Insuficiência renal aguda () Insuficiência renal crônica () Outras _____

16- Resultado dos exames laboratoriais

- () Creatinina _____ () Ureia _____

V. Acompanhamento do Tratamento.

17. Tempo de Tratamento: _____

18. Quantos anos de doente com Tuberculose: _____

19. Tratamentos Anteriores:

Mês	Ano	R	H	Z	E	S	E	Of	Lf	Mf	Tr	Cf	A	C	K	Pa	Lz	Desfecho do Tratamento	

(1) cura (2) tratamento completo (3) abandono (4) mudança de diagnóstico (5) falência (6) mudança de esquema (7) TBMR

OBS: _____

Seu questionário não será identificado. Os dados constantes são confidenciais. Você pode não responder a qualquer uma destas perguntas. Em caso de dúvidas consulte o pesquisador responsável. 4