

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA**  
**TESE DE DOUTORADO EM FARMACOLOGIA**

**ESTUDO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL EM**  
**PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA**

**VALERIA GOES FERREIRA PINHEIRO**

**FORTALEZA-CE**

**2003**

P654e

Pinheiro, Valeria Goes Ferreira

Estudo da permeabilidade intestinal em pacientes com tuberculose pulmonar ativa / Valeria Goes Ferreira Pinheiro – Fortaleza, 2003.

191 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Tuberculose pulmonar. 2. Permeabilidade intestinal.

3. Biodisponibilidade de drogas antituberculose. 4. Resistência do *M. tuberculosis* às drogas. I Título.

CDD – 616.748

**VALERIA GOES FERREIRA PINHEIRO**

**ESTUDO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL EM  
PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA**

Tese apresentada ao Curso de Pós –  
Graduação em Farmacologia do  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
da Faculdade de Medicina da Universidade  
Federal do Ceará para obtenção do Título de  
Doutor.

Orientador :

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

**FORTALEZA-CE**

**2003**

**VALERIA GOES FERREIRA PINHEIRO**

**ESTUDO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL EM  
PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR ATIVA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Data da aprovação : 09 / 05 / 2003

BANCA EXAMINADORA:

---

Profa. Helena Serra Azul Monteiro  
(orientadora)

---

Prof. Aldo Ângelo Moreira Lima  
(co-orientador)

---

Prof. Célio Lopes Silva

---

Prof. Fernando Augusto Fiúza de Melo

---

Prof. Jorge Luiz Nobre Rodrigues

A imagem de meu pai estudando em seu *bureau*, olhos inteligentes em tom azul esverdeado, perscrutando respostas às infinitas indagações, é marca fundamental de minha vida. A calma, a perseverança, a curiosidade, o bom humor, a amabilidade, o desprendimento, características de sua extraordinária figura, iluminam-me como um poderoso farol.

Sinalizar da mesma forma o caminho da Paula, do João Vitor e do Pedro Henrique, meus filhos, é o maior bem que eu posso a eles legar.

## Agradecimentos

Geraldo Uchoa, meu marido, cujo incentivo e apoio possibilitou que eu me lançasse em vôos cada vez mais altos.

Maria Elisa, minha mãe, pelo poder extraordinário de interceder junto a Deus, aliviando as minhas tensões.

Helena Serra Azul Monteiro, minha orientadora e amiga, batalhadora incansável das lutas sociais, sem se distanciar da ternura e delicadeza.

Aldo Ângelo Moreira Lima, meu orientador, pesquisador de espírito inquieto, exemplo maior de que é possível fazer ciência mesmo na aparente adversidade.

Rosa Maria Salani Mota, pela análise estatística realizada e pela incrível disponibilidade em clarear as minhas idéias.

Regina Lúcia Freitas Holanda, bibliotecária do CREMEC, pela laboriosa sistematização e revisão bibliográfica desta tese.

Maria do Carmo Nunes de Pinho (Carminha), Verônica Maria de Oliveira da Silva, e Domingos Barreto de Oliveira e Manoel Sales pela ajuda inestimável na realização de testes deste trabalho.

Creusa Lima Campelo, querida amiga, bacteriologista responsável pelo Laboratório de Tisiologia do LACEN, a quem confiei todos os testes bacteriológicos deste estudo.

Fatima Cristina Onofre Fandinho Montes, do Instituto Oswaldo Cruz-RJ, que gentilmente realizou a caracterização das cepas de *M. tuberculosis* pelo RFLP.

Charles Peloquin, Pharm.D. responsável pelo Infectious Disease Pharmacokinetics Laboratory do National Jewish Medical and Research Center-Denver USA, que gentilmente realizou dosagem das drogas.

Lyssiane Maria Ramos Adeodato, estudante de medicina, por sua inestimável companhia em lidar com os pacientes nas madrugadas do Maracanaú.

Maryanne, Vânia, Silvia, Ivonete, Santana, funcionários da enfermagem e do ambulatório de Tisiologia e Sheila, Suélia, Evaldo, Gonzaga, funcionários do Laboratório do Hospital de Maracanaú, pela grande disposição em ajudar.

Elizabeth Clara Barroso, Tânia Regina Brígido de Oliveira, Ana Maria Dantas do Amaral, Ana Margarida A F. Rosemberg, Tereza Barros, amigas de fé, presente do céu que a luta contra a Tuberculose me proporcionou.

Lúcio Flavio Gonzaga Silva, Marta Regina Kerntopf e Sonia Maria Leite, meus queridos amigos doutorandos com quem dividi as alegrias e as preocupações de sermos novamente alunos.

José Amadeus, Kátia Nogueira, Fabiana Nascimento, equipe administrativa da Unidade de Pesquisas Clínicas, pela atenção gentil que sempre me distinguiram.

Silvia e Aura, secretárias do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela orientação burocrática precisa a esta doutoranda esbaforida pelo corre-corre da vida.

Departamento de Medicina Clínica e Serviço de Pneumologia do Hospital Universitário Walter Cantídio da U.F.C. pelo apoio recebido nesse período.

Aos pacientes tuberculosos do Hospital de Maracanaú que mesmo sofridos e debilitados concordaram em participaram desse estudo na esperança de poder contribuir esclarecendo cada vez mais os intrincados meandros da tuberculose.

## RESUMO

**Título: Estudo da permeabilidade intestinal em pacientes com tuberculose pulmonar ativa. Autora: Valeria Goes Ferreira Pinheiro. Orientadora: Profa. Helena Serra Azul Monteiro. Curso de Pós Graduação em Farmacologia – Depto de Fisiologia e Farmacologia – Universidade Federal do Ceará. Ano 2003**

Níveis subterapêuticos de drogas antimicobacterianas têm sido observados no curso do tratamento de pacientes com tuberculose e nos co-infectados TB/HIV e podem facilitar o surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes às drogas. A mal-absorção intestinal inclui-se entre as prováveis causas e tem sido descrita em tuberculosos desnutridos, alcoólatras, diabéticos, aidéticos ou com patologias gastrointestinais associadas. Estudos da permeabilidade intestinal permitem a avaliação da função intestinal em várias doenças, mas têm sido escassos na tuberculose. O teste da lactulose / manitol tem sido utilizado como critério de lesão com déficit absorptivo da mucosa intestinal e pode ser de utilidade no prognóstico da absorção intestinal de drogas em pacientes com tuberculose. Foram estudados 41 pacientes (30H e 11M). A coleta dos dados foi realizada no Hospital de Maracanaú, Fortaleza-CE, em 2001. Procedeu-se descrição clínica, social e laboratorial do grupo de pacientes e estudo piloto de observação utilizando o teste da lactulose / manitol em 40 pacientes com tuberculose pulmonar ativa, comparando com grupo controle de 28 voluntários sadios objetivando estudar a permeabilidade intestinal. Testes de sensibilidade às drogas antituberculose, pelo método das proporções indireto, foram realizados em 20 pacientes com cultura de escarro positivas. O grau de nutrição avaliado através do Índice de Massa Corpórea (IMC) e o nível sérico das drogas foram correlacionados com os valores da permeabilidade intestinal. Cinquenta e nove por cento (24 pacientes) foram considerados desnutridos pelo  $IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$ , sendo vinte e dois por cento (9 pacientes) considerados severamente desnutridos ( $IMC < 16 \text{ kg/m}^2$ ). Em 18 pacientes, após 2 h da tomada de 600mg de rifampicina (R) e 400 mg de isoniazida (H) os níveis séricos de R (CRM 2h) e H (CINH 2h) foram analisados por HPLC. A taxa de excreção urinária de manitol (média  $\pm$  desvio padrão) foi significativamente menor  $p < 0,001$  ( $9,52 \pm 5,70$ ) nos pacientes que dos controles ( $20,14 \pm 10,84$ ). A taxa de excreção de lactulose foi significativamente



maior  $p < 0,05$  nos pacientes ( $0,59 \pm 1,79$ ) que nos controles ( $0,52 \pm 0,47$ ) e a razão L/M foi aumentada de forma consistente, embora não significativa  $p > 0,05$  ( $0,05 \pm 0,10$  pacientes contra  $0,02 \pm 0,02$  controles). Considerando a faixa terapêutica da R (8-24 mcg/mL) e da H (3-6 mcg/mL) observamos que as CRM2h e CINH2h em 16/18 (88,8%) pacientes não atingiram níveis séricos adequados para as duas drogas. 8/18 (44,4%) pacientes não alcançaram níveis séricos para ambas as drogas simultaneamente. Na análise das drogas isoladas verificamos que em 12/18 (66,7%) pacientes a CRM2h o nível sérico mínimo não foi alcançado (média R = 6,47 mcg/mL) e 13/18 (72,2%) a CINH2h também foi reduzida (média H = 2,17 mcg/mL). Quanto ao perfil de resistência do *M. tuberculosis* em cultura de escarro, observamos 4/20 (20%) multirresistentes (3 à R+H e 1 à todas as drogas) e 2/20 (10%) monorresistentes à H sendo 14/20 (70%) amostras consideradas sensíveis às drogas testadas. Os resultados observados sugerem uma intensa redução na área de absorção e lesão da mucosa intestinal nos indivíduos estudados. Os dados são consistentes com a redução na biodisponibilidade de rifampicina e isoniazida e com o estado nutricional destes pacientes. Os dados preliminares recomendam estudos adicionais na avaliação completa da biodisponibilidade das drogas antimicobacterianas em pacientes com tuberculose.

**Palavras chaves:** 1. tuberculose pulmonar 2. permeabilidade intestinal 3. biodisponibilidade de drogas antituberculose 4. resistência do *M. tuberculosis* às drogas

## ABSTRACT

**Title: Intestinal permeability study in active pulmonary tuberculosis. Author: Valeria Goes Ferreira Pinheiro. Orientation: Prof. Helena Serra Azul Monteiro. Department of Pharmacology. Federal University of Ceará- Brazil. Year: 2003.**

Subtherapeutic antimycobacterial drugs levels have been observed during treatment of patients with tuberculosis and in HIV coinfecting. It may facilitate the development of *M. tuberculosis* resistant strains. Malabsorption may be one of the underlying cause. It has been documented in tuberculosis patients associated to malnutrition, alcoholics, diabetes, AIDS and gastrointestinal symptoms. Intestinal permeability studies have been conducted in order to evaluate the intestinal function in some diseases but are scant in tuberculosis. Lactulose / manitol ratio in urine a widely used measure of malabsorption and intestinal permeability may be useful to assess the drug absorption area in tuberculosis. In order to study the intestinal permeability in tuberculosis, we conducted in a pilot study 40 patients and 28 healthy volunteers, using the urinary excretion of ingested lactulose and manitol as respective markers of barrier disruption and overall villous surface area. The Maracanaú Hospital in Fortaleza-CE, was chosen and the data were collected in 2001. Eighteen patients receiving 600 mg rifampicin (R) and 400 mg isoniazid (H) were evaluated through venous blood analysis obtained at 2 hours after directly observed ingestion. The serum samples were analysed by HPLC at the Infectious Disease Pharmacokinetics Laboratory / National Jewish Center / Denver, USA. Nutritional status by body mass index (BMI) and serum drug levels were correlated with intestinal permeability data. *M. tuberculosis* isolates from 20 clinical specimens were tested to drug susceptibility by standard proportion method (APM) using Lowenstein-Jensen medium. Forty-one patients (30 M, 11 F) were studied. Fifty nine per cent (24) patients were malnourish (BMI<18,5 kg/m<sup>2</sup>); 22% (9) were severely malnourish (BMI<16 kg/m<sup>2</sup>). The urinary excretion of mannitol (mean  $\pm$  standard deviation) showed a significant decrease  $p < 0,001$  in patients ( $9,52 \pm 5,70$ ) compared to controls ( $20,14 \pm 10,84$ ). The excretion of lactulose was significant increased  $p < 0,05$  in patients ( $0,59 \pm 1,79$ ), than controls

( $0,52 \pm 0,47$ ) and the L/M ratio shown consistent increased ( $0,05 \pm 0,10$ ) in patients compared to controls ( $0,029 \pm 0,0,02$ )  $p > 0,05$ . Considering the reported target range for R (8-24 mcg/mL ) and H (3-6 mcg/mL) we observed that 2-h serum levels were below the lower limit for R and H in 88,8% (16/18) patients. Forty four per cent ( 8/18) of patients had reduced levels for the two drugs. Analysing single drugs we documented that 66,7% (12/18) patients had levels below the target limit for R (mean R =6,47 mcg/mL) and 72,2% (13/18) for H (mean H =2,17mcg/mL). Concerning to *M. tuberculosis* susceptibility profile in sputum culture, we observed 20% (4/20) multidrug resistant strains (3 for R + H and 1 for all drugs). Ten per cent (2/20) were resistant only for H and 70% (14/20) strains were sensitive. These results suggests an important decrease in the functional absorptive surface of the intestine and damage of the intestine in patients studied. The data are consistent with reduced antituberculosis drugs bioavailability and compromised nutritional status of these patients. The preliminary results indicate the necessity of new approaches to accurate portrait of drugs bioavailability in tuberculosis patients.

**Key words:** 1. pulmonary tuberculosis. 2. intestinal permeability 3. antituberculosis drugs bioavailability 4. *M. tuberculosis* resistance.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS .....	19
LISTA DE SIGLAS.....	22
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>1.1 Tuberculose.....</b>	<b>26</b>
1.1.1 História.....	26
1.1.2 Epidemiologia.....	28
1.1.3 Resistência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> às drogas antituberculose.....	30
1.1.3.1 Prevalência.....	31
1.1.3.2 Distribuição geográfica mundial.....	32
1.1.3.2.1 Situação do Brasil.....	33
1.1.3.2.2 Situação do Ceará.....	34
1.1.3.3 Mecanismos de resistência às drogas antituberculose	35
1.1.3.3.1 Mecanismos moleculares de resistência.....	37
1.1.3.3.2 Genes preditivos de <i>M. tuberculosis</i> resistentes às drogas.....	39
1.1.3.4 Fatores implicados no desenvolvimento da resistência.....	40
<b>1.2 Tratamento da Tuberculose.....</b>	<b>41</b>

1.2.1	O esquema terapêutico normatizado no Brasil para tratamento da tuberculose – Uso de medicação com doses fixas combinadas.....	44
1.2.2	Qualidade das drogas nas preparações combinadas.....	45
1.2.3	As drogas antituberculose produzidas no Brasil.....	46
1.2.4	Importância da rifampicina e da isoniazida no esquema terapêutico da tuberculose – Aspectos do mecanismo de ação e farmacocinética .....	49
1.3	<b>Absorção Intestinal das Drogas Antituberculose.....</b>	<b>51</b>
1.3.1	Mal-absorção intestinal de drogas antituberculose em diversas situações.....	52
1.3.2	Aspectos da resposta imune local e sistêmica na tuberculose.....	54
1.3.2.1	Imunodeficiência e tuberculose.....	57
1.4	<b>A Mucosa Intestinal Frente a Diversos Estímulos.....</b>	<b>63</b>
1.4.1	Alterações inflamatórias na mucosa intestinal.....	64
1.4.2	A desnutrição como fator facilitador de alterações na mucosa intestinal.....	67
1.4.3	O alcoolismo e sua ação lesiva direta.....	69
1.4.4	As parasitoses e as lesões da mucosa intestinal.....	69
1.5	<b>Permeabilidade da Mucosa intestinal.....</b>	<b>72</b>
2	<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>74</b>

<b>2.1</b>	<b>Justificativa.....</b>	<b>75</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>77</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>79</b>
<b>3.1</b>	<b>Delineamento do Estudo</b>	<b>80</b>
<b>3.2</b>	<b>Local de Realização .....</b>	<b>80</b>
<b>3.3</b>	<b>População de Estudo.....</b>	<b>81</b>
<b>3.4</b>	<b>Seleção de Pacientes.....</b>	<b>81</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Critérios de inclusão.....</b>	<b>81</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Critérios de exclusão.....</b>	<b>82</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Critérios de retirada .....</b>	<b>82</b>
<b>3.5</b>	<b>Aspectos Éticos.....</b>	<b>83</b>
<b>3.6</b>	<b>Protocolo Clínico de Estudo.....</b>	<b>84</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Questionário clínico epidemiológico.....</b>	<b>84</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Avaliação nutricional.....</b>	<b>85</b>

<b>3.6.3</b>	<b>Coleta de materiais.....</b>	<b>86</b>
<b>3.6.4</b>	<b>Cultivo de cepas de <i>M. tuberculosis</i> e estudo do perfil de resistência bacilar às drogas.....</b>	<b>87</b>
<b>3.6.5</b>	<b>Caracterização das cepas pela análise do polimorfismo pelo IS6110 - RFLP.....</b>	<b>88</b>
<b>3.6.6</b>	<b>Avaliação do processo inflamatório Intestinal.....</b>	<b>91</b>
3.6.6.1	Sudan.III.....	91
3.6.6.2	Lactoferrina.....	92
3.6.6.3	Sangue oculto.....	93
3.6.6.4	Parasitológico de fezes.....	93
3.6.6.5	Pesquisa de Cryptosporidium.....	94
3.6.6.6	Detecção de citocinas IL-1 e IL-8 no sangue e fezes.....	95
<b>3.6.7</b>	<b>Protocolo de avaliação da permeabilidade intestinal pelo Teste de Lactulose-Manitol.....</b>	<b>96</b>
<b>3.6.8</b>	<b>Avaliação de biodisponibilidade da R e H.....</b>	<b>98</b>
<b>3.7</b>	<b>Esquema Geral do Projeto.....</b>	<b>99</b>
<b>3.8</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>100</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>101</b>
<b>4.1</b>	<b>Avaliação Epidemiológica e Social.....</b>	<b>102</b>

4.2	<b>Avaliação Nutricional.....</b>	<b>104</b>
4.3	<b>Avaliação Biológica do <i>M. tuberculosis</i>.....</b>	<b>106</b>
4.4	<b>Avaliação dos Parâmetros Inflamatórios.....</b>	<b>108</b>
4.5	<b>Avaliação da Biodisponibilidade de Drogas Antituberculose.....</b>	<b>109</b>
4.6	<b>Avaliação da Permeabilidade Intestinal.....</b>	<b>115</b>
4.7	<b>Associação entre os Parâmetros.....</b>	<b>120</b>
4.7.1	<b>Estado nutricional <i>versus</i> Parâmetros sociais.....</b>	<b>120</b>
4.7.2	<b>Parâmetros inflamatórios intestinais .....</b>	<b>122</b>
4.7.3	<b>Permeabilidade intestinal <i>versus</i> Biodisponibilidade de drogas.....</b>	<b>124</b>
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>127</b>
5.1	<b>Avaliação da Permeabilidade Intestinal e da Área Absortiva.....</b>	<b>130</b>
5.2	<b>Substâncias Teste mais utilizadas – Vantagens <i>versus</i> Desvantagens.....</b>	<b>132</b>



5.2.1	Marcadores únicos.....	132
5.2.2	Polímeros de Propileno glicóis (PEG's).....	133
5.2.3	Radioisótopos.....	133
5.2.4	Substâncias testes combinadas.....	134
5.3	<b>Avaliação da Permeabilidade Intestinal através do Teste da Lactulose-Manitol.....</b>	<b>134</b>
5.3.1	Resultados dos estudos da permeabilidade intestinal no Ceará, utilizando o teste da lactulose-manitol.....	136
5.4	<b>Considerações.....</b>	<b>137</b>
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>152</b>
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>154</b>
8	<b>ANEXOS.....</b>	<b>186</b>
	ANEXO A.....	187
	ANEXO B.....	188
	ANEXO C.....	191

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Distribuição dos pacientes segundo a avaliação nutricional pelo Índice de Massa Corpórea	<b>104</b>
<b>Figura 2.</b> Perfil de sensibilidade do <i>M. tuberculosis</i> em cultura de escarro	<b>106</b>
<b>Figura 3.</b> Perfis genéticos obtidos por tipagem molecular utilizando a técnica de IS 6110-RFLP a partir de culturas de <i>M. tuberculosis</i> obtidos de escarro de pacientes do Hospital de Maracanaú no período out./ nov de 2001.	<b>107</b>
<b>Figura 4.</b> Distribuição dos níveis séricos da rifampicina após 2 horas da tomada em jejum de 600 mg da droga em 18 pacientes com tuberculose pulmonar ativa do Hospital de Maracanaú no período outubro e novembro de 2001.	<b>110</b>
<b>Figura 5.</b> Distribuição dos níveis séricos da isoniazida após 2 horas da tomada em jejum de 400 mg da droga em 18 pacientes com tuberculose pulmonar ativa do Hospital de Maracanaú no período outubro e novembro de 2001.	<b>111</b>
<b>Figura 6.</b> Distribuição dos pacientes quanto ao alcance do nível terapêutico das drogas antituberculose.	<b>113</b>
<b>Figura 7.</b> Distribuição dos pacientes quanto a redução dos níveis terapêuticos das drogas antituberculose.	<b>113</b>
<b>Figura 8.</b> Valor médio (+dp) da taxa de excreção urinária do manitol em função do grupo de pacientes com e sem tuberculose	<b>118</b>

- Figura 9.** Valor médio (+dp) da taxa de excreção urinária da lactulose em função do grupo de pacientes com e sem tuberculose. **118**
- Figura 10.** Valor médio (+ dp) da relação da taxa de excreção urinária lactulose / manitol em função do grupo de pacientes com e sem tuberculose. **119**
- Figura 11.** Valor médio (+ dp) da taxa de excreção urinária do manitol no grupo de pacientes classificados segundo a concentração sérica da rifampicina. **125**
- Figura 12.** Valor médio (+ dp) da taxa de excreção urinária do manitol no grupo de paciente classificados segundo a concentração sérica da isoniazida. **126**
- Figura 13.** Representação esquemática de uma cripta intestinal onde se observam diferenças na espessura das " *tight junctions* " (TJ) das vilosidades e no fundo da cripta e a diferença entre a permeabilidade intestinal entre as diversas substâncias. **140**

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Distribuição das características clínico-sociais de 41 pacientes tuberculosos estudados no Hospital de Maracanaú no período de outubro e novembro de 2001.	<b>103</b>
<b>Tabela 2.</b> Distribuição dos pacientes com tuberculose pulmonar do Hospital de Maracanaú avaliados no período outubro e novembro de 2001, em função de alterações vistas nas hemácias.	<b>105</b>
<b>Tabela 3.</b> Distribuição dos pacientes com tuberculose pulmonar do Hospital de Maracanaú em função do resultado de parâmetros inflamatórios intestinais nos exames de fezes realizados no período outubro e novembro de 2001.	<b>108</b>
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos pacientes com tuberculose pulmonar do Hospital de Maracanaú em função da detecção de citocinas inflamatórias (IL-1 e IL-8) em amostras de sangue e fezes coletadas no período de outubro e novembro de 2001.	<b>109</b>
<b>Tabela 5.</b> Distribuição dos pacientes com tuberculose pulmonar do Hospital de Maracanaú de acordo com o nível terapêutico alcançado pela rifampicina após 2 horas da tomada de 600 mg da droga em jejum.	<b>111</b>
<b>Tabela 6.</b> Distribuição dos pacientes com tuberculose pulmonar do Hospital de Maracanaú de acordo com o nível terapêutico alcançado pela isoniazida após 2 horas da tomada de 400 mg da droga em jejum.	<b>112</b>

<b>Tabela 7.</b> Laudo de análise de cápsulas de rifampicina 200mg associada à isoniazida 200 mg do Lote 0103022, realizado pelo NUPLAN, emitido em 30/05/2002.	<b>114</b>
<b>Tabela 8.</b> Distribuição dos pacientes, segundo a excreção urinária de lactulose, em função da detecção de IL-1(pg/mL) nas fezes	<b>116</b>
<b>Tabela 9.</b> Valores descritivos da taxa de excreção urinária do manitol, da lactulose e da relação lactulose / manitol no grupo de pacientes com tuberculose e no grupo controle.	<b>117</b>
<b>Tabela 10.</b> Distribuição dos pacientes quanto ao estado nutricional em função da renda em salários-mínimos.	<b>120</b>
<b>Tabela 11.</b> Distribuição dos pacientes quanto ao estado nutricional em função do uso de bebida alcoólica	<b>121</b>
<b>Tabela 12.</b> Valores descritivos da taxa de excreção urinária do manitol de acordo com os diferentes graus de nutrição	<b>121</b>
<b>Tabela 13.</b> Distribuição de pacientes segundo a detecção de IL-8 (pg/mL) – sangue em função da presença de ovos e parasitas nas fezes.	<b>122</b>
<b>Tabela 14.</b> Distribuição de pacientes segundo a detecção de IL-8(pg/mL) nas fezes em função da presença de ovos e parasitas nas fezes	<b>122</b>
<b>Tabela 15.</b> Distribuição de pacientes segundo a detecção de IL-1(pg/mL) nas fezes em função da presença de ovos e parasitas nas fezes	<b>123</b>

- Tabela 16.** Distribuição de pacientes segundo a detecção de lactoferrina nas fezes em função da presença de ovos e parasitas nas fezes **123**
- Tabela 17.** Valores descritivos da taxa de excreção urinária do manitol, da lactulose e da relação lactulose / manitol em função da concentração sérica da rifampicina **124**
- Tabela 18.** Valores descritivos da taxa de excreção urinária do manitol, da lactulose e da relação lactulose / manitol em função da concentração sérica da isoniazida **126**

## LISTA DE SIGLAS

**CH 2h** - Concentração sérica de isoniazida após 2 horas

**CNPS** – Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária

**CRM 2h**- Concentração sérica de rifampicina após 2 horas

**DFC<sub>s</sub>**- Dose fixa combinada

**DOTS** – -“Directly Observed Treatment Short-course” Tratamento encurtado diretamente observado

**E ou EMB** - etambutol

**HPLC**- “High Performance Liquid Chromatography” - Cromatografia Líquida de Alta Pressão

**IL**-- interleucina

**IMC**- Índice de massa corpórea

**H ou INH**- isoniazida

**IUATLD**- “International Union Against Tuberculosis and Lung Disease” – União Internacional contra a Tuberculose e Doenças Pulmonares

**L**- lactulose

**LACEN** – Laboratório Central de Saúde Pública

**L/M**- razão lactulose / manitol

**M-** manitol

**MDR-TB-** bacilo multidrogarresistente

**NUPLAN-** Núcleo de Pesquisa em Alimentos e Medicamentos

**OMS-** Organização Mundial de Saúde

**PEGs-** Polímeros de propiletilenoglicóis

**PI-** permeabilidade intestinal

**RFLP-** “Restriction Fragment Length Polymorphism” – polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição

**R ou RM** – rifampicina

**S ou SM-** estreptomicina

**TBMR-** paciente tuberculoso multirresistente

**TJ** – “Tight Junctions” -Zônulas de oclusão

**UICTER-** “Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias” – União Internacional contra a Tuberculose e Doenças Respiratórias

**Z ou PZA** – pirazinamida

**WHO-** “World Health Organization” - Organização Mundial de Saúde



# **1. INTRODUÇÃO**

Revivendo...

*“Ao longo da história, a humanidade tornou-se vítima de pandemias de cólera, peste, gripe, febre tifóide e tuberculose entre outras doenças infecciosas que representavam as principais causas de óbito. Doenças aparentemente banais como infecção de ouvido, de pele e garganta freqüentemente resultavam em surdez, deformidades ou morte devido à complicações como septicemia.*

*Ainda no século XIX a expectativa de vida na Europa e América do Norte estava ao redor 50 anos e era marcada pela constante e previsível perda de familiares, amigos, cônjuges e colegas. O hábito de cumprimentar o outro perguntando por sua saúde era significativo e tornou-se popular exatamente baseado na ameaça sempre presente de morte súbita devido à peste, acidentes ou outra infecção fortuita. Era um mundo no qual a probabilidade de morte prematura por doenças infecciosas girava em cerca de 40% e onde as mulheres sucumbiam durante o parto por infecções, hoje facilmente curáveis.*

*Nos dias atuais, a situação nos países em desenvolvimento permanece tão horrenda quanto estava nas gerações anteriores. Nas regiões mais empobrecidas do mundo, onde a miséria e o acesso inadequado ao atendimento à saúde permanecem como lembranças opressivas da debilidade humana, as doenças infecciosas continuam sendo uma ameaça onipresente à vida e ao sustento”.*

(Gro Harlem Brundtland - Diretor da OMS, 2000).

## 1.1 Tuberculose

### 1.1.1 História

A tuberculose (TB) foi conhecida e temida através dos tempos como uma das principais causas de morte. A imagem de "doença romântica" companheira de poetas e intelectuais perdurou até os últimos anos do século XVIII, quando começou a ser percebida como "doença social" aliada nefasta da pobreza, da desnutrição e das guerras (Fiocruz, 1993)

No Brasil, a imagem "tísica romântica" sombreou a percepção da tuberculose como "doença social" até o início do século passado. Apesar da clara associação da doença com as precárias condições de vida, as orientações para o controle da tuberculose, após a identificação do *Mycobacterium tuberculosis*, por Robert Koch em 1882, visavam sempre o bacilo como o principal alvo.

Nessa época, o tratamento para a tuberculose era privilégio de poucos e tinha como pressuposto que a cura espontânea do doente ocorria quando o mesmo estava em condições favoráveis de boa alimentação e repouso, arejado pelo clima das montanhas rarefeito em oxigênio, que dificultava a sobrevivência do bacilo. Esse foi o período da proliferação dos sanatórios e do florescimento de cidades que vicejaram a sombra da tuberculose.

Na década de 1930, avanços científicos como a vacina BCG, a baciloscopia, a abreugrafia, o pneumotórax e outras cirurgias torácicas, vieram questionar o "fator clima, repouso e superalimentação" na cura da tuberculose.

A descoberta da quimioterapia específica, a partir da década de 1940, iria alterar de forma radical, o conhecimento científico mundial em relação à tuberculose. O perfil sócio-epidemiológico da doença começou a ser discutido

racionalmente, a utilidade dos sanatórios passou a ser questionada e projetou-se uma grande abrangência do tratamento aos doentes de tuberculose.

Com a comprovação da eficácia desses quimioterápicos na cura da doença ao longo das décadas de 1950 e 1960, o tratamento baseado principalmente em cuidados individuais, passou a ser amplo, acessível à massa e basicamente ambulatorial. A internação dos pacientes tornou-se desnecessária na maioria dos casos. Em consequência dessa política, nas décadas seguintes foram paulatinamente, sendo desativados os sanatórios, os hospitais especializados, os dispensários e os programas sociais agregados ao controle da tuberculose. A estratégia de tratamento passou a ser orientada para os postos de saúde onde o paciente seria acompanhado por equipes minimamente treinadas, inseridas nos programas gerais de saúde. O contexto social da doença e as características individuais do doente foram sendo pouco a pouco relegados (Fiocruz, 1993).

O foco principal de todos os programas de controle da doença era a descoberta e anulação de casos bacilíferos. A principal arma do tratamento era o uso das drogas. Medicamentos eficazes, ao lado das medidas profiláticas e da simplificação do diagnóstico, determinaram então uma grande mudança no perfil epidemiológico da doença. Ocorreu inicialmente, uma queda vertiginosa dos índices de mortalidade por tuberculose em todos os países, permitindo uma maior esperança de vida aos doentes e a cura da maioria dos doentes.

Os medicamentos curavam. A euforia foi extraordinária, profetizou-se logo a erradicação da tuberculose no planeta. Pouco tempo depois veio a perplexidade, a tuberculose continuou grassando no mundo. E pior, as drogas funcionavam como um poderoso bumerangue. Logo se percebeu que o mau uso dos antibióticos trouxe a reboque uma ameaça maior, o surgimento de bacilos resistentes às drogas que facilmente podem ser transmitidos para a comunidade. A doença antes assustadora, por sua alta mortalidade, agora robustecida pela resistência pode se tornar incontrolável. Os determinantes e

respostas para solução desse fenômeno representam um dos maiores desafios de saúde do século XXI.

A proposta deste trabalho “Estudo da permeabilidade intestinal em pacientes com tuberculose pulmonar ativa” visa contribuir para o entendimento de fatores que possam estar implicados no desenvolvimento da resistência do *M. tuberculosis* às drogas, tais como as repercussões da tuberculose pulmonar no trato intestinal, a avaliação da permeabilidade intestinal de doentes tuberculosos e a apreciação da biodisponibilidade de drogas antituberculose.

### **1.1. 2 Epidemiologia**

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) ou World Health Organization (WHO) e da International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) ou Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER) estimaram em 1990, cerca de 1,8 bilhões de pessoas infectadas com o *M. tuberculosis*, ou seja, 1/3 da população mundial. Na década atual, mais de 20 milhões de doentes foram notificados, e registra-se a tuberculose como responsável pelo óbito de cerca 3 milhões de pessoas a cada ano.

O comportamento da tuberculose em um país ou região pode ser avaliado utilizando-se o risco médio anual da infecção tuberculosa (RMAI) que corresponde à probabilidade de uma pessoa de infectar pelo *M. tuberculosis*. O RMAI é calculado a partir da realização de inquéritos epidemiológicos avaliando a prevalência da reatividade ao PPD (protein purified derivated) em uma mesma população, de mesma faixa etária, não vacinada com BCG, no período de 1 ano (Kritski et al., 1999). É considerado um indicador seguro, pois independe das demais informações referentes ao controle da doença, tais como, incidência, morbidade e mortalidade (Rosemberg, 1999). Baseado no RMAI tuberculosa e considerando as diferentes condições econômicas e áreas geográficas peculiares, a OMS classificou em 1990, os países do mundo em 4 grandes grupos (Kochi, 1991):

- Grupo I – Países industrializados. Tuberculose em declínio acelerado. Risco de infecção entre 0,01 a 1,1% com decréscimo de mais de 10% ao ano. Estados Unidos e Japão se incluem nesse grupo.
- Grupo II – Países com renda “*per capita*” média. Tuberculose declinando com certa lentidão. Risco de infecção entre 0,5 a 1,5% com declínio anual de 5 a 10%. Ásia-Oeste, África do Norte e América Latina (o Brasil com risco de infecção em torno de 0,5 a 0,8%, está incluído nesse grupo).
- Grupo III – Países também com renda média. Tuberculose sem declínio ou com decréscimo muito lento. Risco de infecção entre 1,0 a 2,5% , com declínio de 5% anualmente. Leste e Sudeste da Ásia.
- Grupo IV – Países com baixa renda. Tuberculose em situação muito grave. Risco de infecção entre 1,0 a 2,5% com declínio nulo. África subsahariana e subcontinente hindu.

A distribuição dos infectados é bastante desigual. Os países industrializados do primeiro mundo (Grupo I) reúnem 21% do total, enquanto que no terceiro mundo representado pelos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Grupo II, III e IV) concentram 79% do total de indivíduos infectados, ou seja, a grande massa dos infectados do mundo.

A situação da tuberculose levantada em 1990 vem piorando em todas as áreas geográficas. As projeções da OMS até o ano 2005 indicam um agravamento da situação global, principalmente nos países do terceiro mundo. Entre os fatores agravantes, destacamos a epidemia pelo HIV, a deterioração da rede assistencial de saúde pública, o crescimento demográfico, as migrações populacionais, as guerras, o aumento da miséria e o aparecimento de cepas do *M. tuberculosis* resistentes às drogas antituberculose (Rosemberg, 1999).

### 1.1.3 Resistência do *M. tuberculosis* às drogas antituberculose

#### Definições e terminologia de resistência bacilar :

- Resistência primária – é a resistência inata de bacilos às drogas detectada em pacientes virgens de tratamento.
- Resistência adquirida – refere-se à resistência detectada em bacilos de paciente que previamente receberam pelo menos um mês de tratamento com drogas antituberculose.
- Resistência combinada – refere-se à resistência detectada em bacilos de pacientes, sem levar em conta a informação de tratamento anterior.
- Monorresistência – o termo é utilizado quando o bacilo é resistente a somente uma das drogas testadas
- Multidrogarresistência (MDR-TB) – O estado de multidrogarresistência foi definido como a resistência do *M. tuberculosis* a pelo menos rifampicina (R) e isoniazida (H), com ou sem resistência a outras drogas (WHO/IUATLD, 1997; Pablos Mendez et al., 1998), pois essas duas drogas representam atualmente, a mais potente combinação terapêutica contra o *M. tuberculosis*. No Brasil, a tendência atual é considerar multidrogarresistente o bacilo resistente a duas ou mais drogas, independente de quais sejam (Rosemberg, 1999).
- Paciente tuberculoso multirresistente (TBMR) – denomina-se o indivíduo portador de bacilos tuberculosos a duas ou mais drogas.

### 1.1.3.1 Prevalência

A OMS e a IUATLD conduziram em 1994, um estudo denominado “Projeto Global de Vigilância da Resistência às Drogas Antituberculose” com o objetivo de estimar a prevalência da resistência, estudar sua distribuição mundial e a associação entre os índices de resistência encontrados com as políticas de tratamento da tuberculose dos diversos países. Quatro das principais drogas antituberculose foram testadas nesse estudo: rifampicina, isoniazida, etambutol e estreptomina. Uma rede internacional de 22 laboratórios serviu como centro de referência para o controle de qualidade de testes de sensibilidade às drogas, feitos em amostras de escarro de 50.000 pacientes com tuberculose distribuídos em 35 países, inclusive o Brasil (WHO/IUATLD, 1997).

Principais conclusões do Projeto:

- Resistência primária: A prevalência média de resistência a uma única droga, foi de 10,4%, variando de 2% (República Tcheca) a 41% (República Dominicana). Casos de MDR-TB primária foram encontrados em todos os países participantes do estudo, exceto o Quênia. A prevalência média da MDR-TB primária foi de 1,4%, variando de 0,0 (Quênia) a 14,4% (Latvia - países báltico, anteriormente denominado por Letônia). A resistência primária as 4 drogas teve média em 0,2% dos casos (variação de 0,0 a 4,6%).
- Resistência adquirida: A prevalência média de resistência a pelo menos uma droga foi de 36% com uma variação entre 5,3% na Nova Zelândia a 100% em Ivanovo Oblast, uma comunidade russa situada cerca de 200 quilômetros de Moscou. A média da prevalência de MDR-TB adquirida foi de 13%, variando de 0 % no Quênia a 54% na Latvia/Letônia. Resistência à 4 drogas foi registrada na média de 4,4% de todos os casos (variação de 0 a 17%).



As maiores taxas de resistência adquirida à isoniazida foram verificadas na Lituânia (69,7%); Rússia – Inanovo Oblast (54,4%); Estônia (46,2%); Coréia (45,5%) e Serra Leoa (43,0%). A resistência adquirida a rifampicina observada em 14 países variou entre 16,4 e 57,9%. Taxas elevadas como as encontradas, considerando-se a importância dessas drogas no esquema terapêutico revelam situação muito complicada para o controle da doença nesses países (Rosemberg, 1999).

#### 1.1.3. 2 Distribuição geográfica mundial

A Ásia concentra o maior contingente de tuberculosos e as mais altas taxas de resistência no mundo, particularmente a Índia e o Paquistão. Os países do Leste Europeu, notadamente os da antiga União Soviética, também registram altas taxas: Latvia/Letônia (41,6%); Estônia (31,2%); Rússia (38,3%). Os países da Europa Central e Oeste têm baixos índices de resistência.

Na África, a prevalência da resistência combinada é em geral alta, concorrendo para isso, a epidemia do HIV com os índices mais altos do mundo e programas de tuberculose desestruturados e ineficientes.

Nas Américas, a prevalência da resistência combinada é relativamente baixa, porém índices altos têm sido registrados no norte do Peru (54,5%), na República Dominicana (41%), na Bolívia (28,4%) e na Argentina (18%) (Pablo-Mendez et al., 1998; Rosemberg, 1999).

### 1.1.3. 2.1 Situação do Brasil

O quadro da tuberculose no Brasil é considerado como severo, ocupa o 10º lugar entre os 22 países que concentram 80% dos casos do mundo.

Com uma população de 169.799170 habitantes (BRASIL/MS/Datasus, 2002a) foram notificados no ano de 2000, 103.060 casos novos da doença sendo o coeficiente de incidência da doença 60,70/100 mil hab. Este coeficiente varia extraordinariamente devido a desigualdades sócio-econômicas existentes nas diferentes regiões. Dados do ano de 2000 indicam que na Bahia a taxa de incidência de tuberculose foi de 103,22 por 100 mil hab., enquanto que no Amapá foi de 0,42 por 100 mil habitantes (BRASIL/MS/Datasus, 2000b). Do total de casos notificados cerca da metade, são formas pulmonares bacilíferas. Essa proporção tem se mantido ao longo da última década.

As projeções para o ano de 2002 são de 131.769 casos novos diagnosticados, caso não haja interferência capaz de modificar o curso da progressão epidemiológica da doença. A mortalidade por tuberculose é considerada baixa, variando nas diferentes capitais do Brasil entre 3 a 16 /100.000 habitantes. Os índices de cura giram em torno de 70% e o abandono dos pacientes que iniciam tratamento, está na faixa dos 14% (BRASIL/MS/Funasa, 2000)

Dados do “Projeto Global de Vigilância da Resistência às Drogas Antituberculose” revelam que no Brasil as taxas de resistência primária estão em: 5,9% para isoniazida; 1,1% para rifampicina; 0,1% para etambutol e 3,6% para estreptomicina. Quanto à resistência adquirida observou-se as taxas de 11,2% para isoniazida; 6,1% para rifampicina; 0,3% para etambutol e 5,4% para estreptomicina (WHO/UILATD, 1997).

### 1.1.3.2.2 Situação do Ceará

O Estado do Ceará apresenta índices de tuberculose bastante preocupantes. Com uma população de 7.430.661 habitantes (BRASIL/MS/Datasus, 2002a). Em 2000 foram notificados 3.353 casos novos de tuberculose sendo 45,12/100 mil a taxa de incidência da doença. No Ceará, baseado nas taxas de incidência em ordem decrescente, os municípios eleitos como prioritários para o controle da doença são os seguintes: Sobral, Fortaleza, Maracanaú, Crateús, Caucaia, Juazeiro do Norte, Itapipoca, Crato e Maranguape (BRASIL/MS/Datasus, 2002b).

No período entre julho de 1995 e agosto de 1996, o Estado do Ceará juntamente com outros estados do Brasil participou do Projeto Global da WHO/UIIATD. Todas as amostras de escarro positivas para bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) ao exame direto, coletadas em 4 unidades de saúde de Fortaleza foram submetidas ao teste de sensibilidade pelo método das proporções indireto em meio sólido. Do total de amostras de 506 pacientes sem história de tratamento anterior, foram encontrados 03 (0,6%) pacientes com (MDR-TB primária), e de amostras de 122 pacientes anteriormente tratados, foram encontrados 04 (3,3%) pacientes TBMR adquirida (Campelo, 1999; Barroso et al., 2001).

Barroso et al. (2001) em estudo retrospectivo sobre a prevalência da tuberculose multirresistente no Estado do Ceará no período de 1990 a 1999, detectou em 1.500 testes de sensibilidade as drogas antituberculose realizados, um total de 404 (27%) cepas com resistência combinada a pelo menos 1 droga, e 266 (17,7%) cepas resistentes a pelo menos rifampicina + isoniazida, consideradas MDR-TB. O total de notificações de casos de Tb ativa no período estudado foi de 41.073 casos, portanto a prevalência combinada da MDR-TB no Estado do Ceará nesse estudo foi determinada em 0,65%. Analisando-se ano a ano nesse período de estudo de 10 anos, observamos que em 1994, a taxa de prevalência da resistência combinada foi de 0,82%

aumentando para 1,48% em 1999. Embora baixos esses valores são preocupantes, pois se apresentam numa curva ascendente.

A tendência crescente da resistência também tem sido observada em países industrializados como o Reino Unido que apresentava em 1993, uma prevalência de TBMR de 0,6% passando para 1,7% em 1996 (Bennett et al., 1996) e na Alemanha, onde a prevalência da MDR-TB combinada elevou-se de 1,7 em 1987, para 5,8% em 1993 (Schaberg, 1996).

Barroso et al. (2001), assim como Park e Davis (1996) alertam para outras conseqüências nefastas da progressão crescente de cepas de *M. tuberculosis* resistentes, chamando a atenção que a sobrevivência de um paciente multirresistente (TBMR) com baciloscopia de escarro persistentemente positiva, pode ser relativamente longa, o que amplifica extraordinariamente a chance de disseminação de bacilos resistentes na comunidade e principalmente entre seus contactantes.

#### 1.1.3.3 Mecanismos de Resistência às drogas antituberculose

As características biológicas *M. tuberculosis* levam à geração contínua de mutações em seu material genético. Em grande parte, estas mutações inviabilizam a sobrevivência do bacilo, levando à sua destruição. Algumas mutações não causam nenhum efeito. Outras, no entanto, tornam o bacilo resistente ao(s) medicamento(s) antituberculose. Essa característica inata do bacilo da tuberculose é denominada por resistência natural (presença de germes mutantes resistentes em uma população de *M. tuberculosis* selvagens) às drogas antituberculose.

Quando isto ocorre, há uma seleção desta população bacilar, que passa então a se multiplicar sem a inibição eficiente do medicamento. Não há qualquer indício que o bacilo da tuberculose tenha capacidade de utilizar algum

processo ativo para incorporação de mutações que lhe tragam resistência aos medicamentos. Quanto maior for a população bacilar e sua taxa de multiplicação, maior será a chance de gerar uma população *M. tuberculosis* resistentes.

Cada droga tem o seu mecanismo de ação definido, conhecido ou não. A droga atua em alvos isolados ou múltiplos, geralmente bloqueando ou alterando metabólitos e enzimas essenciais à sobrevivência do bacilo. A exposição a uma droga única, pelo grande número da população bacilar existente no doente, pode facilmente selecionar bacilos naturalmente resistentes que escapam a sua ação, tornando-se assim uma população composta de bacilos resistentes.

Bacilos mutantes resistentes aparecem como uma constante matemática para cada droga (Rosemberg, 1999). Assim, para cada droga, temos diferentes probabilidades de ocorrência de bacilos mutantes em uma população bacilar:

- probabilidade baixa: Rifampicina (R) – 1 mutante em  $10^{10}$  bacilos;
- probabilidade intermediária: Estreptomicina (S) e Isoniazida (H) – 1 mutante em  $10^8$  bacilos; Etambutol (E) – 1 mutante em  $10^7$  bacilos; Kanamicina (K) – 1 mutante em  $10^6$  bacilos; Pirazinamida (Z) - 1 mutante em  $10^3$  bacilos;
- probabilidade alta: Etionamida (Et), Cicloserina (C), Tiacetazona (Th), Viomicina, Capreomicina - 1 mutante em  $10^3$  bacilos.

### 1.1.3.3.1 Mecanismos moleculares

As mutações que conferem resistência ao *M. tuberculosis* são cromossômicas e são atribuídas principalmente as modificações em genes "alvos das drogas", que acabam por ser alterados ou destruídos (Spratt, 1994; Davis, 1994). A probabilidade de desenvolvimento de resistência simultânea à pelo menos duas drogas, portanto passa a ser multiplicativa.

Os principais alvos para o desenvolvimento da resistência podem ser agrupados em dois, de acordo com a sua principal interferência:

- Barreira de contenção bacilar (redução da permeabilidade e/ou alteração nas bombas de efluxo);
- Síntese de enzimas e outras substâncias vitais (codificação alterada, degradação, inativação).

Alguns genes cujas mutações conferem resistências às drogas já foram identificados.

- **Resistência a Rifampicina (R{R}).** A rifampicina (R) é uma droga do grupo das ansamicinas. Atua através de sua ligação com genes {*rpo* A,B,C,D} da micobactéria que codificam a enzima RNA polimerase, bloqueando a sua transcrição. Mutações no *rpo* B levam a alterações na subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, conferindo uma ligação defeituosa da droga ao seu alvo, resultando em resistência (Cole, 1994; Ponce de Leon, 2000). Alterações nos códons Ser531 e His526 representam mais de 70% das mutações que levam a resistência a rifampicina (Rattan et al., 1998).
- **Resistência a Isoniazida (H{R}).** O gene *katG* codifica a catalase-peroxidase, enzima ativadora da isoniazida (H) em um composto intermediário eletrofílico instável, necessário a ação intracelular da

droga. Em 1953 Middlebrook conseguiu isolar mutantes resistentes a H desprovidos da atividade catalase. Zhang et al. (1992), comprovaram que o gene *katG* era defeituoso em muitas cepas de bacilos resistentes a H. Mutações do *katG* e *HA* são encontradas em 70 a 80% das amostras H resistentes (resistência relacionada com a perda da atividade catalase). Mutações em outros genes, tais como, na região *oxyR-ahpC* (OxyR transcription factor, AhpC alkyl-hydroperoxidase e *kasA*  $\beta$ -ketoacil ACP sintetase ) são encontradas em 20% das amostras H resistentes ( Riska et al. ,2000).

- **Resistência a Pirazinamida (Z{R}).** A pirazinamida (Z) é uma droga de ação intracelular exclusiva, ela é ativa em bacilos semidormentes ou quiescentes, que não são alcançados por outras drogas (Heifets & Lindholm-Levy, 1992) Age sinergicamente com a rifampicina e a isoniazida. O gene *pncA* codifica piraminadase. Mutações nesse ponto conferem resistência a pirazinamida (Riska et al., 2000).
- **Resistência ao Etambutol (E{R}).** O etambutol (E) interage com proteínas do gene *embCAB* dentro do meio intercelular do bacilo. A droga inibe a arabinosyl transferase, seu alvo principal, determinando a inativação da síntese do arabinogalactano, componente da parede celular do bacilo. Essa interação impede ainda a transferência do ácido micólico para construção da mesma parede bacilar. Níveis de Beta-D-arabinofuranosyl-1-monophosphoryl decaprenol rapidamente se acumulam em bacilos sensíveis quando expostos ao E. Tem sido demonstrado alterações na seqüência do gene *embCAB* em cerca de 70% das amostras resistentes. Mutações no locus *embB* locus produzem alvos alterados, podendo ser causa de resistência (Riska et al., 2000).
- **Resistência a Estreptomicina (S{R}).** A estreptomicina (S) interrompe a decodificação do aminoacyl t-RNA inibe assim, a translação do mRNA. Duas distintas classes de mutações estão bem estabelecidas como

determinantes da resistência do bacilo à estreptomicina: a primeira - um ponto de mutação na proteína ribossomial S12 codificada pelo gene *rpsL*; e a segunda - um ponto de mutação na região *rrs*, codifica 16S rRNA (Riska et al., 2000).

- **Resistência a Fluoroquinolonas (FQ{R}).** As fluorquinolonas (FQ) inibem a DNA girase e a topoisomerase II, resultando em interrupção da transcrição e da divisão bacilar. Essas enzimas são heterotetrâmeros com subunidades codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*. As quinolonas têm sido utilizadas nos últimos anos, no tratamento alternativo da tuberculose. Mutações no gene *gyrA* têm sido associadas com altos níveis de resistência. Entretanto, outras mutações podem ocorrer, como no códon Ser95, sem aparente relação com o desenvolvimento de resistência (Riska et al., 2000).

#### 1.1.3.3.2 Genes preditivos de *M. tuberculosis* resistentes às drogas

A genotipagem (caracterização das modificações pontuais dentro do gene) tende a se tornar uma ferramenta de extraordinária utilidade para tratamento da tuberculose. Este instrumento permitirá a monitorização específica do padrão de sensibilidade do bacilo às drogas, de forma muito mais rápida que os métodos tradicionais. Aproximadamente 90% da resistência a R, E, S e 75% da resistência a H pode ser predita através do exame de 6 códons (*rpoB531*, *rpoB526*, *rrs513*, *rpsL43*, *embB306*, e *katG315*) do bacilo. A resistência a rifampicina está associada a mutações no gene *rpoB* em mais de 96% das cepas resistentes a essa droga. Devido à importância dessa droga no esquema terapêutico da tuberculose, Van Rie et al. (2001) tem sugerido utilizar a resistência a rifampicina R{R} como marcador para a detecção da MDR-TB.



#### 1.1.3.4 Fatores implicados no desenvolvimento da resistência do *M. tuberculosis* às drogas

A emergência do *M. tuberculosis* resistente às drogas antituberculose em uma população tem sido geralmente associado a uma variedade de fatores relacionados à eficiência do programa de controle (Barnes, 1987). De fato, em muitos países não existem programas estruturados de controle da tuberculose, com utilização de drogas normatizadas. Em outros, com programas relativamente bem estruturados, como é o caso do Brasil, a desorganização da rede de atendimento, falhas no suprimento da medicação, instabilidade nas políticas de saúde e na organização conjuntural do país, podem comprometer a eficiência dos programas de controle da tuberculose e favorecer da mesma forma o surgimento da resistência.

O uso de esquemas terapêuticos com drogas de qualidade não assegurada é um problema adicional. A compra de matéria prima de baixa qualidade no mercado internacional, a produção de drogas sem o devido padrão de qualidade ou falhas no monitoramento da produção, estocagem e até mesmo, inobservância de prazo de validade das drogas podem comprometer a qualidade da medicação distribuída no programa de controle da doença.

Prescrição de esquemas equivocados pelos profissionais de saúde pode resultar no desenvolvimento da resistência. Erros podem ocorrer na seleção inadequada de drogas, na utilização de medicamentos de baixa eficácia contra os bacilos, na incapacidade no reconhecimento de tratamento anterior, na adição de drogas isoladas em regimes de falência (Mahmoudi & Iseman, 1993) ou mesmo em falhas de monitorização do esquema utilizado.

A resistência pode se desenvolver também por fatores relacionados ao próprio paciente. Esses fatores são facilmente identificados, pois são evidentes. O abandono ao tratamento acabou sendo apontado como o principal fator indutor do desenvolvimento da resistência por ser logo visível. Inúmeros são os estudos demonstrando a baixa adesão ao tratamento da tuberculose, e relacionando esse fato com a falência do tratamento (Fox, 1983a; Fox, 1983b).

O abandono tanto pode ser decorrência da quebra da relação paciente – equipe de saúde (falta de empatia e/ou desatenção da equipe, falhas no processo de conscientização da importância e duração do tratamento) quanto de dificuldades sócio econômicas que não permitem o acesso à unidade de saúde. A intolerância medicamentosa, as intercorrências clínicas e o alcoolismo podem comprometer a tomada regular e em doses adequadas das drogas levando a suspensão temporária da medicação ou ao abandono total (Addington, 1979; Sumartojo, 1993).

A infecção pelo HIV tem sido outro fator associado ao surgimento da TBMR, embora os resultados de estudos tentando estabelecer essa relação tenham sido inconsistentes até agora (Gordin et al., 1996).

Existem, contudo, fatores subliminares freqüentemente relegados. Destacamos entre estes a resposta imunológica individual do paciente, o efeito da desnutrição, alterações absortivas na mucosa intestinal que comprometa a biodisponibilidade das drogas e que potencialmente podem levar ao surgimento da resistência. A idéia desse trabalho é contribuir para o esclarecimento do desenvolvimento da resistência do *M. tuberculosis* às drogas antituberculose, através do estudo desses últimos fatores.

## 1.2 Tratamento da Tuberculose

### **- Estratégia Proposta pela OMS para a Prevenção da Resistência do *M. tuberculosis*.**

Uma forte correlação entre a qualidade dos programas de controle da tuberculose e a prevalência da resistência dos bacilos às drogas existe de fato, e todos fatores implicados no controle da qualidade têm merecido atenção

através de inúmeros estudos. De modo geral esses estudos ressaltam que a tuberculose resistente cresce com o abandono e com os tratamentos irregulares e se fortalece entranhada nas precárias condições sócio-econômicas de países com redes de saúde e programas de tuberculose ineficientes.

O índice de MDR-TB adquirida (obtido da divisão do número de pacientes com MDR-TB adquirida, pelo número de pacientes bacilíferos que se submetem ao primeiro tratamento) tem sido usado como indicador útil para a avaliação do rendimento dos programas de quimioterapia da tuberculose. Quanto maior esse índice, maior a dimensão da resistência, significando maior desorganização do programa de controle da doença. Regiões com altos índices de MDR-TB representam áreas de alto risco de disseminação de bacilos virtualmente incuráveis, o que se traduzirá em enorme preocupação e prejuízo, uma vez que obviamente esses países não têm acesso aos mais sofisticados e caros cuidados de saúde que os pacientes TBMR estarão a exigir.

Por esse motivo a Organização Mundial de Saúde traçou estratégias para a prevenção da resistência do *M. tuberculosis*, estabelecendo dois princípios fundamentais para o tratamento da tuberculose (WHO, 1998):

#### 1. Garantia da tomada regular das drogas

- A política adotada baseia-se na transferência da responsabilidade do tratamento, antes quase exclusivamente do paciente, para os órgãos oficiais de saúde, que devem ter equipes treinadas em aconselhar pacientes e familiares sobre a doença e principalmente assistir os pacientes na hora da tomada dos medicamentos. Essa estratégia denominada tratamento diretamente observado de curta duração – Directly Observed Treatment Short-Course (DOTS) é considerada necessária como garantia da tomada de drogas até a

cura e tem contribuído eficientemente para a prevenção da tuberculose resistente (Weis et al., 1994).

O Brasil até 1995 estava na relação dos oito países que não utilizavam o DOTS como estratégia de Programa de Controle da Tuberculose. Apesar de dispor de possibilidades econômicas, essa medida não era considerada prioritária no entender da Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária (CNPS). Com o lançamento do Plano Nacional de Controle da Tuberculose em 1998 (BRASIL/ MS/CNS, 1998), essa postura foi revista e hoje existem mais de 170 serviços que de alguma forma supervisionam o tratamento dos pacientes (Ruffino Netto & Souza, 1999).

2. O tratamento da tuberculose deve ser feito com um regime de no mínimo 04 drogas às quais o bacilo seja sensível.

- A OMS recomenda que o DOTS deve ser administrado com quatro drogas – isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol ou estreptomicina apesar de vários autores questionarem a introdução de uma quarta droga (Mitchison, 1985). O Brasil foi um dos pioneiros na adoção do esquema tríplice de curta duração autoadministrado e implantação para o tratamento de massa da tuberculose, tendo tido resultados considerados satisfatórios (Gerhardt et al., 1992), por esse motivo o Programa Nacional de Controle marcou posição, incorporando a estratégia do DOTS, mas mantendo apenas três drogas de primeira linha: rifampicina, isoniazida e pirazinamida (Teixeira, 1998)

Estratégias como o Directly Observed Treatment Short-course (DOTS) tem sido incentivadas em todo o mundo para garantir a chegada do medicamento à boca do doente. (WHO/UIIATD, 1994). Entretanto, é preciso ter clareza que mesmo a tomada regular do esquema correto não é sinônimo de tratamento eficaz, o fundamental deve ser a garantia de níveis terapêuticos eficientes.

### **1.2.1 O esquema terapêutico normatizado no Brasil para tratamento da tuberculose - Uso de medicação com doses fixas combinadas**

O uso de doses fixas combinadas (DFCs) de medicação antituberculose tem sido usada já há algum tempo e se constitui atualmente no componente chave das recomendações para a garantia da tomada do esquema de forma correta, sendo indicada para a rotina de tratamento da tuberculose em quase todos os países, entre eles o Brasil (WHO/IUATLD, 1994).

O esquema brasileiro fornecido gratuitamente pelo sistema público de saúde combina a rifampicina 300 mg e a isoniazida 200 mg ou rifampicina 150 mg e isoniazida 100 mg num mesmo comprimido, cápsula ou drágea. São utilizados 600 mg de R e 400 mg de H (para adultos com peso igual ou maior do que 45 kg) diariamente durante 6 meses, associado à pirazinamida comprimidos, na dose de 2 g por dia, durante os 2 meses iniciais. Orienta-se a tomada da medicação de uma só vez, pela manhã em jejum conforme o I Consenso Brasileiro de Tuberculose (1997).

Existem muitas vantagens na utilização de doses fixas combinadas em relação ao uso de drogas isoladas para o tratamento da tuberculose (Moulding et al., 1995). A prescrição de drogas combinadas simplifica a prescrição médica, reduzindo assim a margem de erro, facilita o entendimento do paciente pela redução da quantidade de comprimidos tomados, diminui a confusão de medicação facilitando a adesão do paciente ao tratamento. Além disso, facilita a gerência de compra e distribuição de drogas, reduz o risco da falta de estoque da medicação fornecida pelos governos e evita a utilização da medicação antituberculose em outras situações clínicas que não o tratamento da doença.

O uso de drogas combinadas tem ainda uma importantíssima ação na prevenção da monoterapia e na prescrição da dosagem correta das drogas evitando dessa forma o perigo da multirresistência às drogas (Ellard & Fourie, 1999; Sbarbo et al., 1999). Por todos esses motivos, o uso de drogas em doses

fixas combinadas logo foi introduzida nos Programas de Controle da Tuberculose da maioria dos países.

### **1.2.2 Qualidade das drogas nas preparações combinadas**

A formulação de medicações antituberculose combinadas (2, 3 ou 4 drogas em uma mesma cápsula ou comprimido) é capaz de atingir doses séricas equivalentes as medicações tomadas separadamente (WHO/IUATLD, 1994; Ellard et al., 1986; Acocella et al., 1988a; Acocella et al., 1988b; Acocella, 1989; Fox, 1990a; Pahkla et al., 1999; Gurumurthy et al., 1999).

Vários autores, contudo, chamam a atenção de que a formulação combinada só é realmente efetiva se for garantida a dosagem correta, a absorção intestinal e a concentração sérica conveniente de cada um dos componentes (Blomberg et al., 2001).

A preocupação com a biodisponibilidade da rifampicina em DFCs foi primeiro levantada por Acocella na década de 80 e depois, por Ellard em 1986 e em 1990 por Fox na Índia, após a publicação de vários estudos mostrando que, se a manufatura das preparações combinadas não for meticulosamente controlada, a absorção dos componentes, particularmente a rifampicina, considerada a droga chave da quimioterapia encurtada, pode ser incompleta, o que pode comprometer o resultado do tratamento (Ellard et al., 1986; Acocella et al., 1988a; Acocella et al., 1988b; Acocella, 1989; Ellard & Fourie, 1999; Padgaonkar et al., 1999).

O método mais seguro para avaliação da concentração plasmática das drogas é através da análise por Cromatografia Líquida de Alta Pressão - High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Por esse método as outras drogas como isoniazida, pirazinamida e etambutol também podem ser dosadas (Smith et al., 1999).

Recentes estudos de bioequivalência de drogas antituberculose utilizadas em combinações fixas, disponíveis no mercado global tem levado

grande preocupação a organismos como a OMS/IUATLD (Organização Mundial de Saúde / International Union Against Tuberculosis and Lung Disease) pelos resultados obtidos que demonstram baixa bioequivalência entre medicamentos antituberculose produzidos em diferentes laboratórios (Padgaonkar et al., 1999).

Pillai et al. (1999) em publicação recente, demonstraram que de 10 formulações testadas, somente três foram consideradas equivalentes, as demais, com 90% IC foram incluídas em valores abaixo de 80%. A margem terapêutica da atividade da rifampicina é relativamente baixa (Mitchison, 1992), portanto qualquer redução na biodisponibilidade tem sérias implicações tanto para o paciente individual quanto para o controle da doença nos diferentes países, quer devido ao potencial de falência de tratamento, ou quanto à seleção de mutantes resistentes.

A partir desses estudos a OMS e a IUATLD passaram a exigir estudos prévios comprovados de biodisponibilidade da rifampicina (IUATLD/WHO, 1999) na recomendação do uso de drogas fixas combinadas (DFCs) nos programas de controle da tuberculose dos diversos países.

### **1.2.3 As drogas antituberculose produzidas no Brasil**

O controle de medicamentos para os Programas de Saúde Pública utilizados no Brasil é responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Todos os medicamentos para o tratamento da TB produzidos no Brasil são categorizados como similares. Nenhum foi registrado como genérico (BRASIL/MS/ANVISA, 2002a). Esse dado faz diferença, pois para registro de medicamentos similares no Brasil, segundo a regulamentação vigente da ANVISA, não há obrigação de informar a origem da matéria-prima. Reconhece-se, contudo, a Índia e Tailândia como os maiores fabricantes internacionais de drogas antituberculose e que detêm a maior parte das vendas do produto bruto

no mercado internacional (Catalani, 1999). No Brasil, as compras do produto bruto são intermediadas pelo Ministério da Saúde, de acordo com análise de preços de licitações internacionais e existem 25 laboratórios registrados para a fabricação de drogas para o tratamento da tuberculose (BRASIL/MS/ANVISA, 2002b).

No caso dos medicamentos registrados como similares, as empresas têm que enviar laudos, metodologia, estabilidade e especificações de seus produtos conforme parâmetros farmacopeicos, quando do registro não sendo obrigadas a realizar estudos de equivalência farmacêutica e bioequivalência. Estes testes só são exigidos para medicamentos genéricos (BRASIL/MS/ANVISA, 2002c).

Os estudos de bioequivalência não têm sido necessários para o registro de drogas antituberculose no Brasil, apesar da orientação da OMS/IUATLD nesse sentido. As formulações têm sido registradas baseadas apenas nos testes de dissolução e estabilidade do produto. Não se tem acesso a informação sobre os medicamentos referência utilizados pelos laboratórios produtores, se é que padrões são de fato utilizados.

Portanto, quanto à qualidade da medicação fornecida pelo Programa de Controle da Tuberculose, não existe até o momento estudos feitos sobre a avaliação de equivalência farmacêutica e testes de bioequivalência das drogas antituberculose produzidas e utilizadas no Brasil.

As implicações decorrentes desse fato para o Programa Nacional de Controle da Tuberculose são desconhecidas, uma vez que não temos idéia da qualidade das drogas utilizadas para o tratamento da doença. Atitudes da vigilância farmacêutica nesse sentido são pouco divulgadas no Brasil, fortalecendo dessa forma a preocupação atual da Organização Mundial de Saúde quanto ao assunto. A Coordenação do Programa de Controle da Tuberculose no Brasil não tem ingerência sobre a qualidade da medicação antituberculose distribuída no país.



A questão da qualidade das drogas antituberculose no Brasil deveria além da lógica preocupação pela ótica da saúde, ser vista também como prioridade econômica. O mercado brasileiro das drogas antituberculose é enorme.

Tomando-se por base o total de casos notificados a cada ano no Brasil (cerca de 100.000 casos novos/ano) e o custo de um tratamento ambulatorial completo para paciente sensível, cerca de R\$ 137,50, segundo dados do I Consenso Brasileiro de Tuberculose (1997), calcula-se que o Ministério da Saúde gaste no mínimo R\$13.750.000,00 para garantir apenas o tratamento (Esquema I) dos doentes notificados. Não estão computados nessa estimativa, gastos para o estabelecimento do diagnóstico, para o exame de comunicantes, gastos com treinamento de pessoal, seguridade social entre muitos outros. Não entraram ainda nessa estimativa, gastos com tratamento de segunda linha ou especial (Esquema I –R ou Esquemas de falência ou para TB-MDR), e mesmo o bônus-incentivo de R\$ 200,00 repassados à unidade por paciente curado com tratamento supervisionado DOTS.

Para o tratamento de TBMR, o custo médio de um único paciente, somente com medicação, salta para R\$ 3.500,00 a R\$ 4.500,00 dependendo do esquema a ser utilizado (Rosemberg, 1999). Considerando o número estimado pelo Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, de 1000 pacientes TBMR para tratamento em todo o Brasil, podemos calcular um custo astronômico somente com o tratamento cuja eficácia é muito baixa. Deveria, portanto, haver uma maior preocupação dos gestores para com os gastos decorrentes do tratamento da tuberculose, pela potencialidade de elevação estratosférica dos gastos com a medicação, caso não ocorra vigilância efetiva na prevenção da multirresistência.

#### 1.2.4 Importância da rifampicina e da isoniazida no esquema terapêutico da tuberculose - Aspectos do mecanismo de ação e farmacocinética

##### ▪ RIFAMPICINA

A rifampicina (R) é um antibiótico semi-sintético complexo derivado da rifamicina B, obtido de culturas do *Streptomyces mediterranei*. Descoberta em 1966, somente foi introduzida na terapêutica da tuberculose em 1971 e no Brasil, a partir de 1979. Difunde-se rapidamente através da membrana celular, devido a sua característica lipofílica e penetra com facilidade nas células fagocitárias, sendo bactericida tanto para bacilos intra, quanto extracelulares e até para aqueles com crescimento intermitente. Tem intensa ação esterilizante, atuando por inibição da RNA polimerase. É a droga que induz menor número de mutantes resistentes, sendo considerada a mais importante droga antituberculose disponível atualmente.

A rifampicina é bem absorvida por via oral, mas pode ter sua absorção reduzida em várias situações clínicas (Advenir et al., 1983). É amplamente distribuída nos tecidos e líquidos corporais, inclusive líquido. Cerca de 85 a 91% da rifampicina sérica circula ligada às proteínas séricas (Boman & Ringberger, 1974). Doses usuais (600mg) dadas em jejum produz concentração sérica máxima (Cmax) de 8 a 24 µg/ml em duas horas (Buniva et al., 1983; Kroup et al., 1986; Acocella et al., 1988 a; Acocella et al., 1988 b; Kimerling et al., 1998; McIlleron et al., 1999).

Sua absorção pode ser demorada, cerca de 5 horas, ou incompleta se for tomada juntamente com alimentos, alterando conseqüentemente a Cmax e o tempo para atingir concentração sérica máxima (Tmax) (Siegler et al., 1974; Zent & Smith, 1995; Peloquin et al., 1999). A maior parte dos bacilos é sensível “*in vitro*” à concentração de 0,5µg/ml (Mac Gregor, 1988). É desacetilada ao nível do fígado, produzindo a desacetyl rifampicina, sendo a excreção biliar, a principal rota de eliminação da rifampicina. Uma vez no intestino, parte dela sofre reciclagem êntero-hepática.

A desacetyl rifampicina é um metabólito que mantém atividade antituberculosa, mas é bem menos absorvida pela via gastrointestinal. Durante as repetidas passagens pelo fígado, vai ocorrendo uma metabolização progressiva da droga. A rota biliar fica saturada com pequenas doses e aumenta a meia vida da droga que passa a ser excretada na urina. A insuficiência hepática eleva os níveis séricos da rifampicina (Peloquin, 1991; Dollery, 1991).

A meia vida da rifampicina após uma dose oral de 600 a 900 mg é aproximadamente 3,4 a 3,6 horas. Com a continuação do tratamento diário ocorre uma progressiva redução dos níveis séricos e da meia vida, devido à indução das enzimas microssomiais hepáticas e a excreção biliar, ficando a meia vida da droga em 1,7 hora, por volta do terceiro mês.

#### ▪ **ISONIAZIDA**

A isoniazida é uma droga antituberculose sintética derivada do ácido isonicotínico, empregada no tratamento da doença desde 1952. Tem ação bacteriostática ou bactericida dependendo de sua concentração no sítio da infecção e da susceptibilidade do bacilo. Vários mecanismos têm sido propostos para esclarecer a sua ação, entre eles, interferência no metabolismo bacilar produtor de proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios. Uma de suas principais ações parece ser a inibição da síntese do ácido micólico do bacilo, o que resulta na quebra da parede bacilar.

A isoniazida age principalmente em bacilos de multiplicação ativa. Sob o efeito da droga, uma ou duas multiplicações ainda podem ocorrer, até a cessação total da multiplicação bacilar. Por ser um medicamento de alta potência, indutora de índices relativamente baixos de resistência, pouco tóxica e de baixo preço, a isoniazida tem papel fundamental ao lado da rifampicina nos esquemas de primo tratamento da tuberculose.

A isoniazida é bem absorvida por via oral, e distribui-se amplamente pelos tecidos corporais, inclusive no líquido cefaloraquidiano. A CMax da isoniazida é alcançada dentro de 1 a 2 horas após administração oral. A ingestão da droga junto com alimentos ou com antiácidos pode reduzir tanto a

absorção quanto a concentração sérica máxima da droga (Hurwitz & Schlozman, 1974).

Tem ação bactericida “*in vitro*” na concentração 0,025 a 0,2 µg/ml. A circulação da droga é feita mais de forma livre, do que ligada às proteínas do plasma. O metabolismo da isoniazida é hepático e envolve principalmente a acetilação.

Fatores genéticos como gene autosômico recessivo que resulta numa deficiência relativa da enzima N-acetyltransferase hepática determinam a velocidade da acetilação. Os acetiladores lentos tem resposta terapêutica melhor, nestes a meia vida da droga é de 3 horas enquanto que, nos acetiladores rápidos é de 1 e meia hora. Aproximadamente 50% dos brancos e negros são acetiladores lentos, enquanto que japoneses, chineses e nativos do Alasca são acetiladores rápidos. Essas diferenças, entretanto não interferem significativamente na eficácia nem na toxicidade da droga nas doses empregadas nos programas de controle. A isoniazida é parcialmente excretada na urina sem sofrer modificações e parcialmente em formas acetiladas ou inativadas de outras maneiras.

### **1.3 Absorção Intestinal das Drogas Antituberculose**

Vários trabalhos chamam a atenção de que, embora o teste de dissolução da droga, possa ser utilizado como guia para assegurar a biodisponibilidade, formulações com boa dissolução, algumas vezes são pouco absorvidas ou vice versa (Pelizza et al., 1977; Buniva et al., 1983; Acocella, 1989; Aspesi, 1989).

O uso de drogas orais no tratamento da tuberculose pressupõe a necessidade uma boa absorção intestinal. Quando isso não ocorre, é possível que o tratamento esteja sendo feito com subdoses, favorecendo o desenvolvimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes às drogas.

Dificuldades na absorção intestinal têm sido relacionados a erros na manufatura das drogas, particularmente as formulações combinadas de três drogas (R+H+Z) (Fox, 1990a; Fox, 1990b). Variações no tamanho dos cristais da rifampicina alteram a absorção intestinal da droga. Se as condições de umidade e/ou de temperatura não forem mantidas abaixo de um limite crítico, durante a manufatura ou a estocagem do produto, a estrutura de cristais de rifampicina pode ser alterada, comprometendo a absorção intestinal e a biodisponibilidade (Pelizza et al., 1977).

Kimerling *et al.* (1998) observaram dados até inesperados em alguns pacientes que faziam uso regular de álcool - níveis séricos de rifampicina significativamente aumentados. Segundo os autores, os dados poderiam ser explicados por retardo na metabolização da droga, mas a possibilidade da ocorrência de uma maior solubilidade da rifampicina na presença do álcool, concorrendo para o aumento dos níveis séricos da droga, deveria ser aventada também como explicação.

Contudo, o fator determinante da absorção das drogas é própria capacidade absorptiva da mucosa intestinal dos pacientes, que pode estar alterada. Os achados de Peloquin (1993), Turner et al. (1994), Kimerling et al. (1998) e Mehta et al. (2001) sugerem que mesmo na ausência de sinais sugestivos, a mal-absorção de drogas antituberculose ocorre em 2 a 5% dos pacientes aderentes ao tratamento, devendo ser sempre investigada como uma, entre as muitas razões da falência ou recaída após terapia.

### **1.3.1 Mal-absorção intestinal de drogas antituberculose em diversas situações**

Alterações na função intestinal têm sido bem documentadas na AIDS por diversos autores. Resultados preliminares de Bushen et al. (2003) em pacientes HIV<sup>+</sup> acompanhados no Hospital São José em Fortaleza- Ceará, mostram importante redução nas concentrações sanguíneas de estavudina e

didanosina (antiretrovirais orais) em grupo com diarreia quando comparados a grupos de pacientes sem diarreia, demonstrando a relação de alterações intestinais com a biodisponibilidade de drogas.

Estudos em pacientes HIV<sup>+</sup> com ou sem diarreia podem apresentar marcada redução na capacidade absorptiva da mucosa intestinal, quando comparados em testes funcionais, com controles sadios (Tepper et al., 1994; Lima et al., 1997). Nesses pacientes, as alterações funcionais intestinais têm sido correlacionadas com alterações anatomo histológicas da mucosa identificadas na microscopia (Gillin et al., 1985). Essas alterações são explicadas por desnutrição, acloridria, enteropatia, graus variáveis de infecção parasitária do trato intestinal (Goodgame, 1995; Lima et al., 1997), e infecções oportunistas do trato intestinal, como a criptosporidiose (Brasil, 2000).

Vários estudos realizados em determinados grupos de pacientes têm demonstrado alterações no perfil farmacocinético das drogas antituberculose (Peloquin et al., 1993; Peloquin, 1997). A maior parte desses estudos se refere a pacientes com AIDS e tuberculose pulmonar (Berning et al., 1992; Peloquin et al., 1996; Sahai, 1997) que com grande frequência apresentam baixas concentrações séricas das drogas antituberculose.

Estudos clínicos sugerem que na co-infecção TB-HIV<sup>+</sup>, a mal-absorção de drogas antituberculose torna-se mais freqüente à medida que a imunodepressão avança. Das drogas comumente utilizadas a rifampicina e o etambutol parecem ser as que mais sofrem redução de sua absorção intestinal no paciente HIV<sup>+</sup>. A isoniazida também tem sua absorção claramente reduzida nos HIV<sup>+</sup> que apresentam diarreia. Já a pirazinamida não parece ter sua absorção alterada nessas condições. Até o momento não se tem utilizado um teste seguro para predizer esta disfunção intestinal, embora os níveis de CD4 e distúrbios gastrintestinais possam direcionar a investigação para essa condição (Brasil, 2000).

Pacientes tuberculosos HIV negativo também podem apresentar mal-absorção intestinal. Barakat et al. (1996) apresentam caso de paciente HIV

negativo com tuberculose pulmonar de febre persistente, onde sugere que a manutenção do quadro seja devido a níveis terapêuticos insuficientes em decorrência de mal-absorção intestinal da rifampicina.

Mais recentemente, Kimerling et al. (1998), Morehead (2000) e Mehta et al. (2001) descrevem casos de pacientes tuberculosos, também HIV negativos, com resposta clínico-terapêutica insatisfatória, nos quais se confirma a redução da biodisponibilidade às drogas específicas. Outros estudos relatam que a mal-absorção de drogas pode ocorrer em pacientes tuberculosos diabéticos, alcoólatras (Hirsh et al., 1997), desnutridos (Polosa et al., 1984) ou com patologias associadas do trato gastrointestinal (Dieterlen et al., 1986).

As causas de mal-absorção intestinal em pacientes com tuberculose têm sido pouco estudadas. Lesões intestinais pelo envolvimento direto produzido pelo *M. tuberculosis* é raro e em geral não causa distúrbios na absorção intestinal (Manella, 1999), ao contrário do que tem sido visto nos pacientes HIV<sup>+</sup> onde além das causas citadas, o envolvimento direto do trato intestinal pelo complexo *M.avium-intracellulare*, pode causar mal-absorção. Na relação tuberculose/mal-absorção intestinal, outros mecanismos fisiopatológicos que não o envolvimento direto do bacilo no trato intestinal devem então estar envolvidos.

### **1.3.2 Aspectos da resposta imune local e sistêmica na tuberculose**

A tuberculose se apresenta como doença de início insidioso e de evolução crônica arrastada onde a maior parte dos pacientes evoluem com sintomatologia sistêmica: emagrecimento progressivo, anorexia, fadiga, febre baixa diária, sonolência, febre vespertina diária e sudorese noturna. Outras reações sistêmicas também acontecem como o aumento da degradação protéica, hipotensão, alterações hematológicas entre outras. As alterações intestinais que ocorrem durante essa resposta sistêmica, bem como, as repercussões que essas disfunções possam ter na absorção de nutrientes e de

drogas antituberculose não têm sido bem estudadas e fazem parte da proposta deste trabalho.

A doença é caracterizada histopatologicamente por uma resposta inflamatória de fase aguda prolongada ou crônica. Exibe um padrão diferenciado de reação - a inflamação granulomatosa, na qual o tipo celular predominante é um macrófago ativado, que assume o aspecto de uma célula epitelial modificada (célula epitelióide).

A defesa inicial frente ao *M. tuberculosis* é inespecífica. Os leucócitos polimorfonucleares têm grande capacidade de fagocitar os bacilos, porém sem nenhum poder para destruí-los, dessa forma bacilos podem ser levados a diversos recantos do organismo (Rosemberg, 2001). No processo de defesa, logo entram em cena os macrófagos alveolares que exercem papel fundamental.

O bacilo da tuberculose é pouco digerível pelos macrófagos e a sua presença induz uma resposta de baixa intensidade, típica, de hipersensibilidade retardada mediada por células T. Os bacilos se multiplicam livremente dentro dos macrófagos, ocupando todo o seu citoplasma e acabam por rompe-lo, permitindo que os lisossomos e as enzimas líticas neles contidas entrem em contato com os tecidos acabando por lesá-los. Os bacilos liberados das células destruídas são fagocitados por outros macrófagos locais ou são levados pela corrente linfática ou sanguínea a sítios distantes onde também podem ser capturados por outros macrófagos, mantendo ativado o processo inflamatório (Brasil, 1994).

Nos pacientes infectados pelo *M. tuberculosis* o recrutamento das células T é enorme. A importância dos linfócitos CD4+ quanto CD8 na resistência dos indivíduos contra a infecção por micobactérias tem sido amplamente demonstrada através de inúmeros trabalhos (Muller et al., 1987; Hubbard et al., 1991; Flynn et al., 1992; Ladel et al., 1995). Outras células



como CD14 e CD30 tem capacidade de ativação de macrófagos, portanto, participam também do processo defensivo.

Os linfócitos gama-delta, com citoplasma rico em granulações e que caracteristicamente emitem dendritos, incluem-se entre as células que participam do processo imunitário contra o bacilo. Em indivíduos não infectados, essas células constituem menos de 10% do total de células T do sangue circulante. Aumentam rapidamente para 25 a 30 % no sistema linfático e sangue periférico de infectados com o *M. tuberculosis* (Barnes et al., 1992; Ueta et al., 1994).

As citocinas produzidas por linfócitos, leucócitos e macrófagos em resposta a presença desses agentes infecciosos são liberadas no local da infecção e na corrente circulatória e são importantes mediadores da resposta imune local e sistêmica frente ao *M. tuberculosis* (Brasil, 1994).

As interleucinas 1 e 2 (IL-1 e IL-2) são necessárias para iniciar e amplificar a resposta imune. A IL-2 é a mais potente citocina ativadora de macrófagos. Agindo em associação com o Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) participa no recrutamento das células T. As IL-4 e IL-5 participam da ação contra micobactérias através da ativação dos macrófagos. A IL-6 participa juntamente com o Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), na resposta aguda frente a infecção tuberculosa. IL-8, atua mobilizando leucócitos e atraindo células T para o local da infecção. IL-10 aumenta a produção de células T. IL-12 regula recrutamento de células T. O Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e o Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) são importantes ativadoras dos macrófagos e cruciais na resposta imune tipicamente granulomatosa frente ao *M. tuberculosis* (Takashima et al., 1990; Flynn et al., 1993). O TNF- $\alpha$  participa da formação do granuloma, regula o processo inflamatório e estimula macrófagos a impedir a multiplicação do *M. tuberculosis*. Várias outras citocinas devem ter participação no processo imunitário, porém os papéis ainda não estão bem definidos.

Diante de uma infecção tuberculosa, uma quantidade exagerada de citocinas passa a ser produzida por este conjunto de células. Em consequência dessa superprodução ocorrem várias manifestações sistêmicas, tais como: febre, fraqueza, sudorese noturna e progressiva perda de peso.

#### 1.3.2.1 Imunodeficiência e tuberculose

Várias condições clínicas podem alterar o sistema imunológico, favorecendo a infecção e o adoecimento por tuberculose. A infecção pelo vírus HIV é sem dúvida alguma a condição mais devastadora. O vírus destrói o sistema celular T onde se estrutura toda a defesa contra as micobactérias. Não será objeto desse trabalho discutir essas condições. Contudo, a desnutrição e o alcoolismo, por sua frequência de associação com a tuberculose e o efeito potencialmente lesivo na mucosa intestinal merecem ser enfocados.

É senso comum que a desnutrição está intimamente relacionada com o adoecimento por tuberculose e a severidade do curso da doença. Levantamentos sobre as principais causas de internação de pacientes tuberculosos no Brasil revelam que o mal estado geral e a caquexia estão no topo da lista (Pinheiro et al., 1988; Galesi, 1999; Nogueira, 2001; Pinheiro et al., 2002).

A desnutrição altera a resposta imunológica inespecífica e específica do hospedeiro contra várias doenças infecciosas. Embora muitos aspectos da resposta imunológica celular estejam claramente relacionados ao estado nutricional, os mecanismos precisos das alterações imunológicas produzidas pela desnutrição não estão bem esclarecidos (Suskind, 1977; McMurray, 1984; McMurray et al., 1990).

A desnutrição afeta a resposta inata ou inespecífica. Diminui a produção das células de linhagem mielóide e a liberação delas pela medula

óssea. As células inflamatórias de linhagem branca em contagem normal ou até aumentadas no sangue periférico sofrem redução de sua mobilidade no sítio da infecção. A desnutrição altera ainda a quimiotaxia dos leucócitos e macrófagos, alterando o seu poder de fagocitose. A resposta inespecífica inicial gerenciada por esses 2 principais tipos celulares é fundamental no desencadear da resposta específica celular que se segue.

A desnutrição reduz a produção de citocinas mediadores iniciais da resposta inflamatória, como por exemplo, o TNF- $\alpha$  e as interleucina – 1 e 2 (IL-1 e IL-2) (Simpson & Hoffman-Goetz, 1993; Borrelli, 1995).

A desnutrição causa profunda atrofia tímica com resultante redução das áreas linfóides periféricas dependentes do timo (baço, linfonodos, amígdalas, apêndice e placas de Payer (Mugerwa, 1971; Purtilo & Connor, 1975) e uma marcada redução da produção de hormônios tímicos: timulina, timopoetina e timosina (Jambon, 1988; Keusch, 1993). A resposta humoral também é afetada. A redução das áreas linfóides, particularmente as placas de Peyer, causa diminuição da produção de Ig A secretória em consequência, a afinidade de anticorpos, especialmente para os antígenos T dependentes fica diminuída (Gupta, 1993).

As maiores consequências são as alterações que ocorrem na imunidade celular. O timo e os hormônios por ele produzidos são essenciais para a diferenciação e maturação dos linfócitos T imunocompetentes. Em consequência da atrofia das áreas linfóides periféricas ocorre uma marcada depleção dos linfócitos T, portanto observamos uma redução absoluta e relativa do número de linfócitos T maduros circulantes com uma profunda diminuição da sub-população de células CD4+ bem como uma redução um pouco menos dramática da sub-população de células CD8. Essas alterações resultam numa significativa redução da relação CD4+/CD8. A deficiência protéica afeta, portanto, a produção e a função dos monócitos, macrófagos e linfócitos bem como a secreção de citocinas produzidas por essas células.

O mais consistente e profundo efeito da desnutrição parece ser sobre as funções efectoras e regulatórias do linfócito T, intermediador da resposta celular, base da resposta imunológica frente às infecções, particularmente as micobactérias como a tuberculose (Keusch et al., 1983; Chandra, 1988; McMurray et al., 1990; McMurray, 1996; McMurray, 1998).

A desnutrição quer como fator de risco para o adoecimento, quer como fator inerente e complicador dos casos de tuberculose, particularmente por sua atividade depressora do sistema imunológica e potencial ação lesiva no trato intestinal, deve ser bem considerada em países do Terceiro Mundo onde a miséria e a desnutrição campeiam. No Brasil, particularmente na região Nordeste, os dados do binômio miséria – desnutrição são preocupantes e deve ser focado por sua semelhança com os países mais pobres do mundo.

- **Dados da miséria e da desnutrição no Nordeste do Brasil**

Miséria é uma palavra de significado impreciso, utilizado em definições sociais de forma bastante elástica. Para efeitos estatísticos existe uma definição matemática sobre o que é pobreza e miséria. Foram estabelecidas 2 grandes linhas: a primeira, a linha da pobreza, abaixo da qual estão as pessoas cuja renda não é suficiente para cobrir os custos mínimos de manutenção da vida: alimentação, moradia, transporte e vestuário, sendo a educação e a saúde bancadas pelo governo. A segunda linha é a da miséria, abaixo da qual estão as pessoas que não conseguem ganhar o suficiente para manter a necessidade básica do ser humano, a alimentação.

O percentual da população em estado de pobreza no Brasil em 1999 foi de 25,61% (BRASIL/MS/Datasus, 2002c). O percentual de pobres é definido como o percentual da população residente com renda familiar mensal *per capita* de até meio salário mínimo, em determinado espaço geográfico, em um ano considerado. Essa taxa expressa a proporção da população geral considerada em estado de pobreza, de acordo com a renda familiar mensal *per capita*.

Método de cálculo: Proporção de pobres ou Taxa de pobreza

População residente c/ renda familiar mensal *per capita* de até 1/2 SM X  
100

População total residente

O Estado do Ceará figura em 1999 no 4º lugar da classificação dos estados mais pobres do Brasil com 48,89% da população em estado de pobreza, ficando atrás somente dos Estados do Maranhão com 57,39%, do Piauí com 56,21% e de Alagoas com 51,28% (BRASIL/MS/ Datasus, 2002c)

Os índices que medem a qualidade de vida no Ceará são baixos quando comparados à média nacional. Levantamento do Unicef de 1999 coloca dois municípios cearenses, Uruoca e Barroquinha entre as dez cidades brasileiras que apresentam maior índice de desnutrição em crianças menores de 5 anos. (IBGE, 1997).

Segundo estudo do IPEA divulgado em 1999, a taxa de miséria no país está em 14,5%. Em números absolutos, existem 53 milhões de brasileiros abaixo da linha de pobreza, destes, 30 milhões vivem entre a linha da pobreza e da miséria e cerca de 23 milhões de pessoas estão na situação de miseráveis no Brasil. Metade dessa população de miseráveis vive no Nordeste.

Esse estado de miséria e fome crônica da população nos estados do Nordeste do Brasil está refletido na proporção de crianças com déficit ponderal para a idade (casos existentes por 100 crianças menores de 5 anos no período de 1996) onde a taxa geral do Brasil foi de 5,7 ficando a região Nordeste com o triste índice de 8,3 contrastando com a Região Sul onde o índice foi de 2,0. Outro dado referente a altura média de homens e mulheres brasileiros mostra o contraste das regiões nordeste (homens, 167 cm – mulheres , 155 cm) e sudeste (homens, 172 cm – mulheres, 161cm) (IBGE, 1997). Desnutrição e

baixa renda mantêm altos os índices de mortalidade infantil e de adoecimento por doenças infecciosas.

Em relação à tuberculose, não só a quantidade, mas também a qualidade da alimentação ofertada interferem no adoecimento. Alimentos pobres em proteínas, vitamina D e zinco têm sido identificados como fator de risco para o adoecimento por tuberculose.

A restrição de oferta protéica afeta o organismo como um todo. Quando o pool de proteínas diminui ocorre um redimensionamento do sistema imune. Os nutrientes protéicos disponíveis são direcionados para o uso e ativação de órgãos vitais como cérebro, coração, rins e fígado. Na desnutrição severa, observa-se uma involução progressiva do sistema imune (Keusch, 1993) e em consequência ocorre um aumento da susceptibilidade do indivíduo as infecções.

A vitamina D (Vit D) tem tido um papel controverso na patogênese da tuberculose. Em estudo caso controle, Strachan et al. (1995) demonstram um risco aumentado de adoecer por tuberculose com a diminuição do consumo de carne ou peixe. Nesse estudo e em outros relacionados, tem-se identificado a Vit D como de capital importância, particularmente em pessoas pouco expostas à luz solar. Crowle et al. (1987) demonstraram que metabólitos ativos da Vit D – 1,25-hidroxi-Vitamina D3 ou calcitriol, por sua ação sinérgica com citocinas como interferon gama (IFN- $\gamma$ ) promove maturação e ativação dos monócitos e macrófagos humanos cultivados (Rook et al., 1986; Rook et al., 1987; Denis, 1991). Em contraste, experimentos realizados utilizando macrófagos murinos infectados com *M. tuberculosis* falharam em demonstrar esse papel protetor do calcitriol quanto ao desenvolvimento da tuberculose (Rook, 1988; Bermudez et al., 1990; Rook, 1990).

O zinco outro nutriente estudado quanto a sua relação com a imunidade, tem sido apontado como necessário para um sistema imune eficiente. Tem-se demonstrado, tanto em humanos quanto em animais, que a deficiência de zinco tem um dramático e consistente efeito deletério na função imune timo dependente (Vruwink et al., 1993). Entretanto, até hoje nenhum dado experimental logrou demonstrar de forma consistente que a deficiência de zinco

tenha qualquer impacto adverso na resposta imunológica de macrófagos ou monócitos frente ao *M. tuberculosis* (McMurray & Yetley, 1983; McMurray et al., 1990).

Outra questão instigante diz respeito ao efeito que a tuberculose produz no estado nutricional dos pacientes acometidos. Inúmeros têm sido os trabalhos mostrando o curso crônico da tuberculose associado diretamente com a progressão do estado consumptivo, acabando por estabelecer um círculo vicioso, com piora da doença. A desnutrição, portanto predispõe ao adoecimento por tuberculose e a tuberculose por sua vez causa consumpção (Schwenk & Macallan, 2000).

Os mecanismos fisiopatológicos determinantes da síndrome consumptiva em doenças crônicas como a tuberculose, também não estão bem estabelecidos, mas fica claro que este é um processo multifatorial. Várias considerações têm sido feitas incluindo a quantidade da oferta nutricional ou qualidade alimentar inadequada, inapetência progressiva, alterações metabólicas, associação com alcoolismo, surgimento de infecções oportunistas intestinais, atividade de citocinas, particularmente o TNF- $\alpha$  ou caquexina (Friedland, 1994; Friedland et al., 1995) fenômenos mal-absortivos entre outras, para explicar a consumpção característica do paciente tuberculoso.

Pela sua ação na redução da atividade dos macrófagos e redução da produção do TNF- $\alpha$  o álcool exerce um potente efeito supressivo sobre o sistema imune o que aumenta a susceptibilidade do hospedeiro a uma grande variedade de infecções, entre elas a tuberculose, aumentando assim o risco de adoecimento por tuberculose (Nelson et al., 1995).

## 1.4 A Mucosa Intestinal Frente à Diversos Estímulos

A mucosa intestinal é um órgão vital nesse processo e responde dinamicamente a uma grande variedade de estímulos. É uma estrutura preparada para a função absorptiva. A túnica mucosa, que recobre internamente o tubo digestivo, tem nesse segmento, uma camada de células epiteliais (lamina epithelialis) especializadas principalmente na absorção de micronutrientes, voltadas para a luz intestinal.

Imediatamente abaixo da camada epitelial, situa-se a lâmina própria – formada por tecido conjuntivo frouxo permeado por vasos sanguíneos e linfáticos que suprem a camada epitelial e que contém folículos e nódulos linfáticos que exercem função fundamental na resposta imune do intestino. Ainda, localizada abaixo da lâmina própria, existe uma fina camada de fibras musculares lisas (lamina muscularis mucosae) que permite a movimentação dinâmica da mucosa intestinal.

O trato gastrointestinal concentra a maior parte do tecido linfóide (GALT – GUT-Associated Lymphoid Tissues) e contém estruturas efetivas integradas na resposta imune protetora da superfície mucosa intestinal (Castello-Branco et al., 1996).

A resposta da mucosa intestinal frente a um estímulo danoso, pode ser apreciada através de distúrbios isolados ou combinados das diversas funções da mucosa. Pode ser observado redução ou aumento da permeabilidade intestinal e capacidade absorptiva; variação na secreção de enzimas e mediadores por estruturas específicas; ativação da resposta imune; aumento da permeabilidade vascular com exsudação para a luz do trato e distúrbios da motilidade intestinal.

Existem muitos fatores endógenos e exógenos, capazes de induzirem dano celular na mucosa intestinal. São incluídos como fatores endógenos: reações imunológicas, alterações neurológicas ou genéticas. Quanto aos fatores exógenos, estão relacionados fatores mecânicos (traumatismos); físicos



(variações extremas de temperatura, irradiação); químicos (venenos, álcool, agentes cáusticos, substâncias tóxicas, desnaturantes protéicos); nutritivos (hipoxemia, deficiência de vitaminas e micronutrientes) e biológicos (microrganismos, parasitas e vírus).

#### **1.4.1 Alterações inflamatórias na mucosa - Estímulos infecciosos e/ou imunológicos**

O trato intestinal está sob constante ameaça devido a ingestão de antígenos exógenos presentes nos microorganismos e produtos alimentares que todo momento alcançam o trato digestivo. A maior parte dos patógenos humanos é encontrada predominantemente nas superfícies mucosas (Mc Ghee et al., 1992). A defesa das superfícies mucosas depende tanto da funcionalidade dos fatores de proteção não imunológicos, quanto da eficiência da resposta imune.

Antígenos exógenos potencialmente induzem reações imunopatológicas, capazes de danificar a estrutura da mucosa intestinal. O dano celular pode se manifestar por destruição das estruturas de membrana, desarranjo nos mecanismos de transporte, deficiência de atividade enzimática e alterações na produção de mediadores.

As infecções estão frequentemente envolvidas no dano celular. Durante o crescimento e multiplicação, os agentes infecciosos podem produzir e liberar diferentes exotoxinas que são potencialmente lesivas para a mucosa, outros agentes após a sua lise, liberam substâncias chamadas endotoxinas.

O lipopolissacarídeo (LPS) é responsável pela indução da maior parte das alterações fisiopatológicas intestinais observadas durante infecções micobacterianas e infecções por gram negativos entre outras. Entre as alterações inespecíficas induzidas pelo LPS incluem-se a pirogenicidade, o aumento do número de leucócitos, a ativação do complemento e de

macrófagos e outras inerentes à resposta inflamatória. O LPS induz ainda a resposta imune mediada por citocinas, por ser potente estimulador da produção do TNF- $\alpha$ , citocina iniciadora da cascata de produção das demais citocinas inflamatórias. Têm importância também no processo inflamatório intestinal a IL-1 e IL-8.

A IL-1, pirógeno endógeno, é primariamente produzida por macrófagos ativados em resposta ao LPS e TNF- $\alpha$ . Por sua vez a IL-1 estimula a produção de IL-6 pelos macrófagos e juntamente com IL-6 e TNF- $\alpha$ , estimula a fase aguda da resposta inflamatória.

A IL-8 é uma citocina chave como fator de quimotaxia para neutrófilos ou como ativador de células em transito de chegada. Sua produção aumenta muito nos processos inflamatórios e tem sido considerada como quimiocina de primeira linha na defesa inespecífica, junto com a MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein). Uma característica das citocinas consiste na sua capacidade de transporte rápido para áreas remotas dentro do organismo e assim atuar em múltiplas células alvo local e à distância (mecanismos autócrinos ou parácrinos) e por sua rápida degradação. Dessa forma, infecções à distância podem potencialmente, via citocinas, produzir resposta imune na mucosa do trato intestinal.

Alguns agentes infecciosos têm tropismo pelas superfícies mucosas, como exemplo, o vírus da imunodeficiência humana, onde as superfícies mucosas representam a maior rota de invasão na transmissão sexual e vertical. Sítios mucosos representam reservatórios importantes do HIV, uma vez que neles estão contidos mais de 50% do pool de células imunes do organismo (McGhee et al., 1992). Em pacientes com AIDS, a severa imunossupressão aliada ao tropismo do vírus pelas mucosas predispõe a infecções oportunistas tanto intestinais quanto respiratórias com grande frequência, particularmente as micobacterianas e as fúngicas.

O *M. tuberculosis*, em quantidade suficiente para determinar o adoecimento induz uma resposta imune global, independente da localização do principal sítio de infecção. Considerações fisiopatológicas sobre a repercussão da tuberculose no trato intestinal poderiam ser feitas, de forma semelhante à multiplicidade de fatores capazes de determinar alterações no trato digestivo de pacientes com AIDS (Ullrich et al., 1989). Esses eventos estariam direta ou indiretamente relacionados à imunodeficiência celular associada a micobactéria.

Entre esses fatores se incluiriam: a infecção intestinal pelo próprio *M. tuberculosis*, a produção local de linfocinas, a desregulação do sistema imune entérico, a proliferação de bactérias e outros parasitas no intestino delgado, as alterações enzimáticas e a deficiência de micro-nutrientes nas células da mucosa intestinal.

Recentemente uma outra hipótese, tem merecido a atenção dos pesquisadores - a concepção de que na resposta imune comum das mucosas, linfócitos T ativados migrariam de um sítio mucoso a outro (Mestecky et al., 1978). Esta hipótese tem sido demonstrada em coelhos, onde se observa uma re-população de células Ig A no intestino e no pulmão, após transferência de linfócitos tanto do BALT (bronchus-associated lymphoid tissue) quanto do GALT (gut-associated lymphoid tissue) nas placas de Peyer (Rudzik et al., 1975) Outro estudo em ratos, demonstraram que após transferência de linfócitos dos linfonodos mesentéricos, células IgA foram observadas em outros sítios mucosos (McDeRott et al., 1979).

Alguns estudos em humanos têm comprovado essa hipótese de que nas doenças mediadas pelo linfócito T, ocorre uma resposta linfocítica no sistema imune das mucosas em vários sítios (intestino, pulmão, glândulas salivares). Tem sido demonstrado aumento de linfócitos T ativados em pulmões de pacientes com doença de Chron, mesmo na ausência de sintomas respiratórios (Wallaert et al., 1985; Bonniere et al., 1986; Adenis et al., 1992).

Estudos clínicos na mesma linha demonstraram reação inflamatória intestinal não granulomatosa com predomínio de linfócitos T, associada ao aumento da permeabilidade intestinal na mucosa intestinal de pacientes com sarcoidose pulmonar sem sintomas intestinais (Wallert et al., 1992). Achados semelhantes também relacionados com aumento da permeabilidade intestinal tem sido observado em pacientes com asma brônquica (Benard et al., 1996).

#### **1.4.2 A desnutrição como facilitadora de alterações na mucosa intestinal**

O estado nutricional em condições de normalidade é mantido pelo intestino delgado, segmento do trato digestivo onde ocorre o estágio final da digestão química dos alimentos e onde a maior parte dos nutrientes é absorvida. Água, vitaminas, sais minerais, aminoácidos não essenciais são ali absorvidos.

Entre os aminoácidos, a glutamina tem papel de importância para a síntese protéica e produção energética para vários tipos celulares. Serve como fonte de nitrogênio necessário para a sintetização de compostos essenciais como outros aminoácidos e certos nucleotídeos. Está relacionada com a síntese de uréia e amônia e tem importância nos processos de reparação tecidual.

Os enterócitos ou células da mucosa intestinal, linfócitos e células dos túbulos renais, são consideradas consumidoras de glutamina, porque promovem o catabolismo da glutamina. As células da mucosa intestinal caracterizam-se por sua grande capacidade de captação e metabolismo da glutamina, o que permite uma intensa atividade proliferativa e de renovação de epitélio, mantendo a sua integridade (Klimberg et al., 1990).

Nos estados catabólicos, como nos quadros infecciosos crônicos, exemplificando a tuberculose, a degradação de proteínas torna-se acelerada. Nessa situação, a glutamina, sintetizada e estocada principalmente na musculatura esquelética, é considerada um aminoácido fundamental, por ser o

principal transportador de nitrogênio, na forma de amônia não tóxica no sangue. A amônia sai dessa maneira dos tecidos periféricos para os órgãos excretores como os rins, ou sofre transformação em uréia no fígado.

Nos estados catabólicos a necessidade da glutamina, que é um amino ácido não essencial, aumenta de duas a quatro vezes para conseguir manter a homeostase igual aquela de condições fisiológicas. A escassez de glutamina, portanto, acaba por promover lesões na mucosa intestinal.

A importância da relação entre a integridade da mucosa intestinal e o comprometimento do estado nutricional está documentado em diversas condições patológicas intestinais como doença celíaca, doenças diarréicas, doença de Crohn e enteropatia tropical.

Graus variáveis de desnutrição podem induzir a perda da integridade da mucosa comprometer a fisiologia intestinal e alterar a sua capacidade absorptiva (Yoneda, 1996; Welsh et al., 1998a; Van der Hulst et al., 1998; Karyadi et al., 2000). Os trabalhos mais recentes de Ferraris & Carey (2000) reforçam as evidências de que o jejum prolongado ou a desnutrição tem um efeito dramático sobre a estrutura da mucosa intestinal e sobre a sua função de transporte e que a atrofia mucosa induzida por uma dessas duas condições diminui a altura das vilosidades intestinais, reduz a profundidade das criptas intervilosas, e altera a permeabilidade intestinal, reduz a absorção intestinal de nutrientes, perpetuando assim o processo (Polosa et al., 1984; Van der Hulst et al., 1998).

A consumpção é observação freqüente em situações como na ingesta alimentar insuficiente ou no curso de doenças primariamente não intestinais como nas neoplasias, na AIDS, na tuberculose, nos estados hipermetabólicos e no grande queimado (Schwenck et al., 1993) Na associação HIV+/tuberculose, é freqüente a observação de desnutrição severa com graves repercussões no trato intestinal (Paton et al., 1999). Nesses casos a absorção de nutrientes ou de drogas, incluindo as antituberculose, pode igualmente sofrer alterações.

### **1.4.3 O alcoolismo e sua ação lesiva direta**

Tem sido demonstrado em vários estudos que a ingestão crônica de álcool aumenta a permeabilidade intestinal. Bjarnason et al. (1984), observando 36 pacientes alcoólatras detectou aumento da permeabilidade tanto nos pacientes que haviam bebido nas últimas 48 horas, quanto naqueles que estavam abstêmicos há cinco ou mesmo treze dias, quando comparados com controles não alcoolistas.

Estudos prévios tem mostrado que altas concentrações de etanol ( $\geq 40\%$ ) causam dano funcional na barreira epitelial gastrointestinal. Existem pelo menos dois mecanismos relacionados com o potencial lesivo do álcool. O primeiro sugere que o etanol produz efeito citotóxico direto na membrana das células epiteliais. Essa hipótese tem sido citada como explicação para a associação entre o consumo de álcool e o surgimento de câncer da boca, orofaringe, laringe e estômago (Rothman, 1995). O segundo mecanismo implica além do etanol, outros compostos, como as nitrosaminas ou seus precursores encontrados em vários tipos de bebidas alcoólicas, como substância de efeito lesivo para a mucosa intestinal (Walker et al., 1979).

Os efeitos de doses menores, não citotóxicas de etanol na barreira epitelial são desconhecidas. Ma et al. (1999) demonstraram que o etanol em dose menores que 10% produziu uma quebra progressiva da proteína ZO-1, com conseqüente separação das junções celulares e formação de “gaps” entre as células epiteliais e como conseqüência foi observado um aumento da permeabilidade intestinal via paracelular.

### **1.4.4 As parasitoses e as lesões da mucosa intestinal**

No Brasil, as parasitoses intestinais são bastante disseminadas e com alta prevalência. Em um estudo multicêntrico realizado em escolares de 7 a 14 anos cobrindo 10 estados brasileiros 55,3% dos estudantes foram diagnosticados com algum tipo de parasitose. No estado de Minas Gerais, dos

5.360 indivíduos examinados 44,2% estavam infectados, sendo os parasitas mais freqüentes: *Ascaris lumbricoides* (59,5%), *Trichuris trichiura* (36,6%), *Giardia lamblia* (23,8%) e *Schistosoma mansoni* (11,6%) (Campos et al., 1988). Em estudo realizado sobre a incidência de entero-parasitoses numa área do município de Fortaleza, verificou-se que 40% da população observada estava infestada por ancilostomídeos (Martins & Sampaio, 1967).

As infecções parasitárias podem causar danos na mucosa intestinal tais como inflamações, ulcerações e alterações morfológicas das vilosidades intestinais, tanto durante o período agudo de infecção quanto no período crônico, quando tem sido descrita além da lesão epitelial, a formação até mesmo de abscessos intestinais.

Alguns parasitas produzem lesões específicas. Trofozoítas de *Giardia intestinalis* costumam ser encontradas na porção proximal do intestino delgado onde atacam suas ventosas na parede intestinal, exercendo assim um potencial efeito lesivo sobre a mucosa, aumentando a sua vulnerabilidade. Biópsias de jejuno revelam redução de altura e atrofia de vilosidades, redução na altura do epitélio colunar das células epiteliais da mucosa e uma hiper celularidade da lâmina própria na infecção por *Giardia intestinalis* (Buret et al., 1990). Em algumas infecções bacterianas, tem sido descrito o papel de endotoxinas, porém na infecção por *Giardia* nenhuma endotoxina tem sido identificada (Smith et al., 1982).

O *Blastocystis hominis* também pode lesar a mucosa intestinal (Markell et al., 1999). Phillips & Zierdt (1976) demonstraram baseado em estudos de microscopia, a frequente penetração do parasita no epitélio intestinal, onde podem ser localizados em número significativo onde acabam por induzir um aumento na celularidade da lâmina própria.

Outros estudos também demonstram que a presença do *B. hominis* gera uma resposta inflamatória no intestino, evidenciada pela presença de leucócitos nas fezes e em observações de retosigmoidoscopia mostrando

eritema difuso na mucosa e reação inflamação em amostras de biópsia sigmóide de pacientes infectados pelo parasita (Carrascosa et al., 1996).

A resposta da mucosa intestinal pode se dar através de várias outras formas. Inúmeros estudos indicam um aumento da permeabilidade intestinal relacionada com doenças como malária, gastroenterites não especificadas, infecção por *Giardia* e *Ascaris lumbricoides* (Bjarnason et al., 1995). Entretanto não está bem esclarecido como esses agentes, particularmente as infecções parasitárias, alteram o funcionamento da barreira mucosa intestinal.

Casellas et al. (1986) demonstram que os testes de determinação da permeabilidade intestinal são capazes de avaliar a barreira mucosa nas doenças intestinais com bastante acurácia. Trabalhos utilizando  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA (diethyl triamine penta ácido acético marcado com Technetium-99m) como marcador para o teste da permeabilidade intestinal, demonstram o aumento da permeabilidade em pacientes infectados por *Giardia* (Dagci et al., 2002).

Aumento da permeabilidade intestinal determinada pelo teste de lactulose manitol, bem como uma correlação direta desse aumento com títulos de anticorpos IgM *Giardia*-específicos foram descritos em crianças de Gâmbia (Lunn et al., 1999). O aumento da permeabilidade intestinal tem sido demonstrado também na infecção intestinal pelo *B. hominis* (Dagci et al., 2002), porém a sua patogenicidade é ainda uma questão controversa.

A *E. coli* é considerada como um parasita comensal e embora possa eventualmente estar associado com algum sintoma abdominal, os estudos não têm demonstrado sua associação com lesão inflamatória ou com alterações de permeabilidade intestinal. Portanto parece inquestionável a relação patogênica de parasitas intestinais (protozoários ou helmintos) com a mucosa e o potencial efeito na permeabilidade intestinal, enquanto que no curso de infecções intestinais por parasitas não patogênicos, tais alterações não parecem ocorrer (Dagci et al., 2002).



## 1.5 Permeabilidade da Mucosa Intestinal

A mucosa intestinal, particularmente a do delgado tem duas funções aparentemente paradoxais, que são essenciais na manutenção da vida: ser um órgão absorptivo, permitindo a passagem de nutrientes e drogas e ao mesmo tempo atuar como uma poderosa barreira seletiva contra a excessiva absorção de bactérias, antígenos alimentares e grandes moléculas, presentes na luz intestinal, que possam de alguma forma ameaçar a sobrevivência.

A teoria inicial para explicar a permeação ou passagem através dessa barreira mucosa foi imaginada ocorrer através de duas vias: a primeira e mais extensa adentrando as células epiteliais (via transcelular), que representa cerca de 95% dessa permeação e a segunda, por entre as células, através de junções intercelulares (via paracelular) que representa cerca de 5% da área absorptiva total do intestino. A permeação dependeria fundamentalmente do tamanho molecular da substância, em relação aos pontos de passagem da membrana e ocorreria por difusão simples ou não facilitada, ou seja, dependente de um gradiente de concentração. Por essa teoria, a via transcelular permitiria a passagem de monossacarídeos e pequenas moléculas, principalmente através de possíveis pequenos poros na membrana celular dos enterócitos. A via paracelular permitiria a passagem de moléculas maiores.

A permeabilidade intestinal é definida como um fluxo de solutos através de uma unidade de área de membrana, em um tempo determinado. O conceito de permeabilidade, portanto refere-se à facilidade com que essa barreira intestinal é transposta. Normalmente é aplicada para a passagem por difusão, de moléculas com massa acima de 150 Daltons (Lima, 1998) e deve ser diferenciada da função de absorção de água e nutrientes do intestino, que implica em consumo de energia e cujo objetivo principal é a nutrição do ser humano.

A permeabilidade intestinal não parece ser influenciada pela idade, raça ou fatores hereditários (Travis e Menzies, 1992; Barboza Jr et al., 1999). A

avaliação da permeabilidade intestinal e da capacidade absorptiva tem sido foco de investigação de muitos pesquisadores.

Inúmeros estudos têm documentado alterações da permeabilidade intestinal em situações clínicas diversas, tais como efeito de dietas, hormônios, uso de drogas (Bjarnason, 1994), alcoolismo (Hirsch et al., 1997), desnutrição (Ferraris & Carey, 2000), pós-trauma (Langkamp-Henken et al., 1995), na cirrose hepática (Ersöz, 1999) e em várias doenças intestinais como doença celíaca (Pearson et al., 1982 ; Johnston et al., 2001a; Johnston et al., 2001b) doenças diarreicas (Barboza Jr et al., 1999), doença de Crohn (Meddings, 1997), doenças intestinais bacterianas, parasitárias ou fúngicas crônicas e ainda em doença não intestinais como na AIDS ( Lima et al., 1997), sarcoidose ( Wallaert et al., 1992), asma (Benard et al., 1992) , doenças alérgicas (Laudat et al., 1994 ) entre outras, contudo, os determinantes da alteração da permeabilidade intestinal em cada uma dessas situações não estão ainda claramente definidos. Da mesma forma, as possíveis repercussões que as alterações de permeabilidade possam ter com a absorção de drogas, ainda estão pouco estudadas.

Estimativas da permeabilidade intestinal podem ser obtidas por medidas da permeação intestinal, representada pela quantidade absorvida de uma determinada substância, embora essa quantidade possa ser afetada por fatores como o gradiente de concentração, a superfície da mucosa envolvida e o tempo de contato da substância com a mucosa (Lifschitz, 1985). Vários são os métodos utilizados para avaliação da permeabilidade intestinal. Entre nós o teste de lactulose–manitol, validado por Gifoni (1996) e Barboza Jr et al. (1999) vem sendo utilizado com muita segurança como critério diagnóstico de alterações da permeabilidade intestinal desde 1996.

Nesta tese interessa particularmente o estudo da permeabilidade intestinal como índice preditor de disfunção intestinal, uma vez que tentaremos correlacionar esses valores com a biodisponibilidade de drogas antituberculose.

## **2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

## 2.1 Justificativa

A tuberculose acomete principalmente as populações de baixa renda, onde o risco de infecção tuberculosa aumenta pelas condições precárias de moradia que favorecem a transmissibilidade do bacilo. Nessa população, a desnutrição e o alcoolismo atuam como fatores importantes na elevação do risco de adoecimento pela doença (Pereira & Ruffino-Neto, 1982).

O perfil do paciente acometido pela tuberculose no Nordeste é naturalmente agravado pela situação de miséria crônica da população, que fica submetida a precária condição alimentar, tanto quantitativa quanto qualitativa. O precário estado nutricional dos nordestinos está refletido na redução evidente dos parâmetros antropológicos, quando comparados aos dos indivíduos residentes em outras regiões do país. O alto percentual de alcoolismo e o elevado nível de infestação parasitária na população nordestina contribuem como agravantes do comprometimento do estado nutricional.

O adoecimento resultante da infecção pelo *M. tuberculosis* em indivíduos com depressão da imunidade celular, embora na maioria dos casos seja detectada em um foco principal, apresenta repercussões no organismo inteiro. A tuberculose caracteriza-se clinicamente por um curso crônico e consumptivo onde a maioria dos pacientes evolui com inapetência, febre e emagrecimento o que por sua vez, leva a graus progressivos de desnutrição.

As repercussões sistêmicas da tuberculose pulmonar, particularmente as relativas a resposta inflamatória e alterações imunológicas do trato intestinal e as possíveis conseqüências na permeabilidade intestinal e na capacidade absorptiva têm sido pouco estudadas, embora possam desempenhar papel de importância na resposta terapêutica e no curso evolutivo da doença.

A tuberculose como doença endêmica no Brasil *per si* e por ser claramente relacionada com a desnutrição, alcoolismo e parasitoses intestinais, condições que reconhecidamente afetam o trato intestinal merece ser estudada sob o foco da presença de inflamação e integridade da função absorptiva da mucosa intestinal dos pacientes acometidos, devido as implicações sérias na absorção de drogas antituberculose e da seleção e disseminação de bacilos multirresistentes.

Inúmeros estudos têm demonstrado que determinados grupos de pacientes apresentam alterações no perfil farmacocinético das drogas antituberculose (Peloquin et al., 1993; Peloquin, 1997). A maior parte deles estão relacionados com TB/HIV<sup>+</sup>. Outros relatam que a mal-absorção de drogas pode ocorrer também em pacientes tuberculosos diabéticos, alcoólatras (Hirsh et al., 1997), desnutridos (Polosa et al., 1984) ou com patologias associadas do trato gastrointestinal (Dieterlen et al., 1986). Os achados de Turner et al. (1994), Peloquin (1993) e Kimerling et al. (1998), entretanto sugerem que mesmo na ausência de sinais sugestivos ou causa aparente, a mal-absorção de drogas antituberculose e a redução da biodisponibilidade de drogas pode ocorrer em pacientes aderentes ao tratamento.

Poucos são os estudos na Literatura avaliando a relação existente entre a alterações na permeabilidade intestinal e a extensão de absorção de drogas determinada por estudos farmacocinéticos (Chiou, 1995). Um dos mais importantes achados é que existe uma boa correlação entre a medida efetiva da permeabilidade intestinal humana por técnicas de perfusão intestinal e a extensão da absorção de drogas medida através de estudos farmacocinéticos em humanos (Lennernas, 1988). Utilizando o teste de absorção da D-xilose como método não invasivo da avaliação da permeabilidade intestinal, Choudhri et al. (1997) demonstraram a relação da redução da absorção intestinal com a redução da biodisponibilidade da rifampicina e isoniazida em pacientes com tuberculose.

Para a avaliação da permeabilidade intestinal, o Estado do Ceará detém uma boa experiência, utilizando o teste de lactulose–manitol, através dos vários estudos que vem realizando e publicando desde 1996 (Gifoni, 1996; Barboza Jr et al., 1999).

Justifica-se então avaliar as repercussões da infecção tuberculosa no trato intestinal, procurando determinar alterações de sua função intestinal, através do teste da lactulose-manitol, procurando associar estes resultados com o grau de lesão inflamatória da mucosa intestinal, com a presença de infecções parasitárias, com o grau de nutrição dos pacientes tuberculosos, a fim de garantir a biodisponibilidade das drogas antituberculose, o tratamento efetivo da doença e minimizar o risco da multidrogaresistência do *M. tuberculosis*.

A hipótese que fundamenta esse trabalho é que pacientes com tuberculose pulmonar ativa podem apresentar alterações na mucosa intestinal potencialmente capazes de modificar a permeabilidade e a capacidade absorptiva intestinal, o que poderia comprometer a absorção de drogas, resultando em redução da biodisponibilidade das drogas antituberculose, particularmente a rifampicina e a isoniazida com possível seleção de *M. tuberculosis* resistentes.

## **2.2 Objetivo Geral**

- Estudar a permeabilidade intestinal através do teste da lactulose /manitol e a área absorptiva intestinal, em pacientes com doença tuberculosa pulmonar ativa.

## METAS ESPECÍFICAS

1. Estimar os valores da permeabilidade intestinal em pacientes com tuberculose pulmonar ativa através do teste da lactulose / manitol, comparando-os com grupo controle de voluntários sadios.
2. Estudar a associação da permeabilidade intestinal de pacientes com tuberculose pulmonar ativa determinada através do teste da lactulose / manitol, com os seguintes parâmetros:
  - Marcadores inflamatórios (lactoferrina, sangue oculto, IL1 e IL-8) no epitélio intestinal, detectados através do exame das fezes.
  - Infecções intestinais parasitárias.
  - Grau de nutrição segundo o índice de massa corpórea (IMC).
3. Estimar através do HPLC os níveis séricos da rifampicina e isoniazida após 2 horas da tomada da droga em jejum.
4. Estudar a correlação da permeabilidade intestinal de pacientes com tuberculose pulmonar ativa, determinada através do teste da lactulose / manitol, com a biodisponibilidade da rifampicina e isoniazida avaliada através da concentração sérica após 2 horas da tomada das referidas drogas.
5. Identificar o perfil de sensibilidade do *M.tuberculosis* às drogas antituberculose em culturas de escarro do grupo em estudo.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**



### **3.1 Delineamento do Estudo**

Realizou-se um estudo clínico de observação em pacientes com diagnóstico de tuberculose pulmonar ativa e indivíduos sadios para avaliação dos valores de permeabilidade intestinal através do teste da lactulose / manitol e estudo descritivo de pacientes com tuberculose pulmonar ativa para avaliação de parâmetros referentes à permeabilidade intestinal, ao estado nutricional, a inflamação do trato intestinal, a absorção de drogas antituberculose e ao perfil de sensibilidade do *M. tuberculosis* cultivado no escarro.

### **3.2 Local de Realização**

O estudo foi realizado no Hospital de Maracanaú, localizado em município vizinho de mesmo nome, distante cerca de 30 Km do centro de Fortaleza.

A escolha foi feita, por ser essa unidade, a referência estadual para a internação de pacientes adultos com tuberculose no Estado do Ceará. Outras características influíram também na escolha, entre elas, a disponibilidade de leitos para internação (34 para tisiologia), por contar com ambulatório de tuberculose e laboratório próprio com capacidade para coleta, processamento de exames, guarda de material biológico e representar área de abrangência assistencial para todo o Ceará.

O Hospital de Maracanaú foi inaugurado em 1950 com 417 leitos exclusivos para tuberculose. Sofreu ao longo do tempo várias mudanças e hoje é um hospital geral municipal, mas nunca deixou de ser reconhecido pela qualidade do atendimento prestado na área da tisiologia.

### 3.3 População de Estudo

Um grupo de 41 pacientes com diagnóstico de tuberculose pulmonar ativa, com idade igual ou superior a 15 anos internados, ou inscritos no ambulatório de fisiologia do Hospital de Maracanaú, em uso de drogas antituberculose foi constituído para o estudo.

Deste grupo inicial, foram selecionados 18 pacientes, em uso de esquema I ou esquema I-R, para a realização de estudo da biodisponibilidade da rifampicina e isoniazida.

Para a avaliação da permeabilidade intestinal, 28 indivíduos sadios pareados quanto ao sexo e faixa etária foram recrutados para a constituição do grupo controle.

### 3.4 Seleção de Pacientes

#### 3.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes com tuberculose pulmonar ativa, diagnosticados através do resultado positivo da baciloscopia direta para BAAR, em pelo menos uma amostra e que estavam em uso da medicação específica (esquema I, I-R ou esquema III) há no máximo dois meses.

Os esquemas terapêuticos utilizados foram os mesmos determinados pelo Manual de Normas para o Controle da Tuberculose adotado pelo Ministério da Saúde do Brasil em 1995.

- *“Esquema I - indicado em pacientes sem tratamento anterior, ou seja, pacientes que nunca se submeteram à quimioterapia ou o fizeram por menos de 30 dias*
- *Esquema I-R - indicado a pacientes com tratamento anterior, recidivante do esquema I ou que retornam após abandono ao esquema I*

- *Esquema III - indicado nos casos de falência (persistência de positividade do escarro ao final do tratamento) dos esquemas I e I-R “*

Para a seleção do subgrupo que realizou estudo de biodisponibilidade, o critério de seleção utilizado foi o de ter peso igual ou acima de 40 kg e estar em uso do esquema I ou esquema I-R, indicado para pacientes infectados com *M. tuberculosis* possivelmente sensível às drogas.

### **3.4.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídos da participação no estudo, pacientes com diagnóstico de tuberculose pulmonar sem confirmação bacteriológica; pacientes com doença tuberculosa ativa, mas comprovadamente acometidos de doença gastrintestinal, neoplasia maligna, doença sistêmica grave, insuficiência hepática, cardíaca ou renal graves, gravidez ou qualquer condição clínica concomitante, que o impedisse de participar do estudo.

A ingestão de bebidas alcoólicas nas 48 horas que antecederam o período de estudo foi considerada critério de exclusão, bem como qualquer impedimento à participação livre e voluntária do paciente.

### **3.4.3 Critérios de retirada**

As seguintes condições foram consideradas como critérios de retirada do estudo: decisão pessoal do paciente em qualquer etapa do protocolo clínico e não fornecimento da maior parte do material (urina, sangue, fezes, escarro) para os exames previstos.

### 3.5 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa, com o protocolo experimental e o termo de consentimento, foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC, credenciado pelo CONEP - Conselho Nacional de Saúde/MS e aprovado em reunião no dia 27 de setembro de 2001(ANEXO C).

O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (1965) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983), Hong Kong (1989), Somerset Oeste-África do Sul (1996) e Edimburgo (2000) e a Resolução 196/96 e 251/97 do CNS-MS. Todos os pacientes inscritos concordaram livremente em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento (ANEXO B), antes de qualquer procedimento, após todos os elementos essenciais do protocolo terem sido esclarecidos. Para todos os pacientes admitidos no estudo, anexou-se à ficha de coleta de dados, a folha de consentimento devidamente assinada pelo paciente. Assegurou-se aos pacientes o direito inquestionável de a qualquer momento retirarem-se do protocolo, sem prejuízo da continuidade de seu tratamento. Ficou ainda estabelecido o direito de livre acesso às informações e esclarecimentos sobre etapas, métodos ou resultados de exames aos pacientes participantes do estudo.

## 3.6 Protocolo Clínico de Estudo

### 3.6.1 Questionário clínico-epidemiológico

Para cada paciente admitido no estudo foi preenchido um questionário clínico–epidemiológico individualizado denominado ficha de protocolo clínico (ANEXO A) contendo dados pessoais, informações epidemiológicas, resultados clínico-laboratoriais importantes referentes ao diagnóstico e tratamento da doença e ainda um espaço destinado aos resultados específicos do projeto em estudo.

As definições dos ítems contidos no questionário utilizado foram as seguintes:

- Grupo: os pacientes foram divididos em grupos conforme os procedimentos realizados e então classificados como PI= permeabilidade intestinal ou PIBI = permeabilidade intestinal e estudo de biodisponibilidade.
- Local de atendimento: indicados como enfermaria ou ambulatório de acordo com o local de atendimento.
- Motivo de admissão hospitalar: foram relacionados conforme as indicações de internação proposta no Manual de Normas e Controle da Tuberculose, 1995: 1- motivo social; 2- estado geral comprometido, que não permita tratamento ambulatorial; 3-intercorrência clínica; 4-intolerância medicamentosa e 5- para os pacientes ambulatoriais.
- Doenças associadas: foi descrita se presente patologia concomitante ou anterior, julgada de importância clínica, relatada pelo paciente ou constatada no prontuário médico.
- Tratamento: foi registrado o número de tratamentos feitos pelo paciente incluindo o atual, independente do desfecho de cada um deles: 1=1º tratamento; 2= 2º tratamento; 3 = 3º tratamento ou mais e 4= não sabe informar.
- Esquema: registrado segundo o esquema terapêutico em uso: 1= esquema I ; 2= esquema I-R; 3 = esquema III e 4= esquema alternativo.

- Baciloscopia: conforme a positividade BAAR no exame direto de escarro corado pelo Ziehl Neelsen: positivo; negativo; não realizado (NR) ou contaminado.
- Cultura para BK no escarro: conforme o crescimento do bacilo no meio de cultura Lowenstein Jensen: positivo; negativo; não realizado (NR); crescimento de outros tipos de micobactérias (≠ BK)
- Teste de sensibilidade às drogas = conforme resultado de sensibilidade ou resistência às drogas isoladas. Classificado como sensível, resistente ou não realizado.
- Renda familiar foi expressa em número de salários mínimos: 0= sem renda 1= renda < 1 SM; 2 = 1SM <renda< 2 SM; 3 = renda >2 SM; 4 = sem informação.
- Instrução = conforme o grau de escolaridade: 0 = analfabeto; 1= 1º grau mesmo incompleto; 2 = 2º grau mesmo incompleto; 3 = 3º grau mesmo incompleto 4= sem informação.
- Uso de álcool: segundo os critérios utilizados por O'Connor & Schottenfeld (1998) os pacientes foram classificados como: 0 = nunca usou; 1= deixou há mais de 1 ano ; 2 = alcoolismo leve ;3 = alcoolismo moderado e 4 = alcoolismo pesado
- Uso de fumo: o registro foi realizado segundo os critérios utilizados por Fahn et al., (1998), sendo os pacientes classificados em: 0 = nunca usou; 1= deixou há mais de 1 ano; 2 = tabagismo leve; 3= tabagismo moderado ; 4= tabagismo pesado
- Uso de outras drogas: o registro foi feito da seguinte forma: 0 = nunca usou: 1 = s/informação. No caso de utilização de drogas, a mesma foi discriminada.

### **3.6.2 Avaliação nutricional**

A avaliação nutricional dos pacientes foi realizada utilizando-se parâmetros antropométricos tomando-se como referencial o Índice de Massa Corpórea (IMC), parâmetro internacionalmente aceito, embora tenhamos consciência de que não existe um parâmetro único de avaliação do estado nutricional, capaz de diagnosticar de forma isolada e específica as alterações do

estado nutricional, e que por esse motivo, muitos autores realizam um conjunto de testes para a sua aferição (Detsky e McLaughlin, 1987; Detsky et al., 1994; Morgan et al., 1998).

Os valores de peso e altura foram determinados através de observador treinado, em balança antropométrica Filizola aferida e calibrada (Blackburn et al., 1977; Souza e Silva & Félix, 1998). Os pacientes descalços usando roupas leves foram pesados pela manhã e a seguir posicionados de costas para a haste graduada. Os pacientes foram encostados na mesma, eretos, com os calcanhares juntos, olhando para a linha do horizonte para a aferição da estatura. O registro do peso foi feito em quilos (kg) e da altura em metros (m). O Índice de Massa Corpórea (IMC) foi calculado através da seguinte fórmula:  $IMC (Kg/m^2) = \text{Peso} / \text{Altura}^2$ .

Os valores de referência para a classificação do estado nutricional baseado no IMC foram definidos por Blackburn et al. (1977) e utilizados pela WHO (1995), por Madebo (1997), sendo considerado nutrido: IMC entre 18,5 a 24,9 Kg/m<sup>2</sup>; desnutrido, IMC < 18.5 Kg/m<sup>2</sup>; desnutrido severo, IMC < 16 Kg/m<sup>2</sup>.

### **3.6.3 Coleta de materiais**

Em todos os pacientes do estudo foi feita coleta de sangue (8 ml) pela manhã em jejum, através de "butterfly" heparinizado introduzido em veia superficial do antebraço para determinação do perfil laboratorial. O sangue foi centrifugado, o plasma retirado, sendo os frascos identificados pelas iniciais do paciente e data da coleta. Os exames de sangue: hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas, uréia, creatinina, bilirrubina total e frações, proteína total, albumina, globulinas, glicose em jejum, fosfatase alcalina, SGOT e SGTP foram processados no laboratório do Hospital de Maracanaú. Parte do sangue coletado foi encaminhado ao Laboratório Central do Estado do Ceará - LACEN, para a realização das sorologias anti-HIV (método Elisa Pasteur – Elisa Murex).

Parte do plasma retirado foi armazenado em frasco adequado na temperatura de (-20 °C) até posterior utilização no processamento da dosagem de citocinas.

#### **3.6.4 Cultivo das cepas de *M. tuberculosis* e estudo do perfil de resistência bacilar às drogas antituberculose**

Amostras de escarro dos pacientes em jejum foram coletados em potes plásticos descartáveis apropriados, identificados e imediatamente levados ao LACEN onde gentilmente foram processados pela Dra Creusa Lima Campelo, farmacêutica bioquímica responsável pelo Laboratório de Tisiologia. Esfregaços foram preparados utilizando-se a coloração de Ziehl-Neelsen para identificação direta de bacilos álcool –ácidos resistentes. O resultado da leitura foi expresso como: negativo quando não foi observado nenhum bacilo em cem campos e positivo quando da identificação de menos que um bacilo ou mais por campo, em no mínimo cem campos microscópicos observados.

A determinação da sensibilidade do *M. tuberculosis* às drogas antituberculose utilizadas, foi feita através de teste indireto do Método das Proporções em Meio Sólido, em amostra de escarro cultivado. A preparação do inóculo foi efetuada a partir de cultivo em meio de Lowenstein-Jensen, a partir do qual, efetuou-se uma padronização do inóculo por turvação e em seguida foram realizadas diluições seriadas, as quais foram semeadas em meio de cultura contendo as concentrações críticas para as drogas antituberculose, e em tubo controle com meio de cultivo sem droga. Somente após 28 dias de incubação a 37°C, pode ser efetuada a contagem das unidades formadoras de colônias, sendo a proporção de bacilos resistentes a relação entre o número de colônias contidas no tubo com droga e o controle correspondente para cada diluição.

A resistência às drogas foi determinada, tendo-se como base critérios definidos internacionalmente: crescimento igual ou superior a 1% de colônias sob concentrações críticas das drogas (0,2 µg/mL para isoniazida; 2 µg/mL para etambutol e 40 µg/mL para rifampicina) e crescimento igual ou superior a 10%



de colônias sob concentrações críticas das drogas (20 µg/mL para etionamida; 100 µg/mL para pirazinamida e 4 µg/mL para estreptomicina) O resultado foi expresso como sensível ou resistente a cada uma das drogas testadas.

### **3.6.5 Caracterização das cepas pela análise do polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) baseado na sequência de inserção IS 6110:**

A técnica de tipagem molecular utilizando a análise do polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição - Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) é correntemente empregada para identificação das diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Van Embden et al., 1993). Neste estudo utilizou-se como sequência alvo para diferenciação das cepas em cultura, o elemento repetitivo IS6110 que se encontra presente exclusivamente no complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Os testes foram gentilmente realizados e analisados pela Dra Fátima Cristina Onofre Fandinho Montes no Instituto Oswaldo Cruz da Fiocruz – RJ.

A partir da cultura em meio Lowenstein-Jensen aproximadamente uma alça repleta de crescimento bacteriano foi transferido para um tubo de Eppendorf contendo 500µL de tampão TE 1X (Tris –HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, pH 8.0). As amostras foram aquecidas em banho-maria a 80°C por 20 minutos para inativação das micobactérias. A lise bacteriana ocorreu pela adição de 50µL de liozima (Sigma Chemical CO, USA) e a mistura foi agitada em homogeneizador automático e em seguida incubada a 37°C por 18 horas. Após este período, foram acrescentados 60µL de proteinase K (Sigma Chemical Co, USA) a 10 mg/mL e 70µL de SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) a 10% (v/v) (Sigma, USA), sendo a mistura então incubada em banho-maria a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 100µL de solução de NaCl 5M e 80µL de CTAB (Hexadecyl Trimethyl-ammonium Bromide, Sigma, USA) a 10% (p/v), seguido de incubação por 10 minutos em banho-maria a 65°C.

Em seguida, volumes iguais de clorofórmio (350 $\mu$ L) (Merck) e álcool isoamílico (350  $\mu$ L) (Merck) foram adicionados e os tubos agitados em homogeneizador automático e centrifugados por 5 minutos a 12.000g. A fase superior aquosa foi transferida para novos tubos e adicionados de 450 $\mu$ L de isopropanol gelado (Merck). Os tubos foram mantidos durante a noite a -20°C.

Após este período, os tubos foram centrifugados a 12.000g por 20 minutos e o sedimento lavado com 250 $\mu$ L de etanol gelado (Merck) a 70%. Após evaporação do etanol, foi adicionado ao sedimento 50 $\mu$ L de tampão TE 1X e estocado em freezer a -20°C até o momento do uso.

A digestão das amostras de DNA isoladas foi efetuada pela endonuclease *PvuII*. Esta enzima cliva o DNA no sítio GAG/CTG e cada seqüência IS6110 apresenta apenas um sítio de restrição para esta enzima. A mistura de reação foi preparada adicionando-se: uma alíquota correspondendo a 5 $\mu$ g de DNA, extraído pelo método acima descrito; 1 $\mu$ L da enzima *PvuII* (10U/ $\mu$ L) (GIBCO/BRL, USA); 3 $\mu$ L de tampão React 6 (10X concentrado) (GIBCO/BRL,USA) e volume de água necessário para completar um volume final de 30 $\mu$ L de água destilada estéril. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 37°C por um período de 18 horas.

Para separação dos fragmentos obtidos pela restrição com *PvuII* das amostras de DNA foi efetuada a eletroforese em gel de agarose 0.8% em tampão TBE 1X por 18 horas a 25V. Ao final da eletroforese, os fragmentos de DNA separados na matriz de agarose foram depurinados através de tratamento com 0,25M HCl por 10 minutos, sendo em seguida desnaturados com 0,4M NaOH por 20 minutos. Os fragmentos de DNA foram transferidos para membrana de nylon (Hybond – N+, Amershan Pharmacia Biotech) a vácuo (Vaccum Blotter apparatus – Amershan – Pharmacia Biotech), utilizando-se como solução de transferência o próprio NaOH 0,4 M. A enzima *PvuII* utilizada para a digestão do DNA neste estudo, cliva em apenas um sítio dos 1345 pb do IS6110. Foi preparada uma sonda através do método de amplificação por PCR de um fragmento de DNA situado no elemento IS6110 à direita do sítio de restrição da enzima *PvuII* no mapa físico deste elemento de inserção. Para este fim, foi utilizado o DNA da cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* (Mt

14323) e os oligonucleotídios iniciadores utilizados foram: INS1 :5' CGT-GAG-GGC-ATC-GAG-GTG-GC e INS2 :5' GCG-TAG-GCG-TCG-GTG-ACA-AA

A amplificação foi efetuada em termociclador automático (PTC-100 – Gibco) utilizando um programa que consistia de: desnaturação inicial do DNA a 95°C por 10 minutos, e 30 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 56°C por 2 minutos e extensão a 72°C por um minuto.

Após a amplificação, o produto do PCR foi submetido a uma precipitação com 0.1 volume de Acetato de Sódio 3M, seguida da adição de 2 volumes de etanol 100% gelado. A mistura foi homogeneizada e em seguida incubada a -20°C durante a noite. Posteriormente, foi efetuada centrifugação a 12.000g por 20 minutos a 4°C, e o sedimento lavado com etanol a 75% (v/v) gelado. Após evaporação de etanol residual, o sedimento foi ressuspenso em 500µL de tampão TE 1X, sendo aliqotado e armazenado a -20°C antes da marcação.

O fragmento de DNA amplificado que contém a IS6110 foi diluído com água Kit ECL (Amershan – Pharmacia) a uma concentração de 10 ng/ml. Em seguida, foi desnaturada em banho-maria a 100°C por 10 minutos, e após este período foi imediatamente resfriada em gelo por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados os reagentes do Kit ECL DNA labeling reagent e glutaraldeído. A solução foi centrifugada a 12.000 g e incubada por 10 minutos a 37 °C, sendo a seguir utilizada na hibridização da membrana.

A membrana de nylon contendo os fragmentos de DNA fixados foi lavada com solução de pré-lavagem SSC 2X (20X SSC = NaCl 3 M, Na-citrato 0,3 M, pH 7.0) a temperatura ambiente até o momento da hibridização. A membrana foi então colocada em garrafa de hibridização, na qual foi adicionado o tampão de hibridização do Kit ECL e então incubada em forno com rotor giratório (Robbins) a 42 °C por 1 hora para execução da etapa de pré-hibridização. Após este período, a sonda marcada foi adicionada e a hibridização ocorreu durante 18 horas. No dia seguinte, mantendo a temperatura de 42°C, a membrana foi submetida a duas lavagens com 20 mL de tampão de lavagem (uréia 0,36 mg, SDS 0,004 mg, SSC 20X) por 20 minutos. Em seguida a membrana foi retirada do forno e submetida a duas lavagens com tampão SSC 2X por 5 minutos à temperatura ambiente.

A membrana foi levada para uma câmara escura para ser realizada a auto-radiografia. Em um tubo, foram misturados volumes iguais do reagente de detecção 1 (peroxidase) e reagente de detecção 2 (luminol). A membrana foi tratada com esta mistura por 1 minuto à temperatura ambiente e em seguida foi colocada em contato com o Hiperfilme ECL (Amershan Pharmacia) por um período de 2 horas. Através de análise visual, as cepas que apresentaram perfis idênticos foram classificadas em “clusters”.

### **3.6.6 Avaliação do processo inflamatório intestinal**

Para a investigação do processo inflamatório intestinal foram colhidas amostras de fezes dos pacientes, em frascos adequados, concomitantemente à coleta de sangue e urina. Este material foi encaminhado ao laboratório do IBIMED no prazo máximo de três horas, misturado ao inibidor de proteases e mantido sob refrigeração até sua análise.

3.6.6.1 Determinação da dosagem de gordura fecal através do método de coloração semiquantitativo por Sudan III de acordo com a descrição de Ghosh, para avaliação de mal-absorção intestinal de gordura (Simko, 1990) .

As fezes foram misturadas numa lâmina com 2 gotas de água, 2 gotas de álcool etílico a 95% e 1 gota de solução saturada de Sudan III em álcool etílico a 95 %. A seguir as lâminas foram lidas ao microscópico com ampliação de 400x . O registro dos resultados foi feito numa escala variável de negativo ou positivo de 1 a 3 +, baseado no número e tamanho de glóbulos laranja pálidos refráteis observados sendo: negativo ou ausência de gordura; 1+ para < 100 glóbulos; 2+ para >100 glóbulos laranja pálidos refráteis, menores ou iguais ao tamanho de um eritrócito e 3+ para > de 100 glóbulos maiores que o tamanho de um eritrócito.

3.6.6.2 Identificação da presença de Lactoferrina em amostras de fezes, através do LeukoTest® - desenvolvido e manufaturado pelo TechLab®, Corporate Research Park, Blacksburg,VA, USA ( Guerrant et al., 1992).

O Leukotest® é uma reação de aglutinação pelo látex, para a detecção de lactoferrina, enzima contida dentro de leucócitos inclusive os fecais. O teste tem sido usado como “screening” para a detecção da presença de níveis elevados de lactoferrina em amostras de fezes. Um teste positivo indica indiretamente um aumento do número de leucócitos fecais que podem estar intactos ou não.

As fezes foram misturadas a uma gota de látex recoberta com anticorpos anti-lactoferrina ou com Ig G. Se a lactoferrina estiver presente em quantidade elevada, os anticorpos contra lactoferrina irão reagir, ocorrendo reação de aglutinação do látex. Usa-se como controle negativo e positivo do teste respectivamente: uma gota de látex ligada com Ig G não sensibilizada, misturada à amostra diluída, a fim de identificar qualquer reação inespecífica e uma gota de látex sensibilizado, misturada ao reagente como controle positivo. A interpretação do teste foi feita observando-se a presença dos seguintes padrões de reação: resultado negativo, quando não foi observada aglutinação, indicativo da ausência de lactoferrina ou resultado positivo para qualquer padrão de aglutinação variando de 1+a 4+ sem levar em conta a designação numérica do tipo: 1+ = aglutinação fina, definida, com discreto halo leitoso; 2+= aglutinação definida, iniciando a formação de um anel branco no perímetro do líquido; 3+= aglutinação mais evidente, com anel claro mais pronunciado; e 4+= aglutinação intensa, com anel bem evidente.

### 3.6.6.3 Detecção de sangue oculto em amostras de fezes através do Hemocult®

O teste baseia-se na reação do guáiac. A atividade de peroxidase do sangue decompõe o peróxido de hidrogênio e o oxigênio liberado oxida o complexo do guáiac, formando um composto de cor azul.

Para as amostras de cada paciente, com o auxílio de um bastão de madeira foi colocada uma pequena quantidade de fezes sobre os lados A e B do cartão teste contendo resina natural de guáiac fazendo um fino esfregão. A seguir foram adicionadas duas gotas do reagente (solução aquosa de uma mistura de menos de 5% de peróxido de hidrogênio e 75% de álcool etílico) diretamente sobre os esfregaços. O resultado foi lido dentro de 60 segundos. No verso do cartão, existiam áreas contendo controles positivo e negativo, que foram usadas para fazer o controle de qualidade do teste. Considerou-se o teste negativo, quando não foi observada qualquer mudança de cor no cartão teste. Qualquer traço de azul foi considerado como reação positiva.

### 3.6.6.4 Parasitológico de fezes direto e concentrado

A metodologia utilizada foi uma modificação do Método de Ritchie, ou seja, a concentração de parasitas pelo formol-éter: o éter age como solução excretora para gordura e detritos fecais e o formol a 10% age como antisséptico.

Para a identificação de cistos, larvas e ovos de parasitas foram utilizadas amostras de fezes frescas. Após rotular um tubo base reta, identificando-o com o nome e número do paciente, foram adicionados 9 ml de foRol a 10% e acrescentado 3 colheres de fezes, misturando-se bem. A seguir foram adicionadas 3 gotas de Triton X-100 a 20% para cada tubo e o conteúdo de cada tubo foi completado até a última marca com acetato de etila. O tubo de base reta foi acoplado, através da tampa adaptável com filtro a um ao tubo

côncavo, seguiu-se agitação vigorosa durante 30 segundos. Deixou-se passar através do filtro, todo o conteúdo do tubo de base reta para o tubo côncavo. O material foi então centrifugado durante 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado. Com o auxílio de um “swab”, os detritos superficiais da parede do tubo foram removidos. O sedimento foi colocado novamente em suspensão, utilizando-se algumas gotas de formol a 10%. Através de uma pipeta Pasteur, foi colocada uma gota da amostra sobre uma lâmina e adicionada uma gota da solução de Lugol. A preparação foi coberta com uma lamínula e examinada ao microscópio. O método permitiu concentrar cistos de protozoários, larvas e ovos de helmintos, exceto os ovos pesados para facilitar a identificação. O resultado foi expresso como: negativo, significando ausência de parasitas ou como positivo, sendo nesse caso discriminado o tipo de parasita encontrado.

#### 3.6.6.5 Identificação do *Cryptosporidium* ssp. pela técnica de coloração álcool-ácido ( Ziehl-Neelsen modificado)

Finos esfregaços de material fecal foram preparados em lâmina e fixados com metanol durante 5 minutos. A seguir foram corados com o corante primário carbol-fucsina por 1 minuto e logo lavados em água corrente. Foram sendo depois descorados com uma mistura de álcool – ácido e contra-corados com azul de metileno. Como os oocistos de *Cryptosporidium* são álcool-ácido resistentes, se estiverem presentes, eles reterão a cor do corante primário, desta maneira, se diferenciam do restante do material fecal, que estará com a coloração de fundo do contra-corante.

Os oocistos de *Cryptosporidium* são corpos ovais ou arredondados de cor vermelho-rosa brilhante, medindo 4-6 microns de diâmetro, com uma estrutura interna nítida que os distinguem de outras formas álcool-ácidas encontradas nas fezes. Algumas vezes os oocistos podem aparecer vazios com uma coloração rosa pálido, sendo chamados de “fantasmas”. O resultado da leitura das lâminas foi expresso como negativo ou positivo, conforme a identificação dos cistos.

### 3.6.6.6 Detecção de interleucinas IL-1 e IL-8 em amostras de sangue e fezes através da utilização do Kit de imunoensaio humano IL -1 $\beta$ e IL-8 .

Os kits foram obtidos da Biosource International, Inc. Camarillo, CA-USA e tem sido usados para a determinação quantitativa da hIL-1 $\beta$  e hIL-8 in vitro, no soro humano e outros espécimes biológicos. O imunoensaio (ELISA) reconhece a hIL-1 $\beta$  e hIL-8 natural e recombinante e se constitui num método imunométrico enzimático de fase sólida tipo “sandwich”.

Em uma placa apropriada, anticorpos específicos para as interleucinas foram colocados em cada compartimento individual (poços) reservando-se a primeira coluna como controle. A seguir dosagens standards conhecidas de hIL-1 $\beta$  e soluções-teste de amostras preparadas de fezes foram pipetadas e distribuídas seqüencialmente em cada poço. Logo depois 100 $\mu$ L de uma solução contendo anticorpos anti hIL-1 $\beta$  (Biotin conjugate) foram acrescentados em cada poço exceto nos da primeira coluna (vazios) A placa foi agitada gentilmente e incubada por 2 horas na temperatura ambiente. Após esse tempo a solução aspirada de cada poço foi lavada por quatro vezes. Foi adicionado 100 $\mu$ L de Streptavidin-peroxidase (Solução de trabalho) em cada poço, excetuando-se novamente a primeira coluna que serve de controle. A placa foi agitada gentilmente e novamente incubada durante 30 minutos na temperatura ambiente. O conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado por quatro vezes. Foi adicionado desta vez 100 $\mu$ L de um substrato pronto para uso (Solução Cromogênea Estabilizada), que imediatamente tornou azul a cor da solução contida em cada poço. A placa foi mais uma vez incubada durante 25 minutos à temperatura ambiente, desta vez em ambiente escuro. Finalmente foi adicionado 100 $\mu$ L de Stop Solution à cada poço. A placa foi gentilmente agitada e a solução tornou a modificar sua cor, passando do azul ao amarelo. Após 2 horas do final de todos esses procedimentos a placa foi levada para o leitor de absorvância a uma densidade ótica de 450nm. O resultado da leitura das concentrações de hIL-1 $\beta$  nas amostras testes desconhecidas e nos controles foram plotadas em



uma curva standard para apreciação dos resultados. Considerou-se como resultado negativo a não detecção da citocina e positivo qualquer quantidade detectada na amostra examinada.

O mesmo procedimento foi utilizado para quantificar hIL-1 $\beta$  em amostras do soro, bem como para quantificar hIL-8 em amostras de soro e fezes dos pacientes em estudo. Os testes foram realizados pela Dra Maria do Carmo Pinho no Laboratório da Unidade de Pesquisas Clínicas – IBIMED, UFC – Fortaleza-CE,

### **3.6.7 Protocolo de avaliação da permeabilidade intestinal (teste da lactulose /manitol)**

Logo após a coleta de sangue, os pacientes sob jejum matinal, esvaziaram a bexiga e receberam por via oral, em dose única, 20 mL de uma solução-teste preparada contendo as formulações galênicas de lactulose (250 mg/mL) e manitol (50 mg/mL). As soluções-teste foram preparadas na dose de 5,0/1,0 grama diluídas em 12,5 mL de água potável esterilizada, perfazendo um volume total de 20 mL, acondicionadas em frasco de vidro de cor âmbar tipo 1 x 40 mL e mantidas sob refrigeração (entre 2 e 8 ° C) até o seu uso.

A solução foi preparada no Instituto de Biomedicina (IBIMED), no setor de Biotecnologia em Fortaleza-CE, dentro dos padrões das GCP (Good Clinical Practice). A lactulose (Lactulona®) foi adquirida da Luitpold Produtos Farmacêuticos Ltda, Barueri, SP e o manitol, da Henri Farma Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP. A tomada do líquido foi feita sob observação direta. Os pacientes foram liberados para o desjejum, após 1 h da ingestão da solução-teste.

O tempo de coleta de urina foi registrado usando um relógio de 24 horas. Durante cinco horas toda a urina produzida foi coletada em recipiente estéril, apropriado para este tipo de coleta. O volume total da diurese foi registrado, e a urina foi preparada com Cloroexidina a 20% (antisséptico

preservativo), na proporção de 1gota para cada 50 mL de urina. Após agitação vigorosa da mistura, foram retiradas duas alíquotas de 20 mL de cada amostra, que foram prontamente colocadas em caixa resfriada e enviadas ao Laboratório do Instituto de Biomedicina (IBIMED) da Unidade de Pesquisas Clínicas – Depto. de Fisiologia e Farmacologia – Faculdade de Medicina- Universidade Federal do Ceará (UFC) onde foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e posteriormente analisadas.

Vinte e oito voluntários sadios utilizados com controles foram submetidos ao mesmo protocolo clínico para a realização do teste de avaliação da permeabilidade intestinal.

- **Análise cromatográfica : HPLC-PAD**

Para a detecção e quantificação dos açúcares na urina foi utilizada a técnica da cromatografia líquida de alta pressão com troca aniônica acoplada com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD). Melibiose adquirida no Laboratório Sigma (Sigma Chemical Co, St Louis, MO,USA) foi utilizada como padrão de análise. Hidróxido de sódio a 50% (v/v) foi utilizado como eluente para o HPLC-PAD.

As amostras de urina foram diluídas (50  $\mu\text{l}$  para 2.950  $\mu\text{l}$  de água) e filtrada por centrifugação através de uma membrana de acetato de celulose com espessura de 0,22  $\mu\text{m}$  (Spin -X centrifuge filter Unit , Costar, Cambridge, MA,USA) e 50  $\mu\text{l}$  foram injetados automaticamente por um processador de amostras Waters (WISP, modelo 710B Waters Chromatography Division, Millipore, MA, USA) dentro de um sistema Carbopac MA-1 de coluna de trocas aniônicas com coluna guarda associada (250 mm X 40 mm) fornecido pela Dionex Corporation, Sunnyvale, CA,USA, conectado a um sistema analisador de carboidratos BIOL C HPLC adquirido pela mesma companhia. A eluição foi feita isocraticamente com 480nM NaOH a um fluxo de 0,4 mL/min a temperatura ambiente. Para a detecção dos açúcares foi utilizado um amperométrico pulsado (PAD-II). A análise dos produtos foi realizada pelo Dionex BioAutolon 450 Data System adquiridos Junto a Dionex Corporation, Sunnyvale, CA,USA.

O resultado dos testes obtidos das amostras de urina procedentes dos pacientes foi comparado àquelas procedentes dos controlos. Os testes foram gentilmente realizados pelo Dr. Manuel Sales no IBIMED-CE

### **3.6.8 Avaliação da biodisponibilidade da rifampicina e da isoniazida**

Dezoito pacientes selecionados do grupo de estudo inicial por estarem em uso de esquema I ou IR - dose total tomaram por via oral, sob observação direta do investigador, duas cápsulas de rifampicina 300 mg + isoniazida 200 mg (na dose total de rifampicina 600 mg e isoniazida 400 mg). Amostras de 8 mL de sangue foram coletadas em tubo heparinizado após 2 horas da tomada da medicação para a determinação da concentração máxima ( $C_{\text{Max}} T_{2\text{hs}}$ ) das drogas antituberculose. O sangue foi centrifugado, o plasma retirado, sendo os frascos identificados pelas iniciais do paciente e data da coleta, congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  e posteriormente enviados para análise. As amostras tinha um volume médio de 500 mL. O volume foi completado com soro e análise foi feita com a correção devida.

As drogas foram dosadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Os ensaios cromatográficos foram realizados usando um modelo validado utilizando-se um sistema analisador composto por bomba Waters 510 (Milford, MA) e controlador com válvula solvente seletiva modelo 680, um autosampler de volume fixo Spectra Physics (San Jose, CA) modelo 8875, um detector Ultra Violeta modelo Waters 486, sendo os resultados analisados por HPLC Data Management System (Rainin Dynamax; Woburn, MA). A dosagem das drogas foi gentilmente executada pelo Dr Charles Peloquin, Pharm.D. no Infectious Disease Pharmacokinetics Laboratory do National Jewish Medical and Research Center 1400 Jackson St. Denver, CO USA. Foram considerados como níveis terapêuticos adequados a dosagem de rifampicina entre 8 e 24 mcg/mL e para a isoniazida entre 3 e 6 mcg/mL, baseados nos estudos

farmacocinéticos dessas duas drogas amplamente utilizados, correspondente a C<sub>max</sub> obtida em 2 horas (Peloquin, 1997) .

As drogas antituberculose utilizadas no estudo foram: isoniazida 200 mg + rifampicina 300 mg cápsulas do lote nº 0103022, fabricadas pelo Núcleo de Pesquisa em Alimentos e Medicamentos (NUPLAN) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Natal – RN – Brasil, com data de fabricação: março/2001 e data de validade: março/2003.

### 3.7 Esquema Geral do Projeto

**Período inicial:** Seleção de candidatos ao estudo; Avaliação preliminar; Entrevista com pacientes ; Assinatura do termo de consentimento

<b>Coleta de dados: DIA 1</b>	Avaliação Médica, Exame Físico e Preenchimento de questionário Fornecimento de pote para coleta de fezes e escarro*	
<b>Coleta de amostras DIA 2</b>	<b>Tempo</b>	<b>Atividade</b>
		Coleta de sangue, escarro e fezes*
	0 ( hs )	Ingestão da solução lactulose - manitol
	02 hs	Coleta de sangue
	0 – 05hs	Coleta de urina
<b>DIAS 1 a 7</b>	Coleta de escarro e fezes*	

\* As fezes e o escarro foram colhidas em qualquer dos dias indicados

### 3.8 Análise estatística

O projeto contou com a assessoria do Laboratório de Estatística e Matemática Aplicada da Universidade Federal do Ceará para as etapas de elaboração do desenho, análise e avaliação estatística dos resultados. A análise dos dados, após entrada dupla processada por técnicos independentes, foi realizada usando software SPSS version 7.5 for Windows, com análise suplementar através de outro software (Excel version 4.0; Microsoft; Seattle, WA). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Diferenças entre os grupos ou correlações entre os parâmetros foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

Para análise descritiva das variáveis e associações em estudo, apresentados por meio de gráficos e tabelas foram utilizados:

- Teste Exato de Fisher para a análise de associações de variáveis dicotômicas.
- Teste Kolmogorov-Smirnov para a verificação de Normalidade na distribuição de variáveis contínuas.
- Teste Mann-Whitney para a comparação de duas médias de populações independentes, cuja distribuição da variável não é Normal.
- Teste Kruskal-Wallis para a comparação de três ou mais médias de populações independentes, cuja distribuição da variável não é Normal.
- Teste t-Student para a comparação de duas médias de populações independentes cuja distribuição da variável é Normal.
- Análise de variância para a comparação de três ou mais médias de populações independentes, cuja distribuição da variável é Normal.

A análise do Qui-quadrado foi utilizada para comparação das proporções no Teste lactulose-manitol. Diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ . Os valores encontrados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## **4. RESULTADOS**

## RESULTADOS

Os laboratórios do Hospital de Maracanaú e do LACEN processaram a maior parte das amostras durante sua rotina. A cooperação do LACEN com o Instituto Osvaldo Cruz da Fiocruz-RJ, permitiu a análise biomolecular dos escarros. O Instituto de Biomedicina (IBIMED) e a Unidade de Pesquisas Clínicas – Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará mantêm há longo tempo convênio com a Universidade de Virgínia EUA, o que garantiu apoio logístico para as análises séricas das drogas antituberculose.

### 4.1 Avaliação Epidemiológica e Social

Foram estudados 41 pacientes, 30 do sexo masculino com idade variando dos 18 aos 70 anos e 11 do sexo feminino com idade variando dos 15 aos 76 anos. A idade média  $\pm$  dp do grupo estudado foi de  $42,8 \pm 14,8$  anos.

Trinta e dois pacientes (72%) estavam internados na Unidade de Tisiologia do Hospital de Maracanaú, os demais procediam do Ambulatório daquela Unidade de Saúde onde estavam inscritos para tratamento. O comprometimento do estado geral em 20 pacientes (68%) foi o principal motivo de internação registrado no levantamento dos prontuários seguindo-se intercorrência clínica não contornável em ambulatório em 8 pacientes (25%); intolerância medicamentosa em 3 (9,37%) e motivo social em 1 paciente (3,12%).

As características clínico-sociais dos pacientes estudados estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1- Distribuição das características clínico-sociais de 41 pacientes tuberculosos estudados no Hospital de Maracanaú no período de outubro e novembro de 2001.**

Característica	N	%
Renda em salários-mínimos (SM)		
< ou = 1 SM	36	87,8
> 1 SM	5	12,2
Grau de instrução		
Analfabeto	12	29,3
1º grau incompleto	24	58,5
2º grau	5	12,2
Tabagismo		
nunca fumou	9	22,5
deixou há + de 1 ano	6	15,0
fuma	25	62,5
sem informação	1	
Uso de bebida alcoólica		
nunca usou	9	22,0
deixou há + de 1 ano	9	22,0
bebe de alguma forma	12	29,2
bebe muito	11	26,8
Uso de drogas ilícitas		
nunca usou	37	97,3
usuário	1	2,7
sem informação	3	
Nº de tratamentos		
1º tratamento	22	55,0
2º ou + tratamentos	19	45,0
Esquema de tratamento		
Esquema I ou I-R	34	83,0
outros esquemas	7	17,0

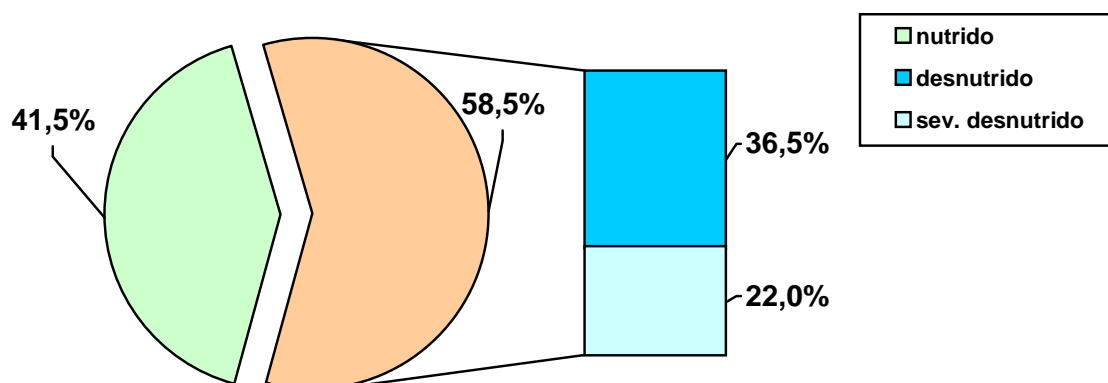


## 4.2 Avaliação Nutricional

O peso médio  $\pm$  dp do grupo foi igual a  $47,49 \pm 10,54$  kg, a altura  $\pm$  dp  $1,60 \pm 0,08$  metros e o IMC  $\pm$  dp  $18,22 \pm 3,21$  Kg/m<sup>2</sup>. Os pacientes masculinos tiveram peso médio de 49,51 kg, a estatura 1,63 m e a média do IMC foi igual a 18,34. Nas pacientes do sexo feminino o peso médio foi de 41,97 kg, a estatura média foi aferida em 1,52 m e a média do IMC foi de 17,87 Kg/m<sup>2</sup>.

Na avaliação do estado nutricional utilizando-se o índice de massa corpórea (IMC), vinte e quatro pacientes (58,5%) foram considerados desnutridos pelo  $IMC < 18,5$  Kg/m<sup>2</sup>, sendo nove (22%) destes incluídos no grupo dos severamente desnutridos ( $IMC < 16$  Kg/m<sup>2</sup>). Dezesete pacientes, ou seja, 41,5% foram considerados nutridos (Fig.1).

**Figura 1. Distribuição dos pacientes segundo a avaliação nutricional pelo IMC (n = 41)**



Parâmetros laboratoriais tais como dosagem de albumina sérica, dosagem de hemoglobina, contagem de linfócitos totais por  $\text{mm}^3$  foram dosados embora não tenham sido utilizados para a avaliação nutricional nem para o estudo de associação. A dosagem de albumina sérica em 27 pacientes (57,5%) ficou entre 3,5 e 5,0g/dL, valores considerados normais, enquanto que em 17 (42,5%) pacientes os valores estavam abaixo de 3,5g/dL considerado como hipoalbuminemia. Dos parâmetros laboratoriais avaliados destacamos a grande variação (85,4%) no tamanho, forma ou cor das hemácias evidenciadas neste grupo de pacientes com tuberculose (Tabela 2).

**Tabela 2- Distribuição dos pacientes com tuberculose pulmonar do Hospital de Maracanaú avaliados no período outubro e novembro de 2001, em função de alterações vistas nas hemácias.**

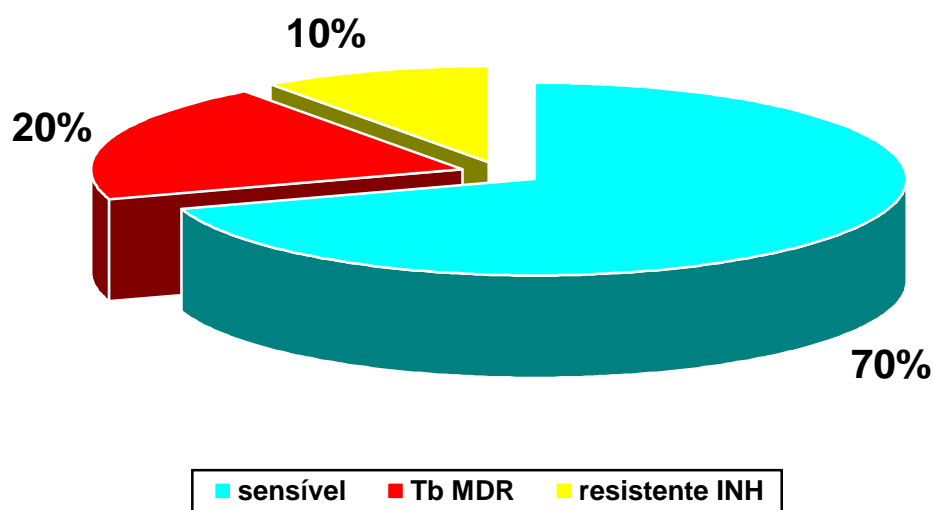
Resultado	Pacientes	
	n	%
Hemácias normais	6	14,6
Hemácias alteradas em tamanho forma ou cor	35	85,4
Total	41	100,0

### 4.3 Avaliação Biológica do *M. tuberculosis*

Dos 36 pacientes que forneceram escarro, em 20 amostras (55,5%) foi observado crescimento do *M. tuberculosis*, em 13 amostras (31,1%) não se observou crescimento do bacilo, sendo portanto consideradas negativas e em 3 amostras (8,4%) ocorreu contaminação da cultura tornando inválida a sua leitura.

Quanto ao perfil de resistência do *M. tuberculosis* às drogas antituberculose em cultura de escarro, observamos 4/20 (20.0%) pacientes com cepas multirresistentes (3 à R + H e 1 à todas as drogas testadas R+H+E+S+Z+Eth) e 2/20 (10.0%) com cepa monorresistentes à H. Quatorze amostras de 14/ 20 (70.0%) pacientes foram consideradas com *M. tuberculosis* sensíveis às drogas testadas. Dos 6 pacientes com *M. tuberculosis* resistentes, apenas 1 era ambulatorial e apresentava monorresistencia à isoniazida.

**Figura 2. Perfil de sensibilidade do *M. tuberculosis* em cultura de escarro (n= 20)**



Das cepas de *M. tuberculosis* cultivadas em 19/20 das amostras clínicas positivas, conseguiu-se realizar tipagem molecular utilizando-se a sequência de inserção 6110-RFLP. Observando-se na Figura 3 a ordem esquerda-direita dos dados de 19 preparações de DNA extraídos de cultura de amostras clínicas dos pacientes, aplicadas em membrana para análise do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) para a identificação das cepas de *M. tuberculosis*, notou-se que duas amostras formaram "clusters", ou seja, apresentaram perfis idênticos: nº 13 (paciente R.N.F) e nº 16 (paciente A F.P).

**Figura 3. Perfis genéticos obtidos por tipagem molecular utilizando a técnica de IS6110-RFLP a partir de culturas de *M. tuberculosis* obtidos de escarro de pacientes do Hospital de Maracanaú no período outubro e novembro de 2001.**

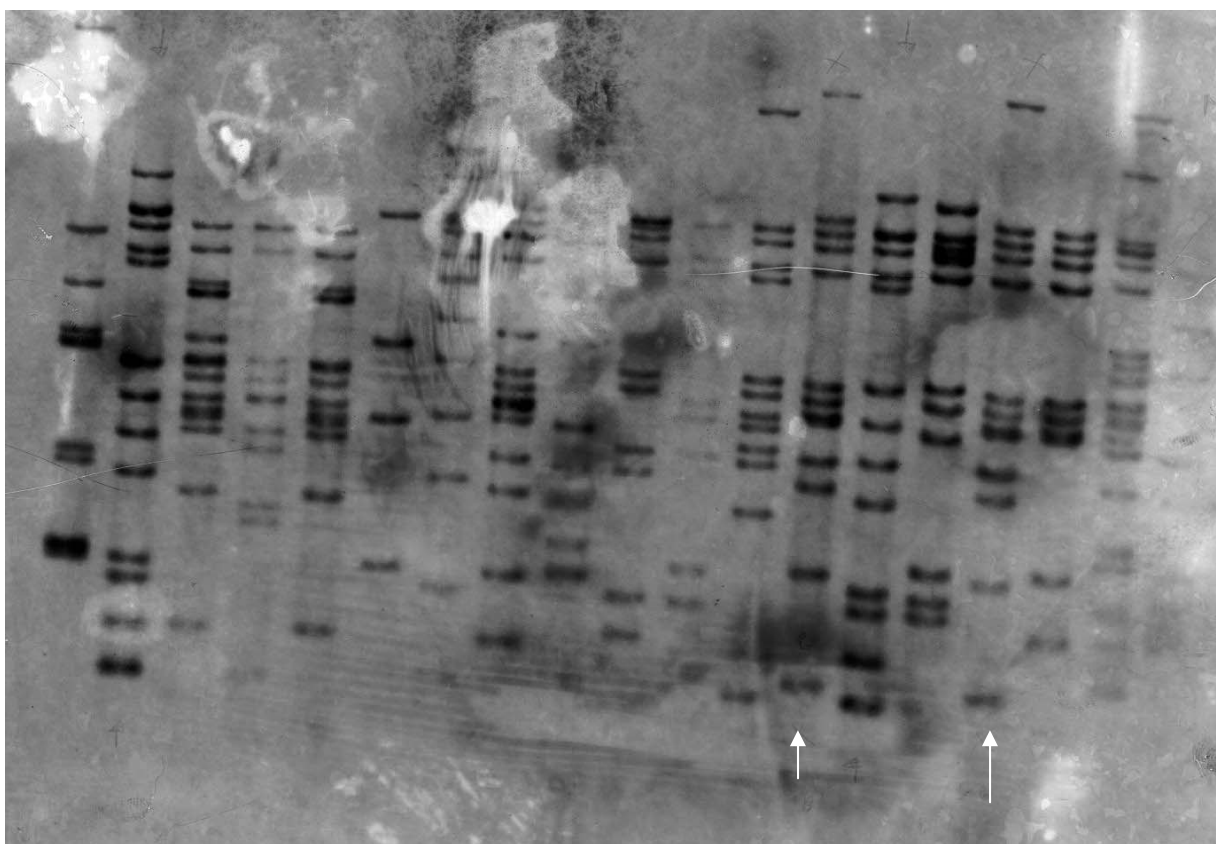


Foto: gentilmente cedida pela Dra Fátima Fandinho – Instituto Oswaldo Cruz -RJ

#### 4.4 Avaliação de Parâmetros Inflamatórios Intestinais

A avaliação dos parâmetros inflamatórios intestinais realizada através de diferentes tipos de exames de fezes mostrou a distribuição exposta na Tabela 3.

Do grupo de 41 pacientes examinados, somente um não conseguiu fornecer material para o exame de fezes. A coleta de fezes acusou portanto, uma eficiência de 97,5% (40/41). Dos pacientes que forneceram material, apenas a pesquisa de lactoferrina, não pode ser realizada em todas as amostras.

**Tabela 3. Distribuição dos pacientes com tuberculose pulmonar do Hospital de Maracanaú em função do resultado de parâmetros inflamatórios intestinais nos exames de fezes realizados no período outubro e novembro de 2001.**

Resultado	Gordura fecal		Lactoferrina		Sangue oculto		Ovos e parasitas direto e concentrado		<i>Cryptosporidium</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
negativo	40	100,0	28	80,0	40	100,0	36	90,0	40	100,0
positivo			7	20,0			4	10,0		
Total	40	100,0	35	100,0	40	100,0	40	100,0	40	100,0

Através da visualização da Tabela 3 nota-se que em 20,0% (7) dos pacientes observados conseguiu-se detectar a presença de lactoferrina; em 10,0% (4) apresentou-se positividade na pesquisa direta e concentrada de ovos

e parasitas. Dos parasitas encontrados registramos a presença de *Strongyloides stercoralis* (1); *Ascaris lumbricoides* (1); *E. coli* (1) e *Ancylostoma duodenale* (1). Nos exames para detecção de gordura fecal, pesquisa de sangue oculto e pesquisa de *Cryptosporidium* observou-se 100,0% dos resultados negativos.

Outra forma de avaliação dos parâmetros inflamatórios intestinais foi feita através da dosagem de citocinas pró-inflamatórias. Em relação à dosagem de IL-1 e IL-8 no sangue e nas fezes, tivemos em cada série apenas um paciente que não conseguiu fornecer fezes para exame e outro onde não foi possível a dosagem sérica. Dos exames realizados podemos observar a distribuição dos resultados na Tabela 4 abaixo.

**Tabela 4. Distribuição dos pacientes com tuberculose pulmonar do Hospital de Maracanaú em função da detecção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-8) em amostras de sangue e fezes coletadas no período de outubro e novembro de 2001.**

Resultado	IL-1(pg/mL) - sangue		IL-1 (pg/mL) - fezes		IL- 8(pg/mL) - sangue		IL - 8 (pg/mL) - fezes	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Negativo	40	100,0	22	55,0	5	12,5	34	85,0
Positivo			18	45,0	35	87,5	6	15,0
Total	40	100,0	40	100,0	40	100,0	40	100,0

#### 4.5 Avaliação da Biodisponibilidade Drogas Antituberculose

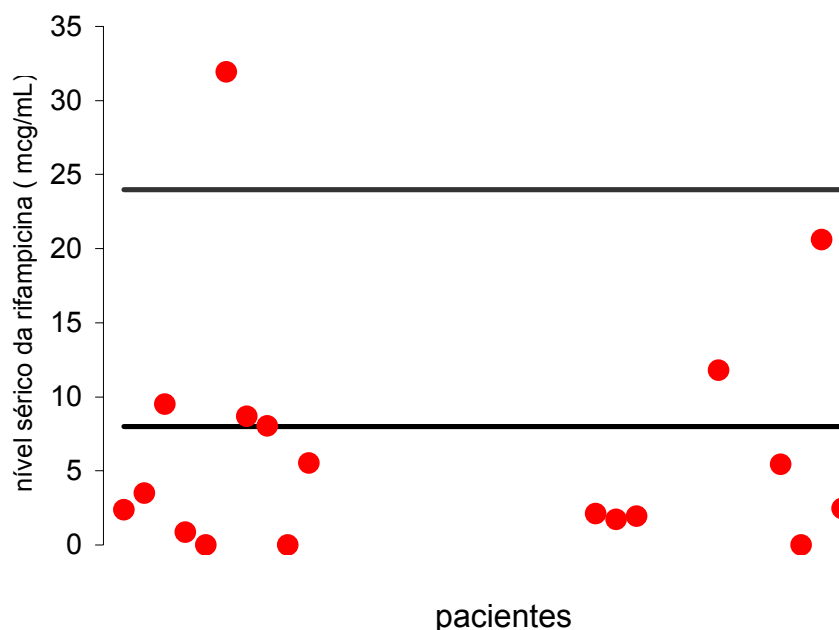
Considerando os níveis terapêuticos da R (8-24 mcg/mL) e da H (3-6 mcg/mL) no grupo de 18 pacientes selecionados para avaliação da biodisponibilidade das drogas antituberculose, observamos que as concentrações séricas 2 horas da rifampicina (CRM2h) e concentrações séricas 2 horas da isoniazida (CINH2h) em 16/18 (88,8%) pacientes não atingiram

níveis séricos adequados (Figura 6). 8/18 (44,4%) pacientes não alcançaram níveis séricos para ambas as drogas simultaneamente.

Na análise das drogas isoladas verificamos que em 12/18 (66,7%) pacientes, a CRM2h não alcançou o nível sérico mínimo (Figura 4). e 13/18 (72,2%) a CIN2h também foi reduzida (Figura 5).

A concentração sérica média da rifampicina foi 6,47 mcg/mL e a concentração sérica média da isoniazida foi de 2,17 mcg/mL.

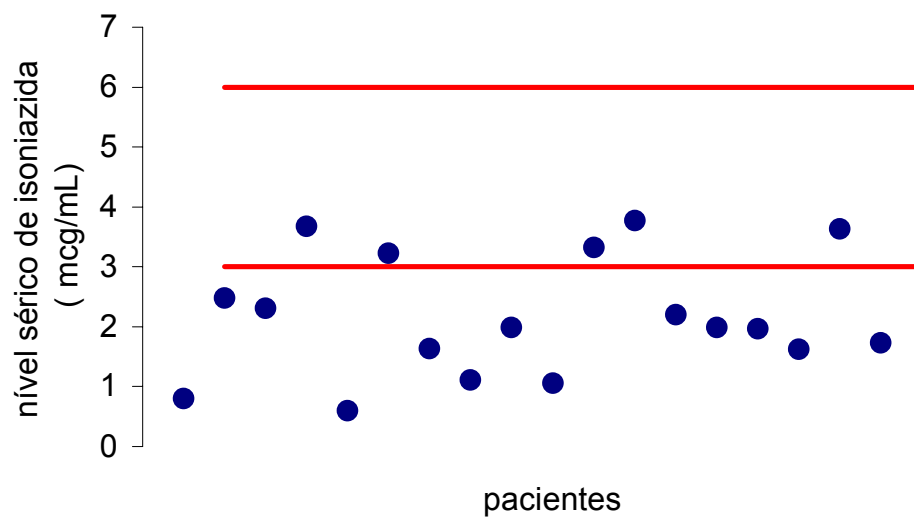
**Figura 4. Distribuição dos níveis séricos da rifampicina após 2 horas da tomada em jejum de 600 mg da droga em 18 pacientes com tuberculose pulmonar ativa do Hospital de Maracanaú no período outubro e novembro de 2001 -**



**Tabela 5. Distribuição dos pacientes com tuberculose pulmonar do Hospital de Maracanaú de acordo com o nível terapêutico alcançado pela rifampicina após 2 horas da tomada de 600 mg da droga em jejum.**

Nível sérico da R	Nº de pacientes	%
sub terapêutico ( < 8 mcg/ml)	12	66,7
terapêutico ( = 8< ; =< 24 mcg/ml )	6	33,3
Total	18	100,0

**Figura 5. Distribuição dos níveis séricos da isoniazida após 2 horas da tomada em jejum de 400 mg da droga em 18 pacientes com tuberculose pulmonar ativa do Hospital de Maracanaú no período outubro e novembro de 2001**

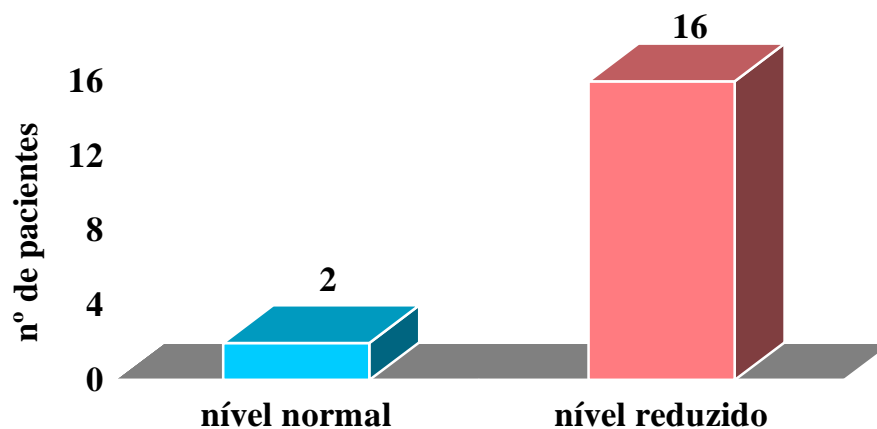




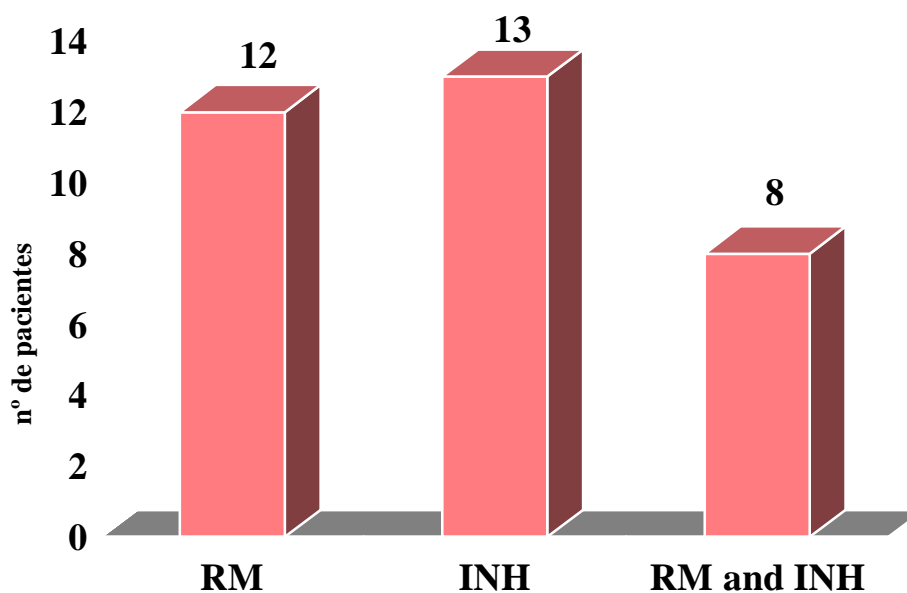
**Tabela 6- Distribuição dos pacientes com tuberculose pulmonar do Hospital de Maracanaú de Tabela acordo com o nível terapêutico alcançado pela isoniazida após 2 horas da tomada de 400 mg da droga em jejum.**

Nível sérico da H	Nº pacientes	%
sub terapêutico (< 3 mcg/ml)	13	72,2
terapêutico ( = 3 < ; =< 6 mcg/ml)	5	27,8
Total	18	100,0

**Figura 6 . Distribuição dos pacientes quanto ao alcance do nível terapêutico das drogas antituberculose, rifampicina e isoniazida (n=18)**



**Figura 7 . Distribuição dos pacientes quanto a redução dos níveis terapêuticos as drogas antituberculose, rifampicina e isoniazida (n=18)**



A certificação da qualidade das drogas antituberculose utilizadas nesse estudo foi feita pelo Núcleo de Pesquisa em Alimentos e Medicamentos (NUPLAN) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Natal – RN – Brasil (Tabela 7).

**Tabela 7. Laudo de análise de cápsulas de rifampicina 300mg associada a isoniazida 200 mg do Lote 0103022, realizado pelo NUPLAN, emitido em 30/05/2002.**

#### Características Físico-Químicas

Teste	Resultado	Especificação
Descrição	Passa - teste	Pó vermelho, uniforme, livre de substâncias estranhas, cápsula gelatinosa nº 0 vinho/ vinho

Teste	Resultado	Especificação
Peso médio	539,68 mg	499,20 a 580,15 mg
Dureza	-	-
Desintegração	4 min	Máx 30 min
Dissolução	-	-
Friabilidade	-	-
Umidade	-	-

#### Controle Físico-Químico

Identificação		
Fármaco	Resultado	Especificação
Isoniazida Rifampicina	Passa - teste	Positiva

Doseamento		
Fármaco	Resultado	Especificação
Isoniazida	96,48%	90 a 110%
Rifampicina	100,68%	90 a 130 %

Uniformidade de conteúdo		
Fármaco	Resultado	Especificação
Isoniazida	95,39%	85 a 115%
Rifampicina	99,54%	85 a 115%

## 4.6 Avaliação da Permeabilidade Intestinal

O teste da lactulose / manitol para a avaliação da permeabilidade intestinal foi realizado em 41 pacientes e em 28 voluntários sadios. Nenhum efeito colateral decorrente da ingestão da solução oral foi observado nos dois grupos estudados. Somente um paciente não conseguiu fornecer material (urina) para exame e por isso foi excluído.

Dos resultados obtidos tivemos 18 pacientes com valores de lactulose não detectados pelo HPLC sendo considerados igual a zero. A não detecção da lactulose nesse teste já foi relatada por outros autores, em pequeno número de pacientes de várias séries de investigação (Lima et al., 1997) e em todos esses testes foram excluídos. Não se tem uma explicação clara sobre esse resultado.

Por considerarmos dado expressivo (18/40) nesse trabalho, decidimos inicialmente avaliar os fatores que poderiam estar associados com a presença do evento Lactulose = Zero.

Os resultados encontrados foram: sexo ( $p=1,000$ ); renda ( $p=0,6419$ ); escolaridade ( $p=0,3154$ ); uso de bebida alcoólica ( $p=1,000$ ); uso de fumo ( $p=0,4648$ ); grau de nutrição ( $p=0,8771$ ); nº de tratamentos ( $p=0,7605$ ); baciloscopia de escarro positiva ( $p=0,5031$ ); concentração sérica de R em nível subterapêutico ( $p=0,3156$ ); concentração sérica de H em nível subterapêutico ( $p=1,000$ ); detecção de lactoferrina ( $p=0,6722$ ); detecção de ovos e parasitas nas fezes ( $p=0,2348$ ); detecção de alterações de forma, tamanho ou cor de hemácias ( $p=1,000$ ); detecção de IL-1 sangue ( $p=1,000$ ); IL-1 fezes ( $p=0,0534$ ); IL-8 sangue ( $p=0,3810$ ); IL-8 fezes ( $p=0,6419$ ). Dos parâmetros analisados apenas a dosagem de IL-1 nas fezes sugere alguma associação (Tabela 8).

**Tabela 8 - Distribuição dos pacientes, segundo a excreção urinária de Lactulose, em função da detecção de IL-1(pg/mL) nas fezes**

IL-1(pg/mL) nas fezes	Lactulose (L) = 0				Total	
	não		sim		n	%
	n	%	n	%		
Negativo	16	72,7	6	33,4	22	55,0
Positivo	6	27,3	12	66,6	18	45,0
Total	22	100,0	18	100,0	40	100,0

**Teste Exato de Fisher**

**p= 0,0534**

Pela tabela 8 em função da lactulose observamos que em seis dos pacientes (27,3%) do grupo cuja lactulose > 0 foi detectado IL-1(pg/mL) nas fezes enquanto que no grupo de pacientes cuja lactulose=0, o percentual de pacientes com IL-1(pg/mL) nas fezes foi de 66,6%. Devido ao tamanho da amostra considerando um nível de significância do teste superior a 5%, por exemplo 6%, então se poderia observar a existência de associação ( p= 0,0534) entre a lactulose = 0 e a detecção de IL-1(pg/mL) nas fezes onde, no grupo de pacientes com lactulose = 0 observa-se um maior percentual de pacientes com IL-1(pg/mL) nas fezes do que no grupo de pacientes com lactulose > 0. Estatisticamente contudo, segundo os dados observados, nada nos leva a crer que exista de fato associação entre a IL-1(pg/mL) nas fezes e o valor da lactulose =0 e > 0 (p= 0,0534) ao nível de significância de 5%.

Baseando nas análises anteriores consideramos que nenhum dos parâmetros mostrou qualquer associação com o resultado lactulose zero, quando consideramos o nível de significância de 5%, portanto os dois grupos não apresentaram diferenças significativas que justifique estudos separados. Daqui por diante toda a análise será feita no grupo de 22 pacientes com lactulose detectável na urina (lactulose > Zero).

Quanto ao manitol a análise será feita no total dos 40 pacientes que realizaram o teste.

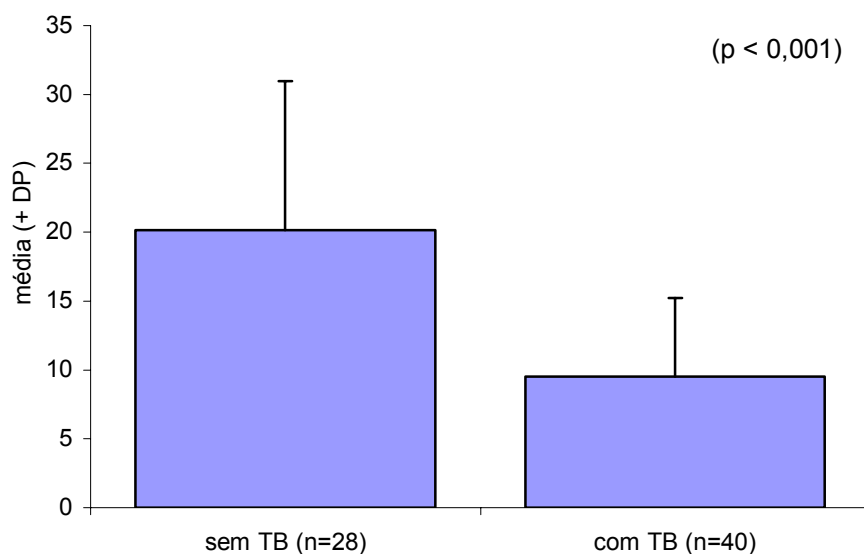
O quadro descritivo dos valores da excreção urinária do manitol, da lactulose e da relação lactulose / manitol encontrados no grupo de pacientes com TB e nos voluntários sadios (controles) são apresentados abaixo (Tabela 9).

**Tabela 9. Valores descritivos da taxa de excreção urinária do manitol, da lactulose, e da relação lactulose / manitol no grupo de pacientes com tuberculose e no grupo controle.**

Grupo	manitol (M)			lactulose (L)			lactulose / manitol (L/M)		
	controle	com TB	Total	controle	com TB	Total	controle	com TB	Total
N	28	40	68	28	22	50	28	22	50
média	20,14	9,52	13,89	0,52	0,59	0,55	0,0290	0,0504	0,0384
Desvio padrão	10,84	5,70	9,69	0,47	1,79	1,22	0,0205	0,1072	0,0726
mínimo	2,15	0,52	0,52	0,06	0,03	0,03	0,0023	0,0075	0,0023
mediana	18,15	9,67	12,86	0,39	0,13	0,32	0,0225	0,0177	0,0209
máximo	57,73	22,91	57,73	2,09	8,56	8,56	0,0754	0,5138	0,5138

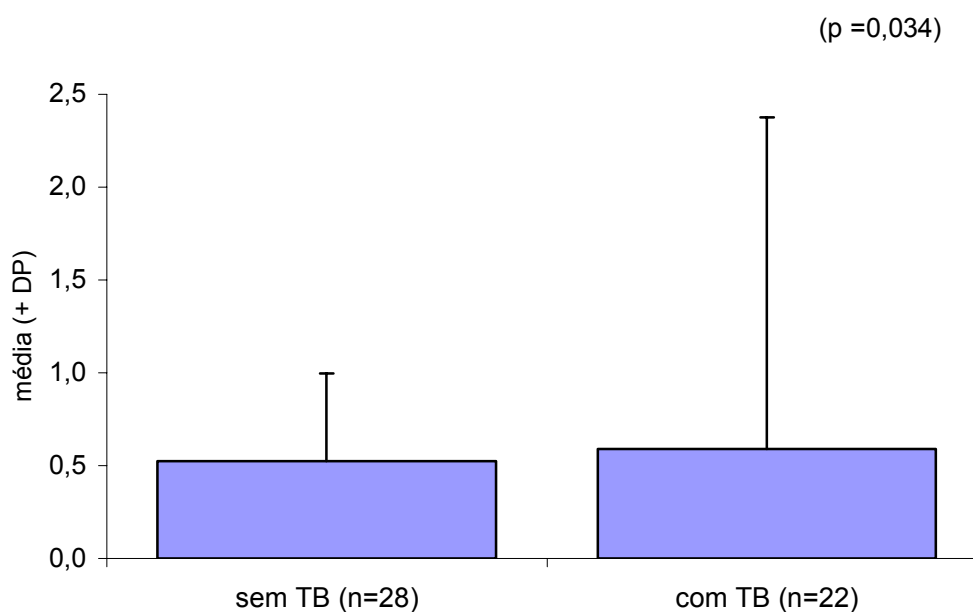
Dado que a distribuição desses parâmetros não é Normal, usamos o teste de Mann-Whitney para comparar os grupos com TB e grupo controle para cada uma das variáveis manitol (M), lactulose (L) e lactulose / manitol (L/M).

**Figura 8. Valor médio (+ dp) da taxa de excreção urinária do manitol em função do grupo de pacientes com e sem tuberculose (controle).**



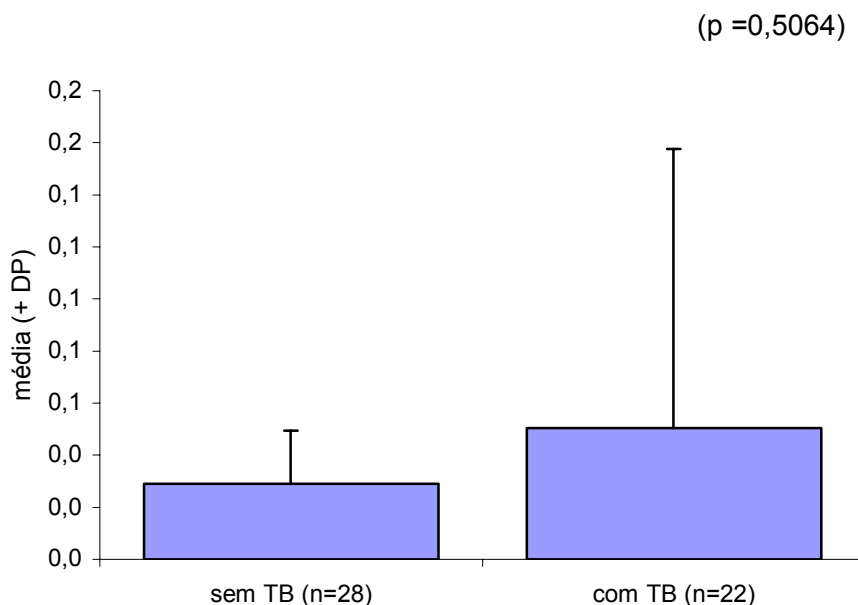
Existe diferença significativa,  $p < 0,001$ , entre os grupos com e sem TB para variável manitol sendo que, o valor médio da taxa de excreção do manitol, no grupo controle sem TB ( 20,14) é superior ao do grupo com TB (9,52) ( Figura 8).

**Figura 9. Valor médio (+dp) da taxa de excreção urinária da lactulose em função do grupo de pacientes com e sem Tuberculose ( controle).**



Existe diferença significativa,  $p < 0,0034$ , entre os grupos com e sem TB para variável lactulose sendo que, o valor médio da lactulose, no grupo com TB (0,59) é superior ao do grupo controle sem TB (0,52) (Figura 9).

**Figura 10. Valor médio (+ dp) da relação da taxa de excreção urinária lactulose / manitol em função do grupo de pacientes com e sem tuberculose ( controle).**



De acordo com os dados observados, nada nos leva a crer que existe diferença significativa,  $p = 0,5064$ , entre os grupos com e sem TB para variável relação lactulose / manitol embora tenha-se que, o valor médio dessa relação no grupo com TB seja igual a 0,0504 e no grupo controle sem TB igual a 0,0290 ( Figura 10).

Em resumo observamos que a taxa de excreção urinária de manitol (média  $\pm$  dp) foi significativamente menor  $p < 0,001$  nos pacientes ( $9,52 \pm 5,70$ ) (erro padrão= 0,90) que nos controles ( $20,14 \pm 10,84$ ) (erro padrão= 2,04). A excreção de lactulose foi significativamente aumentada  $p < 0,05$  nos pacientes ( $0,59 \pm 1,79$ ) (erro padrão= 0,381) em relação aos controles ( $0,52 \pm 0,47$ ) (erro padrão= 0,089) e a razão L/M aumentou de forma consistente, porém não



significativa  $p > 0,05$  nos pacientes ( $0,05 \pm 0,10$ ) (erro padrão= 0,0229) quando comparada ao grupo controle ( $0,02 \pm 0,02$ ) (erro padrão= 0,004).

## 4.7 Associação entre os Parâmetros

Os estudos de associação foram feitos entre alguns parâmetros do estudo.

### 4.7.1 Estado nutricional *versus* parâmetros sociais

Pela tabela 10 em função da renda não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos, pacientes nutridos e desnutridos.

**Tabela 10- Distribuição dos pacientes quanto ao estado nutricional em função da renda em salários- mínimos (SM)**

Grau de nutrição	Renda (em SM)			
	No máximo 1		Mais de 1	
	n	%	n	%
Desnutrido	23	63,9	1	20,0
Nutrido	13	36,1	4	80,0
Total	36	100,0	5	100,0

Razão de verossimilhança = 0,105

No grupo de pacientes cuja renda foi  $\leq 1$  SM verificamos que a maior parte, ou seja 13 pacientes, correspondendo a 63,9% estavam desnutridos enquanto, no grupo de pacientes cuja renda foi  $> 1$  SM apenas um (1) correspondendo a 20% estavam desnutridos, a maior parte deles, 4 pacientes ou 80,0% foram considerados como nutridos.

Pela tabela 11 em função do uso de bebida alcoólica, segundo os dados observados, nada nos leva a crer que existam diferenças entre os dois grupos.

**Tabela 11- Distribuição dos pacientes quanto ao estado nutricional em função do uso de bebida alcoólica**

Grau de nutrição	Faz ou fez uso de bebida alcoólica			
	Não		Sim	
	n	%	n	%
Desnutrido	3	33,3	21	65,6
Nutrido	6	66,7	11	34,4
Total	9	100,0	32	100,0

Razão de verossimilhança = 0,221

No grupo de pacientes que nunca fizeram uso de bebida alcoólica (9) observou-se 66,7% de pacientes nutridos, enquanto que no grupo de pacientes que fazem ou fizeram uso de bebida alcoólica (32) observou-se que a maior parte, 21 pacientes correspondendo a 65,6 foi considerado desnutrido.

Quanto à distribuição dos pacientes de acordo com o grau de nutrição em função dos valores de excreção urinária de manitol, segundo os dados obtidos não foi observada qualquer relação associativa entre os dois parâmetros.

**Tabela 12. Valores descritivos da taxa de excreção urinária do manitol nos diferentes graus de nutrição**

Grau de nutrição	n	média	Desvio padrão	mínimo	mediana	máximo
desnutrição leve	15	10,46	5,95	0,70	10,24	22,91
desnutrição severa	8	10,48	6,33	1,60	12,11	16,96
não é desnutrido	17	8,24	5,27	0,52	8,76	17,88
Total	40	9,52	5,70	0,52	9,66	22,91

#### 4.7.2 Parâmetros inflamatórios intestinais

Nas tabelas abaixo observamos o resultado da análise de associação da detecção de citocinas pró-inflamatórias no sangue e nas fezes e da detecção de lactoferrina nas fezes, em função da identificação de ovos e parasitas no exame de fezes.

**Tabela 13. Distribuição de pacientes segundo a detecção de IL-8(pg/mL) – sangue em função da presença de ovos e parasitas nas fezes.**

IL- 8(pg/mL) - sangue	de ovos e parasitas concentrado			
	Ausente		presente	
	n	%	n	%
Ausente	5	13,8		
presente	31	86,2	4	100,0
Total	36	100,0	4	100,0

No grupo de pacientes com ausência de ovos e parasitas nas fezes (36) 86,2% foram detectados níveis de IL-8 no sangue, enquanto que no grupo onde se identificou a presença de ovos e parasitas nas fezes (4) em nenhum foi detectado níveis séricos de IL-8 (Tabela 13).

**Tabela 14. Distribuição de pacientes segundo a detecção de IL-8(pg/mL) nas fezes em função da presença de ovos e parasitas nas fezes**

IL- 8(pg/mL) - fezes	de ovos e parasitas concentrado			
	Ausente		presente	
	n	%	n	%
Ausente	30	83,3	4	100,0
presente	6	16,7		
Total	36	100,0	4	100,0

No grupo de pacientes com ausência de ovos e parasitas nas fezes (36) apenas em 16,7% foram detectados níveis de IL-8 nas fezes, enquanto que no grupo onde foram identificados ovos e parasitas nas fezes (4) em nenhum foi feita a detecção de IL-8 nas fezes (Tabela 14).

**Tabela 15. Distribuição de pacientes segundo a detecção de IL-1(pg/mL) nas fezes em função da presença de ovos e parasitas nas fezes**

IL-1(pg/mL) - fezes	de ovos e parasitas concentrado			
	Ausente		presente	
	n	%	n	%
Ausente	18	50,0	4	100,0
presente	18	50,0		
Total	36	100,0	4	100,0

No grupo de pacientes com ausência de ovos e parasitas nas fezes (36) a metade deles 50% foi feita a detecção de níveis de IL-1 nas fezes, enquanto que no grupo de pacientes onde foi feita a identificação de ovos e parasitas nas fezes (4) em nenhum foi feita a detecção de IL-1 nas fezes (Tabela 15).

**Tabela 16. Distribuição de pacientes segundo a detecção de lactoferrina nas fezes em função da presença de ovos e parasitas nas fezes**

Lactoferrina	de ovos e parasitas concentrado			
	Ausente		presente	
	n	%	n	%
negativa	27	87,1	3	75,0
positiva	4	12,9	1	25,0
Total	31	100,0	4	100,0

No grupo de pacientes com ausência de ovos e parasitas nas fezes (35) 87,1 % não se detectou lactoferrina nas fezes, enquanto que no grupo em que foi feita a identificação de ovos e parasitas nas fezes (4) 75,0% também não se detectou lactoferrina nas fezes (Tabela 16).

#### 4.7.3 Permeabilidade intestinal *versus* biodisponibilidade de drogas

Quanto a análise de associação entre a taxa de excreção urinária de manitol, de lactulose e da relação lactulose / manitol e as concentrações séricas das drogas antituberculose observamos os seguintes resultados :

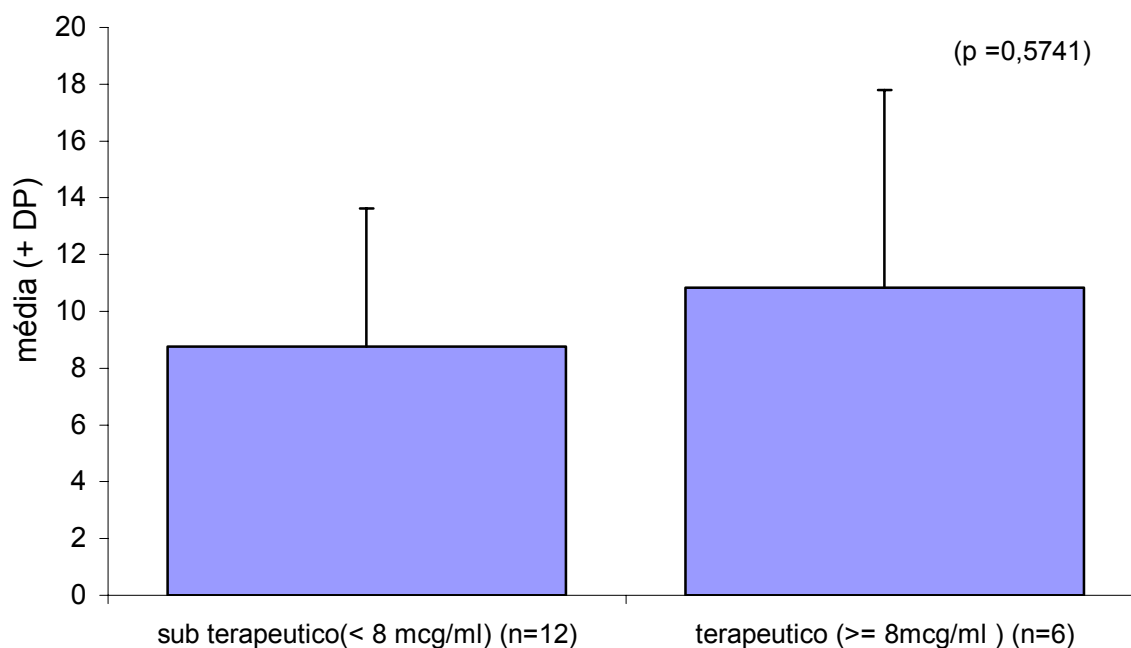
##### A) Para a rifampicina (R)

Segundo os dados observados, nada nos leva a crer que exista diferença significativa, entre a concentração sérica da rifampicina em níveis terapêuticos ou abaixo dele para as variáveis manitol ( $p=0,5741$ ), lactulose ( $p=0,1359$ ) e lactulose / manitol ( $p=0,1101$ ) considerando-se o nível de significância estatística de 5% (Tabela 17).

**Tabela 17. Valores descritivos do manitol, da lactulose, e da relação lactulose / manitol em função da concentração sérica da rifampicina**

Grupo	Manitol (M)			Lactulose (L)			Lactulose / manitol (L/M)		
	sub terapêutico ( < 8 cg/ml )	terapêutico ( >= 8mcg/ml )	Total	sub terapêutico ( < 8 cg/ml )	terapêutico ( >= 8mcg/ml )	Total	sub terapêutico ( < 8 cg/ml )	terapêutico ( >= 8mcg/ml )	Total
N	12	6	18	6	1	7	5	2	7
Média	8,7610	10,8384	9,4534	0,2998	0,1393	0,2769	0,0434	0,0219	0,0372
Desvio padrão	4,8562	6,9543	5,5226	0,1565		0,1552	0,0496	0,0205	0,0426
Mínimo	0,5238	1,8949	0,5238	0,1082	0,1393	0,1082	0,0112	0,0075	0,0075
Mediana	8,3003	11,1673	9,3711	0,3070		0,2498	0,0244	0,0219	0,0244
Máximo	16,9648	18,6836	18,6836	0,5170	0,1393	0,5170	0,1304	0,0364	0,1304

**Figura 11. Valor médio (+ dp) da taxa de excreção urinária do manitol no grupo de pacientes classificados segundo a concentração sérica da R**



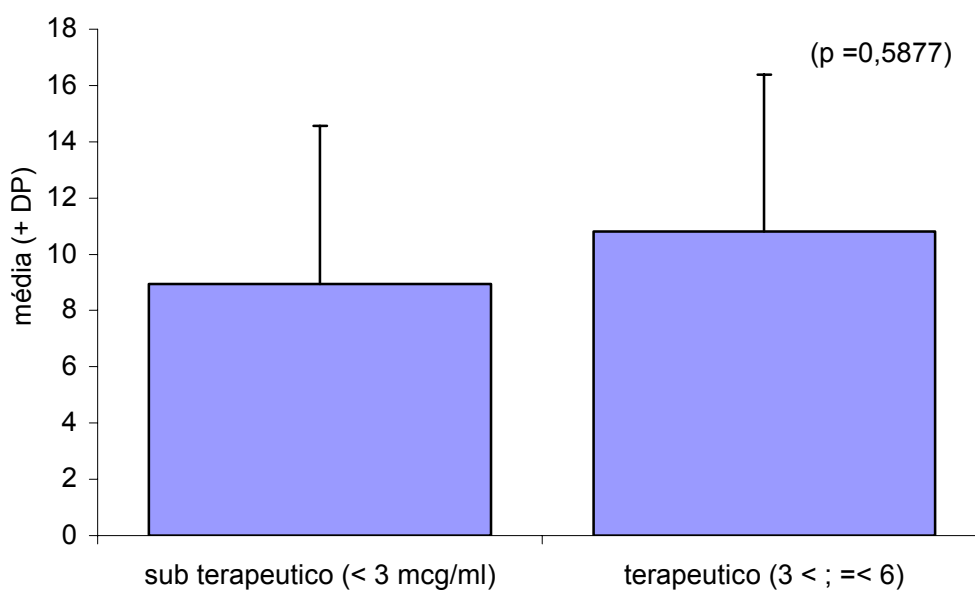
### **B) Em relação à isoniazida (H)**

Segundo os dados observados, nada nos leva a crer que exista diferença significativa, entre a concentração sérica da isoniazida em níveis terapêuticos ou abaixo dele para as variáveis manitol ( $p=0,5877$ ), lactulose ( $p=0,8664$ ) e lactulose / manitol ( $p=0,9553$ ) considerando-se o nível de significância estatística de 5%.

**Tabela 18. Valores descritivos da taxa de excreção urinária do manitol, da lactulose, e da relação lactulose / manitol em função da concentração sérica da isoniazida**

Grupo	manitol (M)			lactulose (L)			lactulose / manitol (L/M)		
	sub terapêutico	terapêutico	Total	sub terapêutico	terapêutico	Total	sub terapêutico	terapêutico	Total
N	13	5	18	5	2	7	5	2	7
Média	8,9348	10,8019	9,4534	0,2564	0,3282	0,2769	0,0434	0,0219	0,0372
Desvio padrão	5,6378	5,5784	5,5226	0,1284	0,2670	0,1552	0,0496	0,0205	0,0426
Mínimo	0,5238	5,3826	0,5238	0,1082	0,1393	0,1082	0,0112	0,0075	0,0075
Mediana	9,4338	9,3084	9,3711	0,2498	0,3282	0,2498	0,0244	0,0219	0,0244
Máximo	17,8796	18,6836	18,6836	0,4047	0,5170	0,5170	0,1304	0,0364	0,1304

**Figura 12. Valor médio (+ dp) da taxa de excreção urinária do manitol no grupo de pacientes classificados segundo a concentração sérica da H.**



## **5. DISCUSSÃO**



Numerosos estudos têm sido realizados tanto em doenças gastrointestinais quanto em outras sem aparente relação com o trato digestivo desde que o conceito de permeabilidade intestinal foi introduzido.

Alterações da permeabilidade intestinal em patologias não digestivas como na Asma brônquica, no Eczema atópico nas quais se acredita que o aumento da permeabilidade intestinal a macromoléculas possa ser capaz de desencadear ou manter a doença ao permitir a passagem de antígenos luminiais para o interior do organismo tem sido cada vez mais descrito. É perfeitamente válido imaginar que o aumento da permeabilidade intestinal seja em alguns casos origem e em outros, consequência da doença ou circunstância a ela associada.

As variações fisiológicas e a fisiopatologia das alterações nas diversas condições clínicas são um campo ainda pouco explorado. O comportamento da permeabilidade intestinal na tuberculose pulmonar é um tema instigante, pela possível repercussão que alterações dessa ordem possam ter na absorção de drogas e no surgimento da resistência do *M. tuberculosis*.

Sabe-se que, área absorptiva da mucosa intestinal pode ser alterada por estímulos citotóxicos diretos que podem determinar morte ou extrusão celular, bem como redução na altura ou atrofia das vilosidades intestinais. Variações na velocidade peristáltica intestinal, por sua vez, têm também efeito direto na absorção das diversas substâncias pela mucosa, pois determinam aumento ou redução no seu tempo de permanência na luz intestinal, variando conseqüentemente a chance de contato da substância com a superfície mucosa. Entretanto, os mecanismos fisiológicos envolvidos na regulação da permeabilidade intestinal são pouco conhecidos, bem como os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas diferentes situações clínicas.

Em muitas doenças intestinais e sistêmicas as alterações da permeabilidade intestinal, expressão do dano na barreira intestinal, têm sido relacionadas com alterações das junções intercelulares. As células do epitélio

intestinal, voltadas para a luz intestinal, são ligadas na sua porção apical, em seus bordos laterais, por uma série de estruturas bastante complexas, as chamadas junções intercelulares também denominadas por “*zônulas adherens*” ou zônulas de adesão (ZA) e “*zônula ocludens*” ou zônula de oclusão (ZO). As ZA são responsáveis pela adesão e pela polaridade das células. As zônulas de oclusão ou “*tight junctions*” (TJ) são estruturas formadas por fibras protéicas e espaços intercelulares estreitos e tortuosos, que formam canais de passagens de moléculas de peso superior a 180 Daltons. Estas zônulas exercem um importante papel na regulação na difusão transepitelial de moléculas. Essas regiões são áreas altamente dinâmicas, cuja permeabilidade (via paracelular) pode variar em resposta a estímulos intracelulares ou do meio externo.

A estrutura das zônulas de oclusão é regulada por moléculas sinalizadoras intracelulares como AMPc (adenosina monofosfato cíclico),  $Ca^{++}$ , as quais aumentam a resistência, reduzindo a permeabilidade e a proteína cinase C, que quando ativada por várias substâncias, acaba por diminuir a resistência nas zonas de oclusão, aumentando a permeabilidade intestinal nessa região (Mullin & O'Brien, 1986). Outras moléculas como a proteína G, a fosfolipase A2 e C, também têm sido implicadas nessa regulação (Gasbarrini & Montalto, 1999).

Diversos fatores como citocina IL-15, IL-2 (Nishiyama et al., 2001), toxinas bacterianas, hormônios e drogas podem funcionar como gatilhos na regulação das zônulas de oclusão da barreira epitelial (Gasbarrini & Montalto, 1999).

Em interessante estudo sobre a permeabilidade intestinal conduzido por Welsh et al. (1998) em pacientes com icterícia colestática, foi observado um aumento reversível da permeabilidade intestinal, avaliado pelo teste de lactulose manitol, associado com a ativação imune do tecido linfóide (GALT) e dos enterócitos. Cinco semanas após drenagem biliar nova medida da permeabilidade intestinal revelou volta aos valores normais, sugerindo a ativação imunológica como um dos fatores de regulação da permeabilidade.

Em outro estudo realizado em pacientes desnutridos, os mesmos autores, Welsh et al. (1998) demonstraram novamente a ativação de células mononucleares da lamina própria e de enterócitos, associada a aumento da

permeabilidade intestinal, medida através do teste da lactulose / manitol, propondo haver uma inter-relação desses dois fatos.

O aumento da permeabilidade da barreira mucosa intestinal pode permitir que um número exagerado de toxinas e antígenos caia na corrente sanguínea e produzam sensibilização do sistema imune ou doença nos indivíduos. A diminuição da permeabilidade, por outro lado, parece ser uma causa importante de mal-absorção de nutrientes ou carboidratos específicos, gordura e micro-nutrientes, o que estaria relacionado com a desnutrição, retardo no crescimento e várias outras conseqüências clínicas.

A absorção de drogas segue a mesma lógica da absorção de nutrientes, portanto alterações da permeabilidade intestinal têm conseqüência direta na absorção de drogas levando a efeitos terapêuticos e tratamentos inadequados, quer por alcançar níveis subterapêuticos ou pela potencial toxicidade que os diversos fármacos podem determinar.

No caso do tratamento da tuberculose a garantia de concentrações séricas adequadas é fundamental, não apenas para o sucesso terapêutico do caso individual, mas principalmente devido à possibilidade de seleção e de disseminação de mutantes resistentes às drogas antituberculose.

## **5.1 Avaliação da Permeabilidade Intestinal e da Área Absortiva**

O estudo da permeabilidade intestinal e da capacidade absortiva, e a relação que esses parâmetros tem com a biodisponibilidade de drogas, têm suscitado a investigação de muitos pesquisadores.

A pesquisa de substâncias redutoras nas fezes tem sido utilizada há longo tempo como um marcador grosseiro da redução da capacidade absortiva da mucosa intestinal, fornecendo poucas informações sobre possíveis alterações dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na regulação da permeabilidade intestinal.

A presença de substâncias redutoras nas fezes representa um indicador indireto de lesão não específica da mucosa intestinal ou de deficiência congênita de dissacaridases intestinais (lactase e sacarase), capaz de reduzir sua capacidade absorptiva.

Pacientes com doença celíaca devido a dissacaridúria que apresentam, serviram de base para o estudo mais apurado das alterações da permeabilidade intestinal (Gryboski et al., 1963). Vários métodos não invasivos têm sido propostos desde então, para avaliação da permeabilidade intestinal em humanos (Fordtran et al., 1965). Moléculas como uréia, ácido úrico, creatinina, xilose, lactulose, manitol, inulina, rafinose, ramnose, celobiose, dextran (Fordtran et al., 1965; Fordtran et al., 1967; Cobden et al., 1985), utilização de polietilenoglicóis (Chadwick et al., 1977; Irving et al., 1983) e substâncias como EDTA podendo ser marcadas com radioisótopos  $^{51}\text{Cr}$ -ácido etilendiaminotetracético ( $^{51}\text{Cr}$ -EDTA) (Bjarnason & Peters, 1983; Peled et al., 1985) e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - acetato de dietilenotriaminopenta ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - DTPA) têm sido utilizadas como substância teste.

A escolha de um método para a avaliação da permeabilidade intestinal deve ser baseada no conhecimento das propriedades da(s) substância(s) teste a ser utilizada(s), bem como no entendimento das vias de permeação intestinal, além da avaliação dos outros fatores que podem alterar o seu resultado final.

A substância teste ou marcador ideal para a avaliação da permeabilidade intestinal, uma vez ingerida via oral, deve ser atóxica, inerte, não degradada por bactérias intestinais, ser hidrossolúvel e atravessar a barreira intestinal obedecendo à lei de difusão. Deve seguir preferencialmente o padrão de cinética de primeira ordem, não ser metabolizada após sua absorção e facilmente ser recuperada nos fluidos biológicos.

Normalmente para a recuperação da substância teste tem-se utilizado a urina, onde ela deve ser normalmente excretada através da filtração glomerular, portanto sem sofrer secreção ou reabsorção nos túbulos renais.

Finalmente o método escolhido deve ser de fácil execução, ter alta sensibilidade e especificidade e excelente índice de reprodutibilidade.

## **5.2 Substâncias-teste Mais Utilizadas - Vantagens x Desvantagens:**

### **5.2.1 Marcadores únicos**

Monossacarídeos como manitol, ramnose, d-xilose e pequenas moléculas de polietilenoglicóis passam através da membrana dos enterócitos (via transcelular) possivelmente através de pequenos poros semelhantes a canais aquosos (Verkman, 1989), por transcitose (Schaerer et al., 1991), por difusão simples dependendo do grau de solubilidade lipídica da substância teste utilizada e mesmo através da membrana celular rôtta de enterócitos lesados (Mc Neil & Ito, 1989).

Pela via paracelular, que é constituída pelas zônulas de oclusão, espaços intercelulares, áreas de ulcerações ou extrusões conseqüentes à morte celular, passam moléculas maiores como lactulose, celbiose, rafinose, dextran, EDTA, entre outras e também pequenas moléculas como monossacarídeos acima citados.

Marcadores únicos tem a desvantagem de avaliar uma única via de permeação, porisso, dependendo da substância empregada e da patologia estudada, os resultados obtidos podem ser completamente equivocados. Doenças que levam a atrofia vilosa intestinal podem não ser bem avaliadas se o marcador utilizado permear o intestino exclusivamente pela via paracelular, o mesmo pode ocorrer nas situações onde as alterações fisiopatológicas se refletem na regulação das zonas intercelulares e o marcador utilizado for de permeação principalmente pela via transcelular.

### 5.2.2 Polímeros de propililenoglicóis (PEGs)

Os polímeros de PEGs estão disponibilizados em diferentes tamanhos PEG-400, PEG-600, PEG-900, PEG- 1000 e PEG-4000. Entre os testes utilizando propililenoglicóis, um dos mais utilizados é o PEG- 400. Compõe-se de moléculas de tamanhos variados, exibindo semelhança com a lactulose e o EDTA quanto a hidrossolubilidade e tamanho médio molecular, mas assume padrão absortivo semelhante a ramnose e o manitol. Seus resultados são de difícil interpretação, além disso, PEGs necessitam de análises mais complexas para a obtenção de bons resultados, por isso a sua indicação como substância teste para a medida da permeabilidade tem sido cada vez menor (Ma et al., 1990; Gifoni, 1996; Lima, 1998)

### 5.2.3 Radioisótopos

Substâncias radioativas como  $^{14}\text{C}$ ,  $^{51}\text{Cr}$  e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ligados a substâncias como EDTA, DTPA, manitol, lactulose, ramnanose e polímeros de PEGs de tamanhos e pesos moleculares diversos também tem sido utilizados como marcadores (Bjarnason et al., 1983; Blomquist et al., 1993). O  $^{51}\text{Cr}$  –EDTA atende vários requisitos como substância teste ideal, devido a sua estabilidade, por não ser degradado pelas bactérias do intestino, por ser atóxico e biologicamente inerte, além de ficar exclusivamente no espaço extracelular. A análise da permeabilidade pelo Cr –EDTA é considerada fácil. A boa recuperação urinária permite um bom índice de reprodutividade do teste, bem como a sua utilização como discriminador entre pacientes e controles (Jenkins et al., 1987).

A grande desvantagem é por se tratar de material radioativo, e necessitar aparelhagem específica para a sua detecção. Outra desvantagem é a sua excreção urinária ser bastante variável, ter uma vida média de 27 dias e a possibilidade de ser absorvido pelo cólon dificultando a indicação exata do local de alteração da permeabilidade (Bjarnason & Peters, 1983). Medidas de

excreção urinária de Cr-EDTA tem alta sensibilidade e baixa especificidade para avaliação da permeabilidade intestinal (Lifschitz & Shulman, 1990).

#### **5.2.4 Substâncias teste combinadas**

Marcadores da permeabilidade ou da capacidade absorptiva do epitélio intestinal, representam a base farmacológica para o esclarecimento dos fatores possivelmente envolvidos nas diferentes situações, possibilitando vislumbrar as alterações fisiopatológicas e as opções terapêuticas para o controle ou reversão dos distúrbios de absorção intestinal.

Nos últimos anos métodos utilizando substância testes combinadas têm proporcionado um grande avanço no entendimento das alterações da barreira mucosa intestinal, pela possibilidade do estudo simultâneo das diversas vias de permeação intestinal.

Vários tipos de combinação têm sido propostos para a avaliação da permeabilidade intestinal: combinação de duplos açúcares dissacarídeos/monossacarídeos como celobiose/manitol (Cobden et al., 1980), celobiose/ l-ramnose e lactulose /L-ramnanose (Menzies et al., 1979; Bjanason, 1994) e lactulose /manitol ( Ukabam & Cooper, 1984; Andre et al., 1988).

### **5.3 Avaliação da Permeabilidade Intestinal através do Teste da Lactulose-Manitol**

Entre os métodos utilizando substâncias teste combinadas, tem se destacado o estudo da permeabilidade intestinal através dos testes duplos com açúcares, por ser procedimento de simples concepção, fácil execução e promissores por sua alta sensibilidade e especificidade, ficando bem patente a

sua superioridade em relação aos testes simples, que utilizam marcadores únicos.

A lactulose e o manitol têm se consolidado nos últimos anos como substâncias teste preferenciais (Travis & Menzies, 1992; Bao et al., 1996; Barboza Jr. et al., 1999). A permeabilidade intestinal avaliada através do teste da lactulose / manitol, determina a habilidade de dois açúcares de tamanhos moleculares diferentes em atravessar a mucosa intestinal. A lactulose e o manitol são moléculas hidrossolúveis, lipofóbicas, inertes, praticamente desprovidas de afinidade pelo sistema transportador de glicídios da mucosa intestinal, absorvidos quase que exclusivamente por difusão. Não são metabolizadas nem sofrem degradação pelas bactérias presentes no intestino e sendo excretadas e recuperadas praticamente intactos na urina.

A lactulose, um dissacarídeo (peso mol 342 Da) composto de galactose e frutose praticamente não é absorvido através dos enterócitos, sua absorção ocorre principalmente através das junções intercelulares e zonas de extrusão dos espaços intervilosos. Serve como um marcador do transporte paracelular refletindo a integridade da mucosa intestinal. A recuperação urinária desse açúcar, em condições normais é mínima.

O manitol, monossacarídeo de pequeno peso molecular (peso mol 182 Da) é facilmente absorvido através da parte hidrófila da membrana dos enterócitos pelo processo de difusão. Serve como um marcador do transporte transcelular. Em condições normais é recuperado em maiores quantidades na urina.

Na realização do teste, o paciente ingere uma solução contendo os dois açúcares em quantidades pré-determinadas. Durante um período de 5 horas toda a urina é coletada. A taxa de excreção urinária dos dois açúcares recuperados é determinada pela quantificação através de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).

Parâmetros fisiológicos afetam igualmente os valores da fração (Lifschitz & Shulman, 1990). Por esse motivo, em lugar de analisar separadamente os valores do numerador e denominador, a maioria dos autores preferem exprimir o resultado final do teste é expresso como a razão da taxa de excreção urinária de lactulose / taxa de excreção urinária de manitol. Interpretar o aumento ou diminuição da permeabilidade intestinal será função



das variações de situações diversas refletidas nos valores expressos no numerador e denominador.

Acreditando-se que as rotas de absorção destes dois açúcares são diferentes: lactulose (absorção via paracelular, através de passagens nas junções intercelulares) e manitol (absorção transcelular, possivelmente através de pequenos poros no enterócitos) por isso o resultado merece várias interpretações. Se a taxa de excreção urinária do manitol é baixa, é significativo de que a absorção de pequenas moléculas pode estar comprometida e infere-se uma redução da área mucosa absorptiva. Se a taxa de excreção da lactulose está alta é indicativo do aumento da permeabilidade intestinal a grandes moléculas o que pode refletir uma alteração na barreira seletiva intestinal regulado pelas zônulas de oclusão entre as enterócitos ou “*tight junctions*” como são mais conhecidas.

### **5.3.1 Resultados de estudos da permeabilidade intestinal no Ceará, utilizando o teste da lactulose – manitol.**

O teste de permeabilidade intestinal utilizando a relação lactulose / manitol como critério farmacológico e diagnóstico de lesão com déficit absorptivo da mucosa intestinal foi validado por Gifoni (1996). Em pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida, atendidos no Hospital São José-CE, apresentando diarreia crônica, foram constatadas evidentes alterações na permeabilidade intestinal, através do uso de sondas farmacológicas de manitol e lactulose (Gifoni, 1996).

Estudo conduzido por Lima et al. (1997) documentou a disfunção e lesão intestinal em pacientes HIV<sup>+</sup> em Fortaleza-Ceará através do estudo da permeabilidade intestinal, através do teste da lactulose–manitol. Crianças cearenses com doenças diarreicas foram também avaliadas por Barboza et al. (1999) quanto à permeabilidade intestinal, sendo também a registrada disfunção e lesão intestinal nesse grupo de pacientes.

### 5.3 Considerações

Não existe até o momento um padrão ouro entre os métodos empregados para a realização dos testes de permeabilidade intestinal. Tampouco existe um acordo na expressão dos resultados alcançados. Esta ausência de consenso não permite homogeneizar os dados dos trabalhos publicados, impedindo a possibilidade de comparação dos resultados, além disso, obriga a inclusão sistemática de grupos controles para a análise conclusiva das alterações da permeabilidade intestinal nas diversas situações. Por esse motivo torna-se necessário incluir um grupo controle sadio que sirva como referência a fim de estabelecer diferenças comparativas com o grupo de pacientes submetido à investigação.

Entre testes utilizados para o estudo da permeabilidade intestinal, o da lactulose / manitol ou de duplo açúcar (monosacarídeo/ dissacarídeo) cujo resultado se expressa como o quociente da taxa de excreção urinária de cada uma dessas substâncias após ingestão de uma dose oral conhecida foi o escolhido para este estudo. O tempo de coleta para recuperação urinária dos açúcares tem sido estabelecido em 5 horas, embora Akram et al. (1998) tenha demonstrado que o quociente de excreção não varia significativamente se a coleta total for feita em apenas 2 horas, o que facilitaria a execução do teste.

Cox et al. (1999) advogam ainda a possibilidade de determinação desse quociente através da dosagem da concentração sérica das duas substâncias após 1 hora da administração oral. Essa modificação evitaria a coleta da urina que em alguns casos é fator complicador do teste. Em nosso estudo um paciente foi excluído por não conseguir fornecer urina para análise.

O resultado do teste lactulose / manitol, pode sofrer a interferência de vários fatores inclusive a osmolaridade da solução teste empregada. É possível a indução de aumento de permeabilidade intestinal a lactulose em indivíduos sadios quando a osmolaridade da solução utilizada ultrapassa 1.500 mOsm/L. A

permeabilidade de uma solução isoosmolar pode aumentar 1,5 a 2,8 vezes caso sua osmolaridade alcance 1.500 a 2.300 mOsm/L respectivamente. Esse fato não tem sido referido em relação ao manitol cuja permeabilidade continua inalterada mesmo frente a soluções com osmolaridade ainda maior. Alterações da permeabilidade intestinal em voluntários sadios podem ocorrer dentro das primeiras 12 horas após a ingestão de dose única de AINEs do tipo ibuprofeno, indometacina ou naproxeno voltando aos valores normais entre 1 e 4 dias (Bjanarson et al., 1986).

Fatores constitucionais como sexo e idade não parecem ser variáveis de importância para alterações da permeabilidade intestinal, contudo devem ser melhor explorados. A excreção urinária de lactulose e de manitol parece diminuir a partir dos 75 anos sem interferir na relação L/M (Sawiers et al., 1985; Saltzman et al., 1995).

No presente estudo consideramos o teste de lactulose / manitol alterado no grupo de pacientes com tuberculose pulmonar. Observamos uma redução significativa na taxa de excreção urinária do manitol e um aumento também significativo na taxa de excreção da lactulose. Esses resultados sugerem uma intensa redução na área de absorção associado à lesão da mucosa intestinal nos pacientes tuberculosos em comparação aos controles sadios. O quociente da relação L/M embora aumentado nos doentes, não variou de forma significativa nos dois grupos estudados.

Vários fatores poderiam explicar as alterações observadas. Excluiríamos inicialmente os acima mencionados: alterações de osmolaridade da solução teste utilizada por ter sido preparada artesanalmente com todo o rigor, utilizando o mesmo laboratório, mesmo técnico e mesmo procedimento, acondicionada de mesma forma e dada aos diferentes grupos pelo mesmo investigador. Embora a literatura sobre o assunto não valorize o sexo e a idade no estudo da permeabilidade intestinal, os dois grupos foram pareados quanto a essas duas variáveis.

Os íons e solutos podem atravessar o epitélio intestinal através de dois mecanismos de transporte: um ativo através da célula onde se requer

consumo de energia e outro passivo por difusão ou por convecção. O transporte passivo pode ocorrer por via transcelular, (atravessando a célula) ou por via paracelular (através dos canais intercelulares). As características específicas das uniões intercelulares determinam o fluxo através da via paracelular. O conceito de permeabilidade intestinal se relaciona com esse transporte passivo, por isso diferencia-se da função de absorção de água e nutrientes que necessita do consumo de energia. A difusão passiva de uma substância é determinada por vários fatores que dependem então da estrutura, área, espessura, porosidade e composição da membrana; das propriedades físico-química dos solutos (tamanho molecular, forma, carga e solubilidade e sua interação com o meio (composição do solvente)).

Atualmente existem duas teorias tentando explicar a passagem das diversas substâncias através da barreira intestinal (Pascual et al., 2001). A primeira já comentada defende a existência de duas vias anatômicas, a transcelular, através do enterócito e a paracelular, através de canais intercelulares.

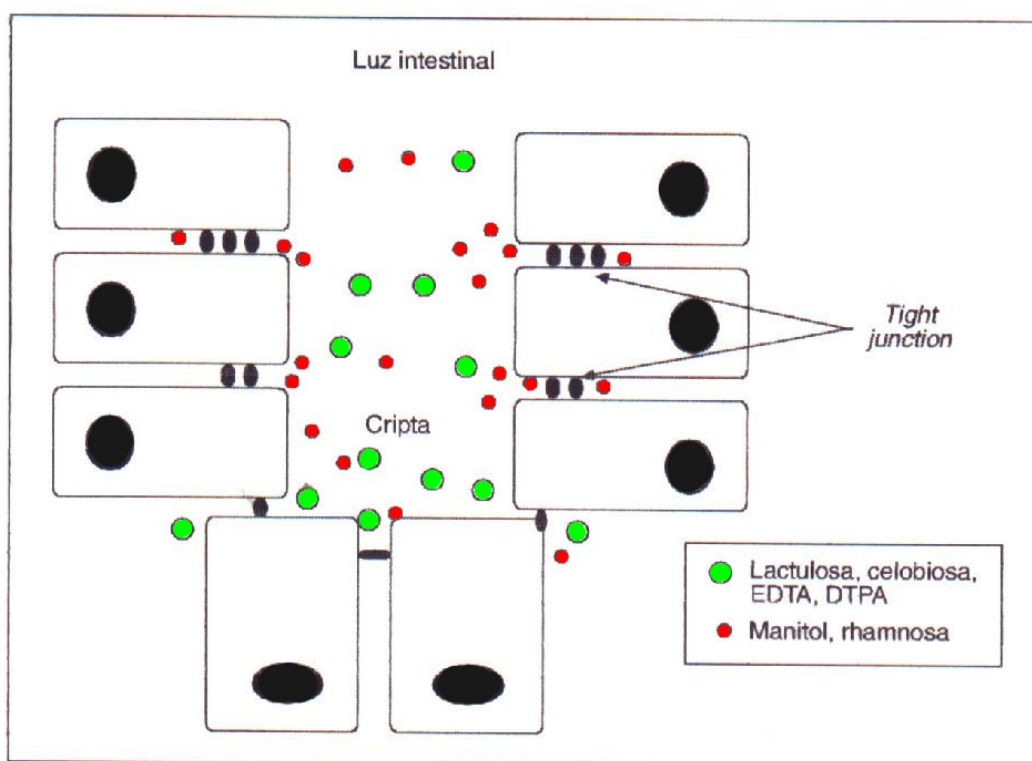
Essa hipótese sugere que a existência de passagens de tamanhos variados que permitiriam a travessia de substâncias em função de seu diâmetro. A via transcelular estaria constituída por uma abundante sucessão de poros de pequeno diâmetro (0.4-0.7nm) na membrana celular e outros de maior diâmetro (cerca de 6.5 nm) dispostos de forma mais esparsa. A passagem de substâncias pela via paracelular ocorreria pelos canais entre os enterócitos através das zônulas de oclusão ou "*Tight Junctions*" (TJ) existentes, as quais permitiriam a passagem de macromoléculas. O controle funcional dessas TJ dependeria de proteínas de sua própria estrutura.

Tem sido descrita uma heterogeneidade morfológica e funcional entre as TJ situadas nas vilosidades e as TJ das criptas. As TJ das criptas são mais delgadas, portanto mais permeáveis enquanto que as TJ das vilosidades são mais espessas e menos permeáveis. Desta forma a permeabilidade das TJ é menor nas porções mais superiores das vilosidades que ficam em contato com a luz intestinal e vai aumentando à medida que vai chegando ao fundo da cripta. A impossibilidade de provar a existência dos poros imaginados e a comprovada

diferença na estrutura morfológica e funcional das TJ de localizações distintas fez surgir outra explicação para a permeabilidade intestinal (Pascual et al., 2001).

A mais recente teoria sustenta a hipótese de que a permeabilidade depende exclusivamente das TJ e refuta completamente a existência de poros na membrana celular dos enterócitos.

Assim, as moléculas de pequeno tamanho como o manitol, poderiam atravessar a barreira intestinal por qualquer TJ, porém as de maior tamanho como a lactulose somente atravessaria a barreira através das TJ do fundo das criptas, que por terem menos contato com a luz intestinal são zonas de menor acessibilidade.



**Figura 13.** Representação esquemática de uma cripta intestinal onde se observam diferenças na espessura das “*Tight Junctions*” (TJ) das vilosidades e no fundo da cripta e a diferença entre a permeabilidade intestinal entre as diversas substâncias (S. Pascual, 2001)

No teste de lactulose / manitol estamos avaliando a integridade da estrutura e o funcionamento da barreira intestinal. A redução da excreção urinária do manitol no grupo de pacientes com tuberculose reflete a ocorrência de uma grande redução da área das vilosidades intestinais o que reduziu a difusão do manitol e conseqüentemente a sua recuperação urinária. O aumento da excreção da lactulose nos pacientes tuberculosos pode ser interpretado como um aumento da permeabilidade das TJ possivelmente do fundo das criptas das vilosidades intestinais ou mesmo ruptura dessas estruturas de permeação.

As alterações observadas na permeabilidade intestinal poderiam ser explicadas como manifestações intestinais da repercussão sistêmica da tuberculose pulmonar ou seria devido não à tuberculose, mas sim a algum fator associado isolado ou múltiplo? Ou as alterações observadas seriam a tradução de uma conjunção de fatores ligados ou não à tuberculose? São questões difíceis de responder. Não é pretensão desse trabalho adentrar nas minúcias anatômicas do intestino, e muito menos no intrincado quebra cabeça da fisiopatologia. Porém os dados estão postos e permitem uma série de suposições na sua discussão.

A tuberculose poderia ser relacionada como causa de alteração da permeabilidade intestinal?

O epitélio intestinal além de sua função absorptiva e de barreira, é indiscutivelmente uma extensão do sistema imune. A Ig A produzida em quantidades abundantes nesse sítio representa o principal mecanismo de prevenção da aderência bacteriana. A Ig A secretória liga-se a bactérias na luz intestinal impedindo a aderência dos patógenos na parede intestinal. Uma diminuição da Ig A secretória resulta em incremento na aderência bacteriana aumentada, aumento da permeabilidade intestinal podendo ocorrer translocação bacteriana através da parede intestinal (Stechmiller et al., 1997)

Outro mecanismo pelo qual a permeabilidade intestinal pode estar alterada no decorrer de estados inflamatórios diz respeito diretamente as TJ. As citocinas inflamatórias liberadas em diferentes patologias inflamatórias, por

mecanismos autócrinos ou parácrinos atraem polimorfonucleares que podem mecanicamente alterar as TJ, de forma a permitir a sua passagem da corrente circulatória para a luz do intestino (Madara, 1990).

Tem sido discutido também o papel do óxido nítrico (NO) nos mecanismos de lesão intestinal e na regulação da permeabilidade intestinal. O óxido nítrico tem sido relacionado com o relaxamento dos esfínteres, com a mobilidade intestinal e com a regulação do fluxo sanguíneo intestinal. Nos trabalhos tem sugerido que nas lesões do epitélio intestinal ocorra uma maior liberação de NO como um mecanismo de proteção. Payne & Kubes (1993) e Schleiffer & Raul (1996) demonstraram a redução da permeabilidade intestinal após a administração de L-arginina (doador de NO) em animais submetidos à isquemia e a lesão de reperfusão intestinal e piora da lesão com conseqüente aumento da permeabilidade intestinal em animais onde foi dado inibidor de NO. Entretanto é sabido que o excesso de NO é potencialmente patogênico.

No presente estudo, foi feita a detecção de lactoferrina nas fezes, indicativo da presença de polimorfonucleares na mucosa intestinal em 20% dos pacientes. A lactoferrina é uma enzima existente dentro de leucócitos, os quais durante um processo inflamatório podem ser lisados liberando o seu conteúdo de lactoferrina. A lactoferrina, portanto, é um marcador para leucócitos fecais, que podem estar intactos ou não. Além disso, quantidades detectáveis de IL-1 e IL-8 foram observadas respectivamente em 18 (45%) e em 6 (15%) pacientes sugerindo a existência de processo inflamatório na mucosa intestinal no grupo de pacientes com tuberculose pulmonar. Outro dado de interesse foi a detecção sérica de IL-1, citocina inflamatória, em 35 (87%) dos pacientes estudados aumentando as evidências indicativas do processo inflamatório sistêmico e intestinal.

Esperávamos encontrar um alto percentual de parasitoses nesse grupo, inclusive para justificar como causa do processo inflamatório, porém a pesquisa de ovos e parasitas, feita pelo método direto e pelo concentrado revelou um percentual muito baixo de infestação, apenas 10%. A pesquisa de *Cryptosporidium* nas fezes resultou negativa em todos os pacientes e a pesquisa de sangue oculto também.

Além disso, em estudos sobre a relação de parasitoses intestinais com alterações de permeabilidade intestinal, Raj et al. (1996) avaliando a permeabilidade intestinal (PI) através do teste L/M um grupo de 106 escolares infestados comparando com crianças não infestadas, não observou diferença significativa. E ainda, que o tratamento não produziu variação de importância nos valores da PI, demonstrando assim que helmintos exercem somente um efeito marginal nas alterações da permeabilidade intestinal.

A análise dos parâmetros inflamatórios intestinais nos pacientes tuberculosos estudados, portanto sinalizam para a existência de processo inflamatório intestinal sem entretanto ter qualquer associação significativa com a presença de parasitoses. Reforça-se então a pergunta: A tuberculose pulmonar conhecida indutora de elevação de citocinas poderia atuar através de mecanismos parácrinos como causa de alteração da permeabilidade intestinal?

Tentando responder a essa questão, alguns autores propõem que as citocinas inflamatórias liberadas nos processos infecciosos como a tuberculose, possam ter um efeito lesivo direto na mucosa intestinal destruindo as microvilosidades, alterando a permeabilidade intestinal, repercutindo na absorção intestinal (Mehta et al., 2001)

As alterações observadas poderiam ser devidas a desnutrição, que foi achado freqüente no grupo estudado? Os estudos relacionando a desnutrição com modificações na barreira intestinal inicialmente não identificavam alterações na permeabilidade intestinal (Elia et al., 1987). Mais recentemente vários autores têm descrito aumentos da PI em desnutridos avaliados através do teste L/M (Brewster et al., 1997; Welsh et al., 1998a).

Os estudos de Van der Hulst et al. (1998) mostram com clareza que a desnutrição tem um efeito dramático sobre a estrutura da mucosa intestinal. A atrofia mucosa induzida pela desnutrição diminui a altura das vilosidades intestinais, reduz a profundidade das criptas intervilosas, altera a permeabilidade intestinal e reduz intensamente a área de absorção intestinal de nutrientes.



Alterações na morfologia do epitélio intestinal são vistas com frequência (Van der Hulst et al., 1998), mas não de forma categórica em pacientes desnutridos. Esta talvez seja uma das razões da observação de dados sobre a PI aparentemente contraditórios.

Outro fator complicador que deve ser considerado é a dificuldade na definição de pacientes quanto ao estado nutricional. Isso se deve ao fato de que não existe um único parâmetro de avaliação nutricional capaz de traduzir de forma adequada as alterações do estado nutricional. Por esse motivo em muitos trabalhos, torna-se necessário avaliar um conjunto de medidas antropométricas e testes laboratoriais para a sua aferição. Por outro lado os limites de normalidade para a interpretação dos testes objetivos sofrem variação de acordo com a raça, faixa etária, sexo, hábitos alimentares entre outras variáveis. Estudos comparativos entre os diversos testes mostram geralmente uma baixíssima concordância.

Uma dificuldade inicial desse estudo foi a escolha do parâmetro a ser utilizado na avaliação nutricional, por esse motivo inicialmente decidimos utilizar vários parâmetros e apreciar a concordância entre eles. Assim utilizamos o índice de massa corpórea (IMC) em  $\text{Kg/m}^2$  ; a circunferência média braquial (CMB) em cm ; a avaliação global subjetiva (questionário validado) ; a dosagem de albumina em g/dL, a dosagem de hemoglobina em g/dL e a contagem de linfócitos totais por  $\text{mm}^3$  como instrumentos de avaliação.

A concordância entre eles foi considerada como moderada ( $0,4 \leq \kappa < 0,8$ ). A melhor concordância em torno de 70% foi entre IMC e CMB. Verificando essa grande variação, optamos por utilizar um único parâmetro, o IMC, mesmo cientes da limitação de nossa escolha.

Em nosso estudo observamos um alto percentual (58.5%) de pacientes tuberculosos considerados desnutridos pelo índice de massa corpórea (IMC), sendo 22% destes incluídos no grupo dos severamente desnutridos. Esses dados são semelhantes aos dados da Literatura.

O peso médio do grupo foi igual a 47,49 kg. Esse valor reflete o comprometimento do estado nutricional dos pacientes na época em que o

estudo foi feito. A estatura média de uma população, entretanto, resulta de uma conjunção de valores genéticos, raciais entre outros. A altura média tem sido utilizada também como reflexo da cronicidade do estado de subnutrição, principalmente na primeira infância que uma determinada população nordestina está submetida.

Em nosso estudo, os pacientes masculinos tiveram média de estatura igual a 1,63 m e nas pacientes do sexo feminino a estatura média foi aferida em 1,52 m. Os valores encontrados são bastante reduzidos em relação aos valores antropométricos da população do sudeste (homens, 172 cm – mulheres, 161cm) e mesmo em relação à população nordestina (homens, 167 cm – mulheres, 155 cm) confoRe a descrição do IBGE no último censo (IBGE, 1997).

O estado de miséria e fome crônica da população nordestina deve ser motivo de preocupação em sua relação com a tuberculose, tanto pelo risco aumentado de infecção quanto no de adoecimento. As alterações crônicas que a subnutrição possa determinar no organismo dos pacientes acometidos, particularmente as repercussões intestinais e as alterações imunológicas, não têm sido valorizadas nos Programas de Controle da Tuberculose. O bom prognóstico vem atrelado a eficácia da medicação e à eficiência do programa. Esperamos com este trabalho, chamar a atenção para este aspecto do problema.

A redução da taxa de excreção urinária do manitol no grupo de pacientes com tuberculose comparada à do grupo controle é consistente com hipótese de ocorrência de intensa restrição na área absorptiva intestinal devido provavelmente à redução ou achatamento das vilosidades intestinais. É lógico imaginar a desnutrição como uma das causas dessas possíveis alterações na morfologia intestinal. Nosso estudo, entretanto, não teve poder para estabelecer qualquer relação associativa entre a distribuição dos pacientes de acordo com o grau de nutrição e os valores de excreção urinária de manitol.

O uso de álcool no grupo estudado é outro fator a ser considerado como causa de alteração da permeabilidade intestinal.

Os estudos de Keshavarzian et al. (1994) sobre a excreção urinária de lactulose e manitol, mostram resultados diferentes na intoxicação alcoólica aguda e no etilismo crônico. Segundo esses autores não foram encontradas alterações significativas na excreção urinária de lactulose e manitol após doses intravenosas e orais de etanol em pacientes não alcoólatras. Entretanto, em etilistas crônicos a razão lactulose / manitol aumentou quando comparados a voluntários sadios, devido a menor absorção do manitol. Esses parâmetros voltaram a normalidade após um período de abstinência entre 7 a 14 dias.

O mecanismo pelo qual o álcool altera a permeabilidade intestinal não está esclarecido. Ma et al. (1999) demonstraram que o etanol em dose menores que 10% produziu uma quebra progressiva da proteína ZO-1, com consequente separação das junções celulares e formação de “*gaps*” entre as células epiteliais e como consequência foi observado um aumento da permeabilidade intestinal via paracelular.

As informações sobre etilismo crônico são em sua maioria subjetivas e de difícil aferição. Mas a frequência de sua associação com tuberculose está bem estabelecida, além disso, o etilismo crônico pode dar lugar a uma série de alterações no tubo digestivo, algumas das quais tendo consequência a mal-absorção de nutrientes como a tiamina, o ácido fólico, a vitamina B<sub>12</sub> e o ferro entre outros. Como resultado quase sempre observamos anemia e desnutrição em pacientes alcoólatras.

Consideramos elevado o percentual de uso de álcool em nossos pacientes (78,4%). Esse valor poderia ser contestado devido a sua imprecisão, contudo, alguns dados indiretos corroboram essa informação. Observamos que 65,6% dos pacientes que informaram que fazem ou fizeram uso de álcool foi considerado desnutrido enquanto que a desnutrição no grupo de pacientes (9) que nunca fizeram uso de bebida alcoólica foi praticamente à metade, ou seja, apenas 33,3%.

Além disso, chamou bastante a atenção o alto percentual (85,4%) de alterações nas hemácias dos pacientes com tuberculose. As alterações foram observadas na cor, no tamanho e na forma, refletindo possivelmente nesses

pacientes, a mal-absorção crônica de nutrientes específicos para o sistema hematológico. A mal-absorção de drogas pode ocorrer de forma semelhante a mal-absorção de micronutrientes, pois segue praticamente a mesma cinética.

Consideramos instigante e preocupante o resultado dos níveis séricos da rifampicina e da isoniazida encontrados. Observamos que as concentrações séricas 2 horas da rifampicina (CR2h) e concentrações séricas 2 horas da isoniazida (CH2h) em 16/18 (88.8%) pacientes não atingiram níveis séricos adequados em 88,8% (16/18) dos pacientes. Considerando os níveis terapêuticos da R (8-24 mcg/mL) e da H (3-6 mcg/mL) no grupo de pacientes selecionados para avaliação da biodisponibilidade das drogas antituberculose, o nível sérico da R e da H estavam reduzidos em 66,7% e 72,2% dos pacientes respectivamente e 44.4% pacientes não alcançaram níveis séricos para ambas as drogas simultaneamente.

Uma possível explicação para a redução dos níveis séricos da rifampicina e da isoniazida seria a baixa qualidade da droga utilizada.

A certificação da boa qualidade das drogas antituberculose utilizadas nesse estudo foi feita pelo NUPLAN (Laboratório produtor) e merece algumas considerações. É sempre questionável quando o atestado de qualidade procede do próprio fabricante. A certificação deveria ter sido feita por um laboratório independente, conforme orientação da International Union Against Tuberculosis and Lung Disease e a Organização Mundial de Saúde (IUATLD/ OMS, 1999).

Considerando que a qualidade da droga produzida estava de fato dentro dos padrões exigidos, outros fatores relativos às drogas merecem aqui ser discutidos antes que possamos imputar à mal-absorção intestinal os resultados dos níveis séricos observados. Sabe-se que se as condições de umidade e/ou de temperatura não forem mantidas abaixo de um limite crítico, durante a manufatura ou a estocagem do produto, a estrutura de cristais de rifampicina pode ser alterada, comprometendo a absorção intestinal e a biodisponibilidade (Pelizza et al., 1977). Variações no tamanho dos cristais da rifampicina são capazes de alterar a absorção intestinal da droga.

Quanto a isso não temos notícia de preocupação das farmácias públicas de dispensação de fármacos relativa a controle de temperatura e

umidade para estocagem de medicamentos, portanto alterações estruturais, particularmente da rifampicina podem de fato ocorrer.

Vários trabalhos chamam a atenção de que, embora o teste de dissolução da droga, possa ser utilizado como guia para assegurar a biodisponibilidade, formulações com boa dissolução, algumas vezes são pouco absorvidas ou vice versa (Pelizza et al., 1977; Buniva et al., 1983; Acocella, 1989; Aspesi, 1989).

Portanto a certificação da droga não é absolutamente garantia de boa absorção e conseqüentemente de níveis séricos adequados. O método mais seguro para avaliação da concentração plasmática das drogas é através da análise por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).

A pergunta que se impõe logo a seguir seria a validade da observação do nível sérico em uma única amostra coletada 2 horas após a ingestão da droga, já que embora a Literatura seja unânime em estabelecer que o T<sub>max</sub> tanto para a rifampicina quanto para a isoniazida ocorra em 2 horas (Mehta et al., 2001), a C<sub>max</sub> pode ocorrer após esse período principalmente nos pacientes com padrões alterados de absorção intestinal. A dosagem de 2 horas poderia detectar essa alteração, mas não seria capaz de distinguir entre absorção retardada e mal-absorção (Peloquin et al., 1999).

Os dados da Literatura até então disponíveis sugerem que é improvável que a C<sub>max</sub> dentro da faixa terapêutica esperada possa ocorrer após 6 horas da tomada da dose. Portanto é lógico supor que níveis séricos reduzidos as 2 e 6 horas pós-dose possam ser indicativos de mal-absorção. A análise de amostras coletadas as 2 e as 6 horas após a tomada das drogas portanto poderia ser mais informativa esclarecendo talvez essa questão, mas a dosagem única 2h não invalida a análise que pretendemos fazer.

Como estávamos lidando com pacientes já em uso de medicação, temíamos a existência de uma concentração residual somando-se aos valores encontrados. Os estudos de Peloquin (1997) demonstram que mesmo com doses diárias, sete meias-vida ocorrem entre as doses, de forma que mais de 99% da droga é eliminada dentro de 24 horas, exceto em pacientes com insuficiência hepática, o que não era o caso de nenhum dos tuberculosos examinados. Níveis residuais caso presentes iriam falsear para maior o resultado encontrado.

Mehta et al. (2001) lembram que pacientes com tuberculose pulmonar são freqüentemente desnutridos e com hipoalbuminemia. A diminuição das proteínas do plasma reduz a capacidade de ligação das drogas, conseqüentemente aumenta o clearance renal e reduz a biodisponibilidade. Observamos em nosso estudo que 42,5% dos pacientes apresentavam dosagem sérica de albumina abaixo de 3,5g/dl, entretanto esse dado não é suficiente para explicar a importante redução da biodisponibilidade das drogas.

Temos que considerar então que os baixos níveis séricos das drogas observados podem estar relacionados com mal-absorção intestinal baseado nas alterações da permeabilidade Intestinal observadas. No presente estudo, contudo, a comparação em nível de inferência estatística entre os valores das concentrações sérica da rifampicina em níveis terapêuticos ou abaixo dele para as variáveis manitol, lactulose e lactulose / manitol não foi possível ser feita devido ao pequeno número de pacientes em cada classe (nível terapêutico = um paciente e sub terapêutico = 6 pacientes).

Segundo os dados observados, não foi evidenciada diferença significativa, entre a concentração sérica da rifampicina em níveis terapêuticos ou abaixo dele para as variáveis manitol ( $p=0,5741$ ), lactulose ( $p=0,1359$ ) e lactulose / manitol ( $p=0,1101$ ) considerando-se o nível de significância estatística de 5%.

As mesmas limitações ocorreram na análise de inferência estatística entre a concentração sérica da isoniazida em níveis terapêuticos ou abaixo dele e os parâmetros de avaliação da permeabilidade intestinal. Foi muito pequeno o número de pacientes de cada classe (nível terapêutico = dois pacientes e sub terapêutica = 5 pacientes). Da mesma forma, de acordo com os dados observados, não foi evidenciada diferença significativa, entre a concentração sérica da isoniazida em níveis terapêuticos ou abaixo dele para as variáveis manitol ( $p=0,5877$ ), lactulose ( $p=0,8664$ ) e lactulose / manitol ( $p=0,9553$ ) considerando-se o nível de significância estatística de 5%.

Os dados obtidos mostrando a redução na biodisponibilidade de rifampicina e isoniazida e as alterações na permeabilidade intestinal são consistentes com mal-absorção intestinal, com o comprometimento do estado nutricional, com o alto percentual de alcoolismo observados no grupo de pacientes estudados.

Comentários não podem deixar de ser feitos sobre a relação de níveis subterapêuticos de drogas antituberculose e surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes embora o desenho do presente estudo não permita avaliar essa associação e nem protocolos dessa natureza seriam permitidos pelos comitês de ética em pesquisa com seres humanos.

Em relação aos testes de sensibilidade às drogas antituberculose, existia até 1994 uma grande discrepância nos resultados fornecidos pelos diversos laboratórios das diferentes partes do mundo. As diferentes capacidades estruturais dos laboratórios, a variedade das técnicas utilizadas com sensibilidade e especificidade altamente variáveis, acrescidas das variações regionais da prevalência da resistência nos países e mesmo em áreas setoriais de um mesmo país, fomentavam a enorme confusão sobre os dados (Rosemberg, 1999).

O crescimento da resistência do *M. tuberculosis* às drogas, constatado em vários países e o desconhecimento a nível internacional da real magnitude da resistência do bacilo de Koch às drogas utilizadas nos programas de tratamento da tuberculose em todo o mundo, motivaram a Organização Mundial de Saúde (OMS) juntamente com a União Internacional contra a Tuberculose e Doenças Respiratórias (UICTER) a instituir em 1994, o “Projeto Global de Vigilância da Resistência às Drogas Antituberculose (WHO-UICTER, 1994 - 1997). Nesse projeto, os testes de sensibilidade foram padronizados através de quatro métodos: Concentração absoluta, “*Ratio*” de resistência, Método das proporções e Método radiométrico (pelo sistema BACTEC 460).

Em nosso trabalho os testes de sensibilidade foram feitos pelo Método das proporções (Canetti, Rist & Grosset, 1963; Canetti et al., 1969), método convencional escolhido porque apesar de ter resultado mais demorado, era de pleno domínio dos técnicos do LACEN, além disso, é o método mais difundido no Brasil (Rosemberg, 1999)

Em nosso estudo, não se esperava riqueza de bacilos no exame direto do escarro, pois era critério de inclusão, o uso de medicamentos antituberculose, daí a opção pelo teste indireto do método das proporções (semeadura em 2 etapas, a segunda em cultura com e sem a adição da droga, após cerca de 30 dias, compara-se o número de colônias dos dois meios, estabelecendo-se a proporção entre eles) para a realização do teste de

sensibilidade às drogas, ainda assim, observamos 50% (20/40) dos pacientes com cultura positiva para o *M. tuberculosis*.

O perfil de resistência bacilar às drogas antituberculose (20% MDR-TB e 10% de monorresistência a H) encontrado no grupo de pacientes estudados poderia ser considerado alto, em relação a dados de prevalência da resistência no Ceará, porém as amostras não são comparáveis, trata-se de uma população selecionada.

No Projeto o Global de Vigilância da Resistência às Drogas Antituberculose onde o Ceará teve participação, Campelo (1999) e Barroso et al. (2001) encontraram 03 (0,6%) pacientes com (MDR-TB primária) em 506 pacientes sem história de tratamento anterior, e de amostras de 122 pacientes anteriormente tratados, foram encontrados 04 (3,3%) pacientes TBMR adquirida.

Ainda nesse projeto os dados revelam que no Brasil as taxas de resistência primária estão em: 5,9% para isoniazida; 1,1% para rifampicina; 0,1% para etambutol e 3,6% para estreptomicina. Quanto à resistência adquirida observou-se as taxas de 11,2% para isoniazida; 6,1% para rifampicina; 0,3% para etambutol e 5,4% para estreptomicina (WHO/UILATD, 1994)

A tipagem molecular analisando os dados das preparações de DNA extraídos de cultura de *M. tuberculosis* obtidos de amostras clínicas dos pacientes através da técnica IS6110- RFLP, mostraram a presença de dois clones entre pacientes sem correlação epidemiológica conhecida. Não foi possível obter dados sobre possíveis contaminações ou fontes de transmissão.

A manutenção da concentração de drogas antituberculose dentro da faixa terapêutica é condição fundamental na prevenção da resistência do *M tuberculosis* as drogas. Os resultados verificados no grupo de pacientes estudado recomendam o delineamento de estudos adicionais das alterações morfo-funcionais da barreira intestinal em pacientes com tuberculose e em diversas situações clínicas associadas à doença bem a completa avaliação da biodisponibilidade das drogas antimicobacterianas.



## **6. CONCLUSÕES**

## CONCLUSÕES

1- Foram constatadas evidentes alterações na permeabilidade intestinal em pacientes com tuberculose pulmonar ativa, avaliados através do teste de lactulose / manitol no Hospital de Maracanaú. Os resultados observados sugerem uma intensa redução na área de absorção e lesão da mucosa intestinal nos indivíduos estudados.

2- A detecção de lactoferrina e de citocinas inflamatórias, IL-1 e IL-8 nas fezes sinalizam para a existência de processo inflamatório intestinal no grupo de pacientes estudados sem entretanto, ter qualquer associação significativa com a presença de parasitoses.

O comprometimento do estado nutricional e o alcoolismo foram observações freqüentes, o que provavelmente contribui para a instalação das alterações intestinais. Foi considerado baixo o percentual de infestação parasitária no grupo de pacientes estudados.

3- Observou-se redução na biodisponibilidade das drogas antituberculose inferida através da concentração sérica 2-horas da rifampicina e isoniazida.

4- Foi considerado alto o percentual de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas antituberculose em cultura de escarro entre os pacientes estudados. Não foi possível fazer associações entre o perfil de sensibilidade das amostras bacilares com os níveis séricos das drogas antituberculose.

Os dados das preparações de DNA extraídos de cultura de amostras clínicas de pacientes, analisados através da técnica do RFLP, mostraram o polimorfismo das cepas e a presença de dois clones entre pacientes sem correlação epidemiológica aparente.

## **7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ACOCELLA, G. Human bioavailability studies. **Bull. Int. Union Tuberc. Lung Dis.**, v. 64, n. 1, p. 38-42, 1989.

ACOCELLA, G.; NONIS, A.; GIALDARONI-GRASSI, C.; GRASSI, C. Comparative bioavailability of isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide administered in free combination and in a fixed triple formulation designed for daily use in antituberculosis chemotherapy. I. Single dose study. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 138, p. 882-885, 1988a.

ACOCELLA, G.; NONIS, A.; PERNA, G.; PATANE, E.; GIALDARONI-GRASSI, C.; GRASSI, C. Comparative bioavailability of isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide administered in free combination and in a fixed triple formulation designed for daily use in antituberculosis chemotherapy. II Two month, daily administration study. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 138, p. 886-890, 1988 b.

ADDINGTON, W. W. Patient compliance: the most serious remains problem in control of tuberculosis in the U.S. **Chest**,; v. 76, p. 741-743, 1979. Supplemento

ADENIS, A.; COLOMEL, J. F.; LECOUFFE, P. et al. Increased pulmonary and intestinal permeability Crohn's disease. **Gut**, v. 33, p. 678-82, 1992.

ADVENIR, C.; GOBERT, C.; HOUIN, G. E. et al. Pharmacokinetic studies of rifampicin in the elderly. **Ther. Drug Monit.**, v. 5, p. 61-65, 1983.

AKRAM, S.; MOURANI, S. ; OU, C-N.; ROGNERUD, C. ; SAQID, R.; GOODGAME, R. W. Assesment of intestinal permeability with two-hour urine colletion. **Dig. Dis. Sci.**, v. 43, p. 1946-1950, 1998.

ANDRE, F.; ANDRE, C.; EMMERY, Y et al. Assesment of the lactulose – mannitol test in Chron's disease. **Gut**, v. 29, p. 511-515, 1988.

ASPESI, F. Dissolution testing. **Bull. Int. Union Tubercul. Lung Dis.**, v. 64, p. 37-38, 1989.

BAO, Y.; SILVA T. M. J.; GUERRANT R. L.; LIMA, A. A. M.; FOX, J. W. : Direct analyses of mannitol, lactulose and glucose in urine samples by high-perfomance anion-exchange chromatography with pulse amperometric detection. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v. 685, p. 105-112, 1996.

BARAKAT, M. T.; SCOTT, J.; HUGHES, J. M.; WALPORT, M.; CALAM, J.; FRIEDLAND, J. S. et al. Grand rounds-Hassersmith Hospital. Persistent fever in pulmonary tuberculosis (clinical conference). **B.M.J.**, v. 313, p. 1543-5, 1996.

BARBOZA Jr M. S.; SILVA T. M. J.; GUERRANT R. L.; LIMA, A. A. M. . Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases . **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 12 , p. 1499- 1504, 1999.

BARNES, P. F.; GRISSE, J. S.; ABRAMS, H. et al. Gama delta T limphocytes in human tuberculosis. **J. Infect. Dis.**, v. 165, n. 3, p. 506-512, 1992.

BARNES, P. F. The influence of epidemiologic factors on drug resistance rates in tuberculosis. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 136, p.325-328, 1987.

BARROSO, E. C.; RODRIGUES, J. L. N.; PINHEIRO, V. G. F.; CAMPELO, C. L. Prevalência da tuberculose multirresistente no Estado do Ceará, 1990-1999. **J. Pneumol.**, v. 27, n. 6, p. 310 -314, nov./dez. 2001.

BENARD, A.; DESREUMEAUX, P.; HUGLO, D.; HOORELBEKE, A.; TONNEL A. B; WALLAERT, B. Increased intestinal permeability in bronchial asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, n. 6, jun. 1996.

BERUDEZ, L. E. M. ; YOUNG, L. S. & GUPTA S. 1,25-dihydroxyvitamin D3-dependent inhibition of growth or killing of *M. avium* complex in human macrophages is mediated by TNF and GM-CSF. **Cell. Immunol.**, v. 127, p. 432-441, 1990.

BERNING, S. E.; HUITT, G. A; ISELMAN, M. D, et al. Malabsorption of antituberculosis medications by a patient with AIDS. **N. Engl. J. Med.**, v. 327, p. 1817-1818, 1992.

BJARNASON, I.; MacPHERSON, A.; HOLLANDER, D. IP an overview. **Gastroenterology**, v. 108, p. 1566-1581, 1995.

BJARNASON, I. Intestinal permeability. *Gut*, v. 35, p. S18-22, jan. 1994. Suplemento 1.

BJARNASON, I. ; WILLIAMS, P. ; SMETHURST, P.; PETERS , T. J. ; LAE, A J. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandin on the permeability of the human small intestine . **Gut**, v. 27, p. 1292-1297, 1986.

BJARNASON, I.; WARD, K.; PETERS, T. J. The leaky gut of alcoholism : possible route of entry for toxic compounds. **Lancet**, 8370, p.179-182, 1984.

BJARNASON, I. & PETERS, T. J. A persistent defect in intestinal permeability in coeliac disease demonstrated by a <sup>51</sup>Cr-labelled EDTA absorption test. **Lancet**, v. 1, p. 323-325, 1983.

BJARNASON, I.; O' MORAIN, C.; LEVI, A. J.; PETERS, T. J. Absorption of <sup>51</sup>chromium-labelled ethylenediaminetetraacetate in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 85, p. 318-22, 1983.

BLACKBURN, G. I.; BISTRIAN, B. R.; MAIMI, B. S. et al Nutrition and metabolic assessment of the hospitalized patient. **J. Parent. Ent. Nutr.**, v. 1, p. 11-22, 1977.

BLOMBERG, B.; SPINACI, S.; FOURIE, B., et al. The rationale for recommending fixed-dose combination tablets for treatment of tuberculosis. **Bull. World Health Organ.**, v. 79, p. 61-68, 2001.

BLOMQUIST, L.; BARK, T.; HEDENBORG, G. et al. Comparison between the lactulose/mannitol and <sup>51</sup>Cr-EDTA/ <sup>14</sup>C-mannitol methods for intestinal permeability. Frequency distribution pattern and variability of markers and marker ratios in healthy subjects. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 28, n. 3, p.274-280, 1993.

BOMAN, G.; RINGBERGER, V. A. Binding of rifampicin by human plasma proteins. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 7, p. 369-373, 1974.

BONNIERE, P.; WALLAERT, B.; CORTOT, A. et al. Latent pulmonary involvement in Crohn's disease: biological, functional, bronchoalveolar lavage and scintigraphic studies. **Gut**, v. 27, p. 919-25, 1986.

BORRELLI, P.; MARIANO, M. & BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. **Nutr. Res.**, v. 15, p. 1477-1481, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relação de fármacos genéricos (Atualizada no D.OU. de 06 de novembro de 2002)**. Disponível em: <[http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 01 dez. 2002a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medicamentos: registro de produtos. consulta de produtos de empresa de medicamentos**. Disponível em:<[http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 01 dez. 2002b.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Gerência Geral de Medicamentos Unidade de Medicamentos Controlados, Similares, Fitoterápicos e Isentos. Registro de Medicamentos** . Disponível em< [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 19 abril 2002c

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde Centro de Referência Prof. Hélio Fraga; Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia; **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço** 5 ed – Rio de Janeiro 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. **Manual de Normas para o controle da tuberculose** . 4 ed. Brasília:FNS ,1995. 50p. ( Série A : NoRas e Manuais Técnicos, 13)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão de Pneumologia Sanitária. Campanha Nacional Contra a Tuberculose. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço/ CNCT/NUTES**. 4. Ed. Brasília: , 1994. 174p. il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Datasus. **Informações para a saúde. Indicadores e dados básicos. Indicadores demográficos. População total**. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 04 dez. 2002 a



BRASIL. Ministério da Saúde. Datasus. **Informações para a saúde. Indicadores e dados básicos. Indicadores de morbidade e fatores de risco.** Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 04 dez. 2002b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Datasus. **Informações para a saúde. Indicadores e dados básicos. Indicadores sócio-econômicos. Percentual de pobres.** Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 04 dez 2002c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº 284,** de 1998. Brasília, 1998.

BREWSTER, D. R.; MANARY, M. J.; MENZIES, I. S.; O' LOUGHLIN, E. V.; HENRY, R. L. Increased permeability in kwashiokor. **Arch. Dis. Child**, n. 76, p. 236-241, 1997.

BRUNDTLAND, G. H. Overcoming antimicrobial resistance. **World Health Organization. Report on Infectious Diseases Geneve 2000.**

BUNIVA, G.; PAGANI, V.; CAROZZI, A. Bioavailability of rifampicin capsules. **Int. J. Pharmacol. Therapy Toxicol.**, v. 21, p. 404-409, 1983.

BURET, A.; GALL, D. G.; NATION, P. N.; OLSON, M. E. International protozoa and epithelial cell kinetics, structure and function. **Parasitol. Today**, v. 6, p. 375-380, 1990.

BUSHEN, O. Y.; PISCITELLI, S. C.; UZGIRIS, A J.; DAVENPORT, J. A; BEZERAA, A ; SILVA, T. M. J.; KOSEK, M.; BARRET, L. J.;DILLINGHAM, R.; GIRÃO, A ; LIMA, A A M.; GUERRANT, R. L. Diarrhea, impaired intestinal fuction, antiretroviral drug malabsorption and drug resistance: Improvements with glutamine or alanyl-glutamine in a randomized controlled trial in Northeast Brazil 25<sup>th</sup> year celebration of UFC& Uva International Collaborative Program. Abstracts p.20-21, 12-Fortaleza-Brazil, February 12<sup>th</sup>-14<sup>th</sup> , 2003.

CAMPELO, C. L. Multidrogarresistência no Estado do Ceará. Comunicação. In: **CONGRESSO CEARENSE DE CLÍNICA MÉDICA**, 7, 1999.

CAMPOS, R.; BRIQUES, W.; BELDA NETO, M.; SOUZA, J.M.; KATZ, N.; SALATA, E.; DACAL, A R.G.; DOURADO, H.; CASTANHO, R. E. P.; GURVITZ, .R.; ZINGANO, A ; PEREIRA, G. J. M.; FERRIOLI FILHO, F.; CAMILO-COURA, .L.; FARIA, J. A S.; CIMERAN, B.; SIQUEIRA FILHO, J. B.; PRATA, A. **Levantamento multicêntrico de parasitoses intestinais no Brasil**. Rhodia - Grupo Rhône-Poulenc, 1988.

CANETTI, G.; FOX, W.; KHOMENCO, A et al. Advances techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensivity test in tuberculosis control programmes . **Bull. World Health Organ.**, v. 41, p.21, 1969.

CANETTI, G.; RIST, N.; GROSSET, J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux and drogues antibacillaires par la méthode des proportions. **Rev. Tuber. Pneumol.**, v. 27, p. 272, 1963.

CARRASCOSA, M.; MARTINEZ, J.; PEREZ-CASTRILLON, J. L. Haemorrhagic proctosigmoiditis and *B. hominis* infection. **Ann. Int. Med.**, v. 15, n. 2, p. 278-279, 1996.

CASELLAS, F.; AGUADE, S.; SARIANO, B.; ACCARINO, A.; MOLERO, J.; GUARNER, L. IP to 99mTc-Diethylenetriaminopentaacetic acid in Inflammatory Bowel Disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 81, p. 767-770, 1986.

CASTELLO-BRANCO, L. R.; LEWIS, D. J. M.; ORTIGÃO-de-SAMPAIO, M. B.; GRIFFIN, G. E. Gastrointestinal immune response in HIV infected subjects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 363-366, 1996.

CATALANI, E. Review of the Indian market of anti-tuberculosis drugs: focus on the utilization of rifampicin-based products. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.**, v. 3, p. 289- 291, 1999. Suplemento 3

CHADWICK, V. S.; PHILLIPS, S. F.; HOFFMAN, A. F. Measurement of intestinal permeability using low molecular weight polyethylene glycols. **Gastroenterology**, v. 73, p. 241-251, 1977.

CHANDRA, R. K. **Nutrition and Immunology**. New York: Alan R. Liss, 1988.

CHIOU, W. L. :The validation of the intestinal permeability approach to predict oral fraction of dose absorbed in humans and rats. **Biopharm. Drug Dispos.**, v. 16, n. 1, p. 71-5, jan. 1995.

CHOUDHRI, S. H.; HAWKEN, M.; GATHUA, S.; MIRNYIRI, G. O.; WATKINS, W.; SAHAI, J.; SITAR, D. S.; AOKI, F. Y.; LONG, R. Pharmacokinetics of antimycobacterial drugs in patients with tuberculosis, AIDS and diarrhea. **Clin. Infectious Dis.**, v. 25, p. 104-111, 1997.

COBDEN, I.; HAMILTON, I.; ROTWELL, J. ; AXON, A. T. R. Cellobiose/mannitol test ; physical proprieties of probe moleculares and influence of extraneous factors. **Clin. Chim. Acta**, v. 148, p. 53-62, 1985.

COBDEN, I. Intestinal permeability and screening tests for coeliac disease. **Gut**, v. 21, p. 512-518, 1980.

COLE, S. T. Mycobacterium tuberculosis: drug resistant mechanisms. **Trends Microbiol.**, v. 2, p. 411-415, 1994.

COX, M. A ; LEWIS, K. O. ; COOPER, B. T. Measurement of small intestinal permeability markers, lactulose and mannitol in serum. **Dig. Dis. Sci.**, v. 44, p. 402-406, 1999

CROWLE, A. J.; ROSS, E. J.; MAY, M. H. Inhibition by 1,25 (OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> of the multiplication of virulent tubercle bacilli cultured in human macrophages. **Infect. Immunity**, v. 55, p. 2945-50, 1987.

DAGCI, H.; USTUN, S.; TANER, M. S.; ERSOZ, G.; KARACASU, F.; BUDAK, S. Protozoan infections and intestinal permeability. **Acta Trop.**, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2002.

DAVIS, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, v. 264, p. 375-82, 1994.

DENIS, M.: Killing of *M. tuberculosis* within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 84, p. 200-206, 1991.

DETSKY, A.; SMALLEY, P.; CHANGE, J. Is this patient malnourished? **JAMA**, v. 271, p. 54-58, 1994.

DETSKY, A.; McLAUGHLIN, J. What is subjective global assessment of nutritional status? **J. Parenter. Enteral Nutr.**, v. 11, p. 8-12, 1987.

DIETERLEN, P.; CASSEREAU, H.; LESTRADET, H. Permanent malabsorption of rifampicin in a diabetic with coeliac disease. **Arch. Fr. Pediatr.**, v.43, p. 421-2, 1986.

DOLLERY, C. **Rifampicin**. In: DOLLERY, C. Ed Therapeutics drugs. Edinburg: Churchill Livingstone: p. R23- R29, 1991.

ELIA, M.; GORE, A ; BEHRENS, R. Effect of total starvation and very low calorie diets on intestinal permeability in man. **Clin. Sci.**, n. 73, p. 205-210, 1987.

ELLARD, G. A.; FOURIE, P. B. Rifampicin bioavailability : a review of its pharmacology and the chemotherapeutic necessity of ensuring optimal absorption . **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 3, p. S301 – S 308, 1999. Suppl. 3

ELLARD, G. A.; ELLARD, D. R.; ALLEN, B. W.; et al. The bioavailability of isoniazid, rifampicin and pyrazinamide in two commercially available combined formulations designed for use in short- course treatment of tuberculosis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 133, p.1076-1080, 1986.

ERSOZ, G. Intestinal permeability in liver cirrhosis. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 11, n. 4, p. 409-12, apr. 1999.

FAHN, H. J.; WANG, L. S.; KAO, S. H.; CHANG, S. C.; HUANG, M. H.; WEI, Y. H. Smoking associated mitochondrial DNA mutations and lipid peroxidation in human lung tissues. **Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.**, v. 19, n. 6, p. 901-909, 1998.

FERRARIS, R. P.; CAREY, H. V. Intestinal transport during fasting and malnutrition. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 20, p. 195-219, 2000.

FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ. Casa Osvaldo Cruz. FUNASA-CNPS-CRHF. Memória da Tuberculose. Acervo de depoimentos, 1993.

FLYNN, J. L.; TRIEBOLD, K. J.; PALTON, D. K.; STEWARD, T. A.; BLOOM, B. R.: An essential role of interferon in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 2249-2254, 1993.

FLYNN, J. L.; GOLDSTEIN, M. M.; TRIEBOLD, K. J.; KOLLER, B.; BLOOM, B. R. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 12013-12017, 1992.

FORDTRAN, J. S. et al. Water and solute movement in the small intestine of patients with sprue. **J. Clin. Invest.**, v. 46, p. 287-298, 1967.

FORDTRAN, J. S.; RECTOR, F.C.; EWTON, M. F.; SOTER, N.; KINNEY, J. Permeability characteristics of the human small intestine. **J. Clin. Invest.**, v. 44, p. 1935-1944, 1965.

FOX, W. Drug combinations and bioavailability of rifampicin. **Tubercle**, v. 71, p. 241-245, 1990a.

FOX, W. Tuberculosis in India. Past, present and future. **Indian J. Tuberc.**, v. 37, p. 175-213, 1990b.

FOX, W. Compliance of patients and physicians: experience and lessons from tuberculosis-I. **Br. Med. J.**, v. 287, p. 33-35, 1983a.

FOX, W. Compliance of patients and physicians: experience and lessons from tuberculosis-I. **Br. Med. J.**, v. 287, p. 101-105, 1983b.

FRIEDLAND, J. S.; HARTLEY, J.; HARTLEY, C. G. C.; SHATTOCK, R. J.; GRIFFIN, G. E. Inhibition of ex vivo proinflammatory cytokine secretion in fatal Mycobacterium tuberculosis infection. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 100, p. 233-238, 1995.

FRIEDLAND, J. S. Chemotactic cytokines and tuberculosis. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 22, p. 10-312, 1994.

GALESI, V. M. N. **Mortalidade por tuberculose no município de São Paulo- Análise de uma década, 1986 a 1995**. São Paulo, 1999. Dissertação. Faculdade de Saúde Pública/ USP.

GASBARRINI, G.; MONTALTO, M. Structure and function of tight junctions. Role in intestinal barrier. **Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 31,n.6, p. 481-8, aug.-sep. 1999.

GERHARDT, G; TEIXEIRA, G. M. MIRANDA, J. A. et al. Quimioterapia da tuberculose no Brasil com esquema 2RHZ/RH: Análise de 10 anos. **J. Pneumol.**, v. 18, p. 121, 1992.

GIFONI, A. M. R. **Estudo da permeabilidade intestinal em pacientes com HIV-positivos: determinação e aplicação de um novo parâmetro farmacológico.** Fortaleza, 1996. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

GILLIN, J. S.; SHIKE, M.; ALCOCK, N. et al. Malabsorption and mucosal abnormalities in patients with AIDS. **Ann. Int. Med.**, v. 102, p. 619- 622, 1985.

GOODGAME, R. W.; KIMBALL, K. ; OU, C. N. Intestinal function and injury in AIDS- related cryptosporidiosis. **Gastroenterology**, v. 108, p. 1075-1082, 1995.

GORDIN, F. M.; NELSON, E.T.; MATTS, J. P. et al. The impact of human immunodeficiency virus infection on drug resistant tuberculosis. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.**, v. 154, p. 1478-1483, 1996.

GRYBOSKI, J. D.;THAYER, W. R.; GABRIELSON, I. W.; SPIRO, H. M. Dissacchariduria in gastrointestinal disease. **Gastroenterology**, v. 45, p. 633-637, 1963.

GUERRANT, R. L.; ARAÚJO, V.; SOARES, E.; KOTLOFF, K.; LIMA, A. A. M.; COOPER, W. H.; LEE, A G. Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1238-1242, 1992.

GUERRANT, R. L.; HUGHES, J. M.; LIMA, N. L.; CRANE, J. Diarrhea in developed and developing countries; magnitude, special settings, and etiologies. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, p. 541-550, 1990.

GUPTA S. **Malnutrition and lymphocyte subpopulation responses in humans.** In: **Nutrient modulation of the immune response.** Ed: Cunningham-Rundles S. Marcel Dekker Inc. New York, NY. 1993, p. 441-454.

GURUMURTHY, P.; RAMACHANDRAN, G.; VIJAYALAKSHMI, A. K.; HEMANTH KUMAR, P. et al . Bioavailability of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in a triple drug formulation: comparison of plasma and urine kinetics. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 3, n. 2, p. 119-125, 1999.

HEIFETS, L.; LINDHOLM-LEVY, P. Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semidormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 145, n. 5, p. 1223-5, may 1992.

HIRSCH S.; CHAVES G.; GOTTELAND M.; de la MAZA P.; PETERANN M.; BARRERA P.; BUNOUT D. Intestinal permeability in alcoholic patients without liver damage. **Rev. Med. Chil.**, v. 125, n. 6, p. 653-8, jun. 1997.

HUBBARD R. D.; FLORY C. M.; COLLINS F. M. Memory T cell-mediated resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection in innately susceptible and resistant mice. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 2012-2016 , 1991.

HURWITZ, A. E.; SCHLOZMAN, D. L. Effects of antacids on gastrointestinal absorption of isoniazid in rats and man. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 109, p. 41-47, 1974.



I Consenso Brasileiro de Tuberculose – **J. Pneumologia**, v.23, n. 6, p. 336-342, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATISTICA. **Indicadores sócio-econômicos**. Censo Demográfico e Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios. – Pnad, 1997.

INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE / WORLD HEALTH ORGANIZATION. Assuring bioavailability of fixed-dose combinations of anti-tuberculosis medications . **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 3, p. 282 – 283 1999 Suppl 3.

IRVING, C. S.; LIFSCHITZ, C. H.; MARKS, L. M. et al Decreased intestinal permeability of polyethylene glycol (PEG) 400 polymers in children with mucosal damage. **Gastroenterol.**, v. 84, p. 1195, 1983.

JAMBON B.; ZIEGLER O.; MAIRE B.; HUTIN M. F.; PARENT G.; FALL M.; BURNEL D. & DUHEILLE J. Thymulin and zinc contents of the thymus glands of malnourished children. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 48, p.335-342 , 1988.

JENKINS, R. T., CHEM, C.; JONES, D. B., et al. Reversibility of increased intestinal permeability to <sup>51</sup> Cr-EDTA in patients with gastrointestinal inflammatory disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 82, p. 1159-64, 1987.

JOHNSTON, S. D.; SMYE, M.; WATSON, R. P. Intestinal permeability tests in coeliac disease. **Clin. Lab.**, v. 47, n.3-4, p. 143-50, 2001 a.

JOHNSTON, S. D.; SMYE, M.; WATSON, R. G.; McMILAN, S. A.; TRIMBLE, E. R.; LOVE, A. H. Lactulose-mannitol intestinal permeability test: a useful screening test for adult coeliac disease. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 37, n. 4, p. 512-9 Jul. 2001b.

KARYADI, E.; SCULTINK, W.; NELWAN R. H; GROSS, R.; AMIN, Z.; DOLMANS, W. M.; HAUTVAST, J. G.; WEST, C. E . Poor micronutrient status of active pulmonary tuberculosis patients in Indonesia. **J. Nutr.**, v. 130, n. 12, p. 2953-2958, dec., 2000.

KESHAVARZIAN, A ; FIELDS, J. Z.; VAETH, J.; HOLMES, E. W. The differing effects of acute and chronic alcohol on gastric and intestinal permeability. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 89 , p. 2205-2212, 1994.

KEUSCH, T. G. **Malnutrition and the thymus gland. In: Nutrient Modulation of the Immune Response.** Ed. Cunningham-Rundles S. Marcel Dekker, Inc. , New York, NY 1993. p. 283-299

KEUSCH, G.T.; WILSON, C. S.; WAKSAL, S. D. **Nutrition, host defenses, and lymphoid system. In: Advances in Host Defense Mechanisms.** Eds: Gallin, J. I., and A. S. Fauci. New York :Raven Press, 1983. p. 275-359

KIMERLING, M.; PHILLIPS, P.; PATTERSON, P.; HALL, M.; ROBINSON, A.; DUNLAP, N. E. Low serum antimycobacterial drug levels in non-HIV-infected tuberculosis patients. **Chest**, v.113, n.5 , p. 1178-1183, 1998.

KLIMBERG, V. S.; SALLOUM, R. M.; KASPER, M. et al. Oral glutamine accelerates healing of the small intestine and improves outcome following whole abdominal radiation. **Arch. Surg.**, v. 125, p. 1040-1045,1990.

KOCHI, A . The Tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tuberculosis Unit WHO. **Tubercle**, v. 72,n. 1, 1991.

KRISTKI, A. L.; CONDE, M. B. ; SOUZA, G. R. M . **Tuberculose: do ambulatório à enfermaria.** São Paulo: Atheneu, 1999.

KROUP, J. R.; WILLIAMS-WARREN, J.; VISWANATHAN, C. T.; WEBER, A.; SMITH, A. L. Pharmacokinetics of rifampin in children. II Oral bioavailability. **Ther. Drug Monitor.**, v. 8, p. 17-22, 1986.

LADEL, C. H.; S. DAUGELAT, S.; KAUFMANN, S. H. E. Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guerin infection in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, p. 377-384, 1995.

LANGKAMP-HENKEN, B. ; DONOVAN ,T. B.; PATE, L. M.; MAULL, C. D.; KUDSK, K. A. Increased intestinal permeability following blunt and penetrating trauma. **Critical Care Medicine**, v. 23, n. 4, apr. 1995.

LAUDAT, A.; ARNAUD, P.; NAPOLY, A.; BRION, F. The intestinal permeability test applied to the diagnosis of food allergy in paediatrics. **West Indian Med. J.**, v. 43, n. 3, p. 87-8, sep. 1994.

LENNERNAS, H : Human intestinal permeability. **J. Pharm. Sci.**, v. 87, n. 4, p. 403-10, Apr. 1988.

LIFSCHITZ, C.; SHULMAN, R. Intestinal permeability tests: Are they clinically useful ? **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 10, p. 283-7, 1990.

LIFSCHITZ, C. Intestinal permeability. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 4, p. 520-22, 1985.

LIMA, A. A M. **Glutamina e Alanil-glutamil-glutamina: síntese química, efeito no transporte de água, eletrólitos e permeabilidade intestinal.** 1998. Tese (Titular em Farmacologia) - Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

LIMA A. A. L.; SILVA, T. M. J.; GIFFONI, A. M. R.; BARRETT, L. J.; McAULIFFE I. T.; BAO, Y; FOX, J. W.; FEDORKO, D. P.; GUERRANT, R. L. Mucosal injury and disruption of intestinal barrier function in HIV-infected individuals with and without diarrhea and Cryptosporidiosis in Northeast Brazil. **Am. J. Gastroenterology**, v. 92, n. 10, p.1861-66 , Oct. 1997.

LUNN, P. G.; ERINOSO, H. O.; NORTHROP-CLEWES C. A.; BOYCE, S. A. *Giardia intestinalis* is unlikely to be a major cause of the poor growth of rural Gambian infants. **J. Nutr.**, v. 129, n. 4 , p. 872-77, 1999.

MA, T.Y.; NGUYEN, D.; BUI, V.; NGUYEN, H.; HOA, N. Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n. 4 Pt 1, p. 965-7401, apr. 1999.

MA, T. Y.; HOLLANDER, D.; KRUGLIAK, P. KATZ, K. PEG-400, a hydrophic molecular probe for measuring intestinal permeability. **Gastroenterology**, v. 98, p. 39-46, 1990.

Mac GREGOR, R. R. **Treatment of Mycobacterial Disease of the Lungs caused by *Mycobacterium tuberculosis***. In: FISHMANN, A. P. **Pulmonary Diseases and disorders**. New York :McGraw-Hill Book Co., 1988, p. 1869-1882.

MADARA, J. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. **Am. J. Pathol.**, v. 137, p. 1273-1281, 1990.

MADEBO, T.; NYSAETER, G.; LINDTJORN, B. HIV infection and malnutrition change the clinical and radiological features of pulmonary tuberculosis. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 29, n. 4, p. 355-359, 1997.

MAHMOUDI, A.; ISEMAN, M. D. Pitfalls in the care of patients with tuberculosis. **JAMA**, v. 270, p. 65-68, 1993.

MANELLA, F. **Tuberculosis enteritis. In Tuberculosis and Non Tuberculous Mycobacterial Infections.** Schlossberg D. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1999, p. 229-233.

MARKELL, E. K.; VOGEL, M.; KROTOSKI, W. A. **Parasitic infections immunocompromised hosts. In: S. Ozmat. Medical Parasitology**, 8. ed., Mexico: Saunders Company, 1999. p. 389-402.

MARTINS, J. M. C. & SAMPAIO, E. M. Enteroparasitoses em uma área do município de Fortaleza. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 9, n. 6, p. 388-392, 1967.

Mc NEIL, P. L. & ITO, S. Gastrointestinal cell plasma membranae wounding and resealing in vivo. **Gastroenterol.**, v. 96, p. 1238-1248, 1989.

McDEROTT, M. R.; BIENENSTOCK, J. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues. **J. Immunol.**, v. 122, p. 1892-8, 1979.

McGHEE J. R.; MESTECKY J.; DERTZBAUGH M. T.; ELDRIDGE J. H.; HIRASAWA M.; KIYONO H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. **Vaccine**, v. 10, p. 75-88, 1992.

McILLERON, H.; GABRIELS, G.; SMITH, P. J.; FOURIE, P. B; ELLARD, G. A. the development of a standardised screening protocol for in vivo assessment of rifampicin bioavailability. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 3 , n. 11, p. 329-335, 1999.

McMURRAY, D. N.: Impact of nutritional deficiencies on resistance to experimental pulmonary tuberculosis. **Nutr. Rev.**, v.56, n.2, p.147-152 ,1998.

McMURRAY D.N. **Protein-energy malnutrition: effects on the immune system and on resistance to infection. In: Nutritional Immunomodulation in disease and health promotion.** Columbus, OH: Silverman E. Ross Products Division, Abbott Laboratories, 1996. p.19-24.

McMURRAY, D. N.; BARTOW, R. A.; MINTZER, C. L.; HERNANDEZ-FRONTIERA E. Micronutrient status and immune function in tuberculosis. **Ann. Acad. Sci.**, v. 587, p. 59-69, 1990.

McMURRAY, D. N. Cell-mediated immunity in nutritional deficiency. **Prog. Food Nutr. Sci.**, v. 8, p. 193-228, 1984.

McMURRAY, D. N. ; YETLEY, E. A. Response to *M. bovis* BCG vaccination in protein- and zinc-deficient guinea pigs. **Infect. Immun.**, v. 39, p. 755-761 , 1983.

MEDDINGS, J. B. Intestinal permeability in Crohn's disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 11, dec. 1997. Suppl. 3

MENZIES, I. S.; LAKER, M. F.; POUNDER, R. E. et al. Abnormal intestinal permeability to sugar in villous atrophy. **Lancet**, p.1107-1109, 1979. ii

MESTECKY, J.; MCGHEE, J. R.; MICHALEK, S. M.; ARNOLD, R. R.; CRAGO, S. S.; BABB, J. L. Concept of the local and common mucosal immune response. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 107, p.185-92, 1978.

MEHTA, J. B.; SHANTAVEERAPA, H.; BYRD, J. R. P.; MORTON, S. E.; FOUNTAIN, F.; ROY, T. M. Utility of Rifampin Blood Levels in the Treatment and Follow-up of Active Pulmonary Tuberculosis in Patients who Were Slow to Respond to Routine Directly Observed Therapy. **Chest**, v. 120, p. 1520-1524, 2001.

MIDDLEBROOK, G.; COHN, M. L.. Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli. **Science**, v. 118, p. 297, 1953.

MITCHISON, D. A .The Garrod Lecture . Understanding the chemotherapy of tuberculosis – current problems.( Review ). **J. Antimicrobial Chemotherapy**, v. 29, p. 477-493, 1992.

MITCHISON, D. A. Mechanisms of drug action in short course chemotherapy. **Bull. Int.Union Tuberc.**, v. 60, n. 1-2 , p. 34-37, 1985.

MOREHEAD, R. S. Delayed Death From Pulmonary Tuberculosis: Unsuspected Subtherapeutic Drug Levels. **South Med. J.**, v. 93, n. 5, p. 507-510, 2000.

MORGAN, D.; HILL, G.; BUKENSHAW, L. The assessment of weight loss from a single measurement of body weight: the problems and limitations. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 32, p. 2101-2105, 1998.

MOULDING, T.; DUTT, A. K.; REICHMAN, L. B. Fixed dose combinations of antituberculous medications to prevent drugs resistance. **Ann. Intern. Med.**, v. 122, p. 951-954, 1995.

MUGERWA, J. W. The lymphoreticular system in kwashiorkor. **J. Pathol.**, v. 105, p. 105-109 , 1971.

MULLER, I.; COBBOLD, S. P.; WALDMANN, H.; KAUFMANN, S. H. E. Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective *in vivo* depletion of L3T4<sup>+</sup> and Lyt-2<sup>+</sup> cells. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 2037-2041, 1987.

MULLIN, J. E.; O'BRIEN, T. G. Effects of tumor promoters on LLC-PK renal epithelial tight junctions and transepithelial fluxes. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. 597-602, 1986.

NELSON, S.; MASON, C.; BAGBY, G.; SUMMER, W. Alcohol, tumor necrosis factor, and tuberculosis. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 19, n. 1, p. 17-24, Feb. 1995.

NISHIYAMA, R.; SAKAGUCHI, T.; KINUGASA, T.; GU, X.; MacDEROTT, R. P.; PODOLSKY, D. K.; REINECKER, H. C. Interleukin-2 receptor beta subunit-dependent and -independent regulation of intestinal epithelial tight junctions. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 38, p. 35571-8021, sep. 2001.

NOGUEIRA, P. A. Motivos e tempo de internação e o tipo de saída em hospitais de tuberculose do Estado de São Paulo, Brasil-1981 a 1995. **J. Pneumol.**, v. 27, n. 3 , p.123-9, mai./jun. 2001.

O'CONNOR, P. G.; SCHOTTENFELD, R. S. Patients with alcohol problems. **New Engl. J. Med.**, v. 338, n. 9, p. 592-600, 1998.

PABLO-MENDEZ, A.; RAVIGLIONE, M. C.; LASZLO, A. et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance,1994-1997. World Health Organization- International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases. Working group on Antituberculosis Drug Resistance Surveillance. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, n. 23, p. 1641-1649,1998.



PADGAONKAR, K. A.; REVANKAR, S. N.; BHATT, A. D.; VAZ, J. A.; DESAI, N. D.; D'Sa, S.; SHAH, V. Comparative bioequivalence study of rifampicin and isoniazid combinations in healthy volunteers. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 3, n. 7, p. 627-631, 1999.

PAYNES, D & KUBES, P. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. **Am. J. Physiol.**, 265 : G-189- G 195, 1993

PAHKLA, R.; LAMBERT, J.; ANSKO, P.; WINSTANLEY, P.; DAVIES, P. D. O.; KIIVET, R. A. Comparative bioavailability of three different preparations of rifampicin. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 24, p. 21-225, 1999.

PARK, M.; DAVIS, A. L. Outcome of MDR-TB patients, 1983-1993 : prolonged survival with appropriate therapy. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.** v. 153, p. 317-324, 1996.

PASCUAL, S.; MARTINEZ, J. ; PÉREZ-MATEO, M. La barrera intestinal: trastornos funcionales en enfermedades digestivas y extradigestivas. **Gastrenterol. Hepatol.**, v. 24, p. 256-267, 2001.

PATON, N. I.; CASTELLO-BRANCO, L. R.; JENNINGS, G.; ORTIGÃO-de-SAMPAIO, M. B.; ELIA, M.; COSTA, S.; GRIFFIN, G. E. Impact of tuberculosis on the body composition of HIV-infected men in Brazil. **J. Aids Hum. Retrovirol.**, v. 20, p. 265-71, 1999.

PEARSON, A. D.; EASTHAM, J.; LAKER, M. F.; CRAFT, A.; NELSON, R. Intestinal permeability in children with Crohn's disease and celiac disease. **British Medical Journal**, v. 285, p. 20-21, 1982.

PELED, Y.; WATZ, C.; GILAT, T. Measurement of intestinal permeability using Cr-EDTA. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 80, p. 770-773, 1985.

PELIZZA, G.; NEBULONI, M.; FERRARI, P.; GALLO, G. G. Polymorfism of rifampicin. **Il Farmaco** ( Edizione scientifica ), v. 32, p. 471-481, 1977.

PELOQUIN , C. A; BERNING, S. E.; HUITT, G. A; ISEMAN, M. D. Aids and Tb drug absorption. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 3, n. 12, p. 1143- 1147, 1999.

PELOQUIN, C. A.; NAMDAR, R.; SINGLETON, M. D. et al. Pharmacokinetics of rifampin under fasting conditions, with food, and with antacids. **Chest**, v. 115, p. 12-81, 1999.

PELOQUIN, C. A. Using therapeutic drug monitoring to dose the antimycobacterial drug. **Clin. Chest Med.**, v. 18, p. 79-87, 1997.

PELOQUIN, C. A.; NITTA, A. T.; BURAN, W. J.; BRUDNEY, K. F.; MIRANDA-MASSARI, J. R.; McGUINNESS, M. E., et al. Low antituberculosis drug concentrations in patients with AIDS. **Ann. Pharmacother.**, v. 30, p. 919-23, 1996.

PELOQUIN, C. A.; MacPHEE, A. A.; BERNING, S. E. Malabsorption of antimycobacterial medications [Letter]. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 1122-3, 1993.

PELOQUIN, C. A. Antituberculosis drugs: pharmacokinetics. In: HEIFTS, L.B. **Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections**. Florida: CRC press, 1991 p. 13-57.

PEREIRA, J. C. & RUFFINO- NETO, A. Saúde, doença e sociedade. A tuberculose e o tuberculoso. **Medicina**, v. 15, n. 12, p. 5-11, 1982.

PHILLIPS, B. P. & ZIERDT, C. H. *Blastocystis hominis*: pathogenic potential in human patients and in gnotobiotics. **Exp. Parasitol.**, v. 39, n. 3, p. 358-364, 1976.

PILLAI, G.; FOURIE, P. B.; PADAYATCHI, N.; ONYEBUJOH, P. C.; McILLERON, H.; SMITH, P. J.; GABRIELS, G. Recent bioequivalence studies on fixed-dose combination antituberculosis drug formulations available on the global market. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 3, p. 309 – 316, 1999. Suppl. 3.

PINHEIRO, V. G. F; BARROSO, E. C; RAMOS, L. A.; MONTEIRO, H. S. A ; LIMA, A. A M.; MOTA, R. M. S; LUNA, M. A D. S. Necessidade de leitos adequados para internação de pacientes com tuberculose pulmonar. In Anais do Congresso Brasileiro de Pneumologia e Tisiologia. **J. Pneumol.**, v. 28, p. S-105-S-105 out. 2002. Suplemento 2.

PINHEIRO, V. G. F; BARROSO, E. C; OLIVEIRA, T. R. B; ARRUDA, A M. F.; AMARAL, A M. D. A internação do paciente tuberculoso - Situação atual do Hospital de Maracanaú. **J. Pneumol.**, v. 14, set. 1988. Suplemento 1.

POLOSA, K; MURPHY, K. J. R.; KRISHNASWAMY, K. Rifampicin kinetics in undernutrition. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 17, p.481-4, 1984.

PONCE DE LEON, A. Antimicrobial resistance in tuberculosis : mechanisms and therapeutic options. **Rev. Invest. Clin.**, v. 52, n. 1, p. 72-79, 2000.

PURTILO D. T. & CONNOR D.H. Fatal infections in protein-calorie malnourished children with thymolymphatic atrophy. **Arch. Dis. Child.**, v. 50, p. 149-152, 1975.

RAJ, S. M.; SEIN, K. T.; ANUAR, A K.; MUSTAFFA, B. E. Effect of intestinal helminthiasis on intestinal permeability of early primary schoolchildren. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, n. 6, p. 666-669, nov.-dec., 1996.

RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: molecular perspectives. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, p. 1-18 , 1998.

RISKA, P. F.; JACOBS, W. R.; ALLAND, D. Molecular determinants on drug resistance. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 4, n. 2, p. S4-S10, 2000.

ROOK, G. A. W. The role of activated macrophages in protection and immunopathology in tuberculosis. **Res. Microbiol.**, v. 141, p. 191-270, 1990.

ROOK, G. A. W. The role of vitamin D in tuberculosis. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 138, p. 768-770, 1988.

ROOK, G. A. W.; STEELE, J.; FRAHER, L.; BARKER, S.; KARALI R.; O'RIORDAN, J. & STANFORD, J. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of *M. tuberculosis* by human monocytes. **Immunol.**, v. 57, p. 159-163, 1986.

ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da Tuberculose: Síntese e atualização. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 9, n. 1, jan-jun, 2001.

ROSEMBERG, J. **Tuberculose: panorama global, óbices para o seu controle**. Fortaleza : Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, 1999. p. 50-52.

ROTHMAN, K. J.,. Research and prevention priorities for alcohol carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 161-163, 1995.

RUDZIK, R.; CLANCY, R. L.; PEREY, D. Y. E.; DAY, R. P.; BIENENSTOCK, J. Repopulation with IgA containing cells of bronchial and intestinal lamina propria after transfer of homologous Peyer's patch and bronchial lymphocytes. **J. Immunol.**,v. 114, p. 1599-604, 1975.

RUFFINO NETTO, A.; SOUZA, A. M. A. F. Reforma do setor saúde e controle da tuberculose no Brasil. **Inf. Epidemiol. SUS**, v. 8, n. 4, p. 35-51, 1999.

SAHAI, J.; GALLICANO, K.; SWICK, L. et al. Reduced plasma concentrations of antituberculosis drugs in patients with HIV infection. **Ann. Intern. Med.**, v. 127, p. 289-293, 1997.

SALTZMAN, J. R. ; KOWDLEY, K. V. ; PERRONE, G. ; RUSSEL, R. M. Changes in small-intestine permeability with aging. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 43, p. 160-164, 1995.

SAWIERS, W. M. ; ANDREWS, D. J. ; LOW-BEERS, T. S. The double sugar test of intestinal permeability in the elderly. **Age Aging**, v. 25, p. 312-315, 1985.

SBARBO, J.; BLOMBERG, B.; CHAULET, P. Fixed-dose combination formulations for tuberculosis treatment -editorial . **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 3, p. S286 – S 287, 1999. Suppl 3.

SCHABERG, T.; GLOBER, G.; REICHERT, B.; MAUCH, H.; LODE, H. Resistant lung tuberculosis in Berlin 1987-1993. **Pneumologie**, v. 50, p. 21-27, 1996.

SCHAERER, E.; NEUTRA, M. R.; KRAEHENBUHL, J. P. Molecular and celular mechanisms involved in transepithelial transport. **J. Membr. Biol.**, v. 123, p. 93-103, 1991

SCHEWENK, A.; MacALLAN, D. C. Tuberculosis, malnutrition and wasting. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 3, n. 4, p. 285-91, 2000.

SCHLEIFFER, R. & RAUL, F. Prophylactic administration of L- arginine improves the intestinal barrier function after mesenteric ischaemia. **Gut**, n. 39, p. 194-198, 1996.

SCHWENCK, A.; BURGER, B.; WESSEL, D.; STUTZER, H.; ZIEGENHAGNE, D.; DIEHL, V.; SCHRAPPE, M. Clinical risk factors for malnutrition in HIV-1 infected patients. **AIDS**, v. 7, p. 1213-1219, 1993.

SIEGLER, D. I.; BRYANT, M.; BURLEY, D. M.; CITRON, M.; STANDEN, S. M. Effect of meals on rifampicin absorption. **Lancet**, v. 27, n. 2 (7874), p.197-198, jul 1974.

SIMPSON J. R. & HOFFMAN-GOETZ, L. **Nutritional deficiencies and immunoregulatory cytokines. In: Nutrient modulation of the immune response.** Ed Cunningham-Rundles S; Marcel Dekker Inc, New York, NY 1993. p.31-45.

SIMKO, V. Sudan stain and quantitative fecal fat. **Gastroenterology**. v. 98, n. 6, p. 1722-1723., jun, 1990

SMITH, P. D.; GILLIN, F. D.; SPIRA, W. M.; NASH, T. E. Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. **Gastroenterology**, v. 83, n. 4 , p. 797-803, 1982.

SMITH, P. J.; Van DYK, J.; FREDERICKS, A . Determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide by high performance liquid chromatography after their simultaneous extraction from plasma. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 3, n. 11, p. S325 – S328, 1999. Suplemento 3

SOUZA E SILVA, M. K.; FÉLIX, D. S. Uso da antropometria na avaliação do estado nutricional. **Rev. Bras. Clin.**, v. 13, p. 74-80, 1998.

SPRATT, B. G. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. **Science**, v. 264, p .388-93, 1994.

STECHMILLER, J. K.; TREOLAR, D.; ALLEN, N. Gut dysfunction in critically ill patients: a review of the literature. **Am. J. Crit. Care**, v. 6, p. 204-209, 1997.

STRACHAN, D. P.; POWELL, K. J.; THAKER, A.; MILLARD, F. J. C.; MAXWELL, J. D. Vegetarian diet as a risk factor for tuberculosis in immigrant South London Asians. **Thorax**, v. 50, p. 175-80, 1995.

SUMARTOJO, E. When tuberculosis treatment fails. A social behavioral account of patient adherence. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 147, p. 1311-1320, 1993.

SUSKIND, R. M. **Malnutrition and the immune response**. New York: Raven Press, 1977.

TAKASHIMA, T.; VETA, C.; TSUYUGUCHI, I.; KISHIMOTO, S. Production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 3286-3292 , 1990.

TEIXEIRA, G. M. – DOTS- Uma estratégia renovada. **Bol. Pneumol. Sanit.**, v. 6, n. 3, 1998.

TEPPER, R. E.; SIMON, D.; BRANDT, L. J. et al. Intestinal permeability in patients infected with human immunodeficiency virus. **Scand. J. Gastroent.**, v. 28, p. 573-580, 1994.

TRAVIS, S. & MENZIES, I. Intestinal permeability: funcional assessment and significance. **Clin. Sci.**, v. 82 , p. 471-488, 1992.

TURNER, M.; McGOWAN, C.; NARDELL, E. et al . Serum drugs leves in tuberculosis patients (abstracts). **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 149a , n. 527, 1994.

UETA, C. I.; TSUYUGUCHI, H.; KAWASUMI, H. et al. Increase of gama/delta cells in hospital workers who are in close contact with tuberculous patients. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 12, p. 5434- 5441,1994.

UKABAN, S. O.; COOPER, B. T. Small intestinal permeability to mannitol, lactulose and polyethylene glycol 400 in coeliac disease. **Dig. Dis. Sci.**, v. 29, p. 809- 816, 1984.

ULLRICH, R.; ZEITZ, M.; HEISE, W. et al. Small intestinal structure and function in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) : Evidence for HIV-induced enteropathy. **Ann. Intern. Med.**, v. 11, p. 15-21, 1989.

Van Der HULST, R. R.; Von MEYENFELDT, M. F.; Van KREEL, B. K.; THUNNISSEN, F. B.; BRUMMER, R. J.; ARENDS, J. W. Gut permeability, intestinal morphology, and nutritional depletion. **Nutrition**, v. 14, n. 1, p. 1-6, jan. 1998.

Van EMBDEN, J. D.; CAVE, M. D.; CRAWFORD, J. T.; DALE, J. W.; EISENBACH, K. D.; GICQUEL, P. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprint : recommendations for a standartized methodology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 406-409, 1993.

Van RIE, A.; WARREN, R.; MSHANGA, I. et al. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high incidence community. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 636-641, 2001.

VERKMAN, A. S. Mechanisms and regulation of water permeability in renal epithelia. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. C837-C850, 1989.

VRUWINK, K. G.; HEEN C. L.; GERSHWIN, M. E.; MARESCHI, J. P. & HURLEY L. S.: **The effect of experimental zinc deficiency on development of the immune system. In Nutrient modulation of the immune response.** Ed Cunningham-Rundles, S.; Marcel Dekker Inc, New York, NY 1993. p. 263-279.



WALKER, E.; CASTEGNARO, M.; GARREN, L.; TOUSSAIN, G. & KOWALSKI, B. Intake of volatile nitrosamines from consumption of alcohols. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 63, p. 947-951, 1979.

WALLAERT, B.; COLOMBEL, J. F.; ADENIS, A.; MARCHANDISE, X.; HALLGREN, R.; JANIN, A.; TONNEL, A. B. Increased intestinal permeability in active pulmonary sarcoidosis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 145, n. 6, p. 1440-5, Jun. 1992.

WALLAERT, B.; COLOMBEL, J. F.; TONNEL, A. B. et al. Evidence of lymphocyte alveolitis in Crohn's disease. **Chest**, v.87, p. 363-7, 1985.

WEIS, S. E.; SLOCUM, P. C.; BLAIS, F. X. et al. The effect of directly observed therapy on the rates of drug resistance and relapse in tuberculosis. **New Engl. J. Med.**, v. 330, p. 1179, 1994.

WELSH, F. K. S. ; FARERY, S. M. ; MacLENNAN, K.; SHERIDAN, M. B.; BARCLAY, G. R.; GUILLOU, P. J.; REYNOLDS, J. V. Gut barrier fuction in malnourished patients. **Gut**, v. 42, n. 3, p. 396-401, mar. 1998a.

WELSH, F. K.; RAMSDEN, C. W.; MacLENNAN, K.; SHERIDAN, M. B.; BARCLAY G. R.; GUILLOU, P. J.; REYNOLDS, J. V. Increased intestinal permeability and altered mucosal immunity in cholestatic jaundice. **Ann. Surg.**, v. 227, n. 2, p. 205-12 , feb.1998b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . Internacional Union Against Tuberculosis and Lung Disease / World Health Organization. The promise and reality of fixed-dose combination with rifampicin . **Tubercle Lung Dis.**, v. 75, p. 180-181, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Expert committee on physical status: the use and interpretation of anthropometry.* (WHO Technical Report Series, 854). Geneva, 1995. 451p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- DOTS :Directly Observed Treatment Short-Course. Use DOTS more widely- Global Tuberculosis Programme,1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.-INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASES. **Antituberculosis drug resistance in the world.** Geneva:WHO, 1994-1997, v. 1, 1997.

YONEDA, T. Nutritional status and support in chronic intractable pulmonary tuberculosis. **Kekkadu**, v. 71, n. 1, p. 57-63, Jan. 1996.

ZENT, C.; SMITH, P. Study of the effect of concomitant food on bioavailability of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide. **Tubercle Lung Dis.**, v. 76, p. 109-113, 1995.

ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B. et al . The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. **Nature**, v. 358, n. 6387, p. 591-593, Aug. 1992.

## **8. ANEXOS**

**ANEXO A****FICHA DE PROTOCOLO CLÍNICO**

NOME: \_\_\_\_\_ FICHA nº \_\_\_\_\_ REG.: \_\_\_\_\_

IDADE: \_\_\_\_\_ SEXO: \_\_\_\_\_ DATA \_\_\_\_\_ INÍCIO TRAT \_\_\_\_\_

TRATAMENTO  1  2  3 OU + ESQUEMA \_\_\_\_\_

BACILOSCOPIA +  CULTURA +  
 TESTE SENSIBILIDADE  NÃO  SIM RESIST  R  H  PZA

PROCEDÊNCIA  ZONA RURAL  ZONA URBANA  S/NFORRENDA  < 1 Sm  2 > R > 1 Sm  > 2 Sm  S/ INFORINSTRUÇÃO  ANALF  1º GRAU  2º GRAU  3º GRAU >  S/ INFORUSO DE FUMO  NÃO  SIM  LEVE  MODERADO  PESADOUSO DE ALCOOL  NÃO  SIM  OCASIONAL  F SEM  DIÁRIOUSO DE OUTRAS DROGAS  NÃO  SIM QUAL \_\_\_\_\_SOROLOGIA P/ HIV  NEGATIVA  NÃO REALIZADO

PESO HABITUAL \_\_\_\_\_ PESO ATUAL \_\_\_\_\_ ALTURA \_\_\_\_\_

ÍNDICE DE MASSA CORPORAL \_\_\_\_\_ AGS \_\_\_\_\_

CIRCUNFERÊNCIA DA PARTE MÉDIA SUPERIOR DO BRAÇO \_\_\_\_\_

ESPESSURA PREGA TRICIPITAL \_\_\_\_\_ PREGA SUBESCAPULAR \_\_\_\_\_

**TESTE DA PERMEABILIDADE INTESTINAL**

INÍCIO : \_\_\_\_\_ FINAL : \_\_\_\_\_ VOL URINA : \_\_\_\_\_

TX LACTULOSE : \_\_\_\_\_ TX MANITOL : \_\_\_\_\_ RELAÇÃO L / M \_\_\_\_\_

**BIODISPONIBILIDADE DROGAS ANTITUBERCULOSE**

Droga	Cmax 2 horas (µg/mL)	Faixa terapêutica (µg/mL)
Isoniazida		3.0-5.0
Rifampicina		8.0-24.0

## ANEXO B

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Responsáveis: Dra Valeria Góes Ferreira Pinheiro, Dra Helena Serra Azul Monteiro, Dr Aldo Ângelo Moreira Lima.

O abaixo-assinado (Nome, idade, nº do prontuário e unidade de atendimento), declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supra-citado, de responsabilidade dos médicos Valeria Góes Ferreira Pinheiro, Dra Helena Serra Azul Monteiro, Dr Aldo Ângelo Moreira Lima.

O abaixo-assinado está ciente que:

i - O objetivo da pesquisa é analisar a FISILOGIA INTESTINAL E REPERCUSSÕES SOBRE A ABSORÇÃO DE DROGAS ANTITUBERCULOSE em pacientes com Tuberculose Pulmonar

ii - Não poderá fazer uso de álcool durante no dia do estudo nem no anterior. Em caso de qualquer dúvida, será esclarecido pelos responsáveis da pesquisa.

iii - Durante o estudo, você será acompanhado por 8 horas, Será inicialmente coletada 1 amostra de sangue de 8 mL através de butterfly heparinizado. Logo depois, administrado em jejum, pela boca em dose única, 20 mL de uma solução contendo 2 tipos de açúcares de prova (5 g de lactulose e 1 g de manitol dissolvidos em água). Em seguida será administrada a dose de medicação antituberculose conforme o seu peso. Sua urina será colhida durante 5 horas e enviada posteriormente ao Laboratório para a dosagem desses açúcares.

Após 2 horas nova amostra de sangue será colhida. As amostras de sangue serão destinadas aos seguintes exames:

A) Análise hematológica: hemoglobina, hematócrito, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas.

B) Análise Bioquímica: uréia, creatinina, bilirrubina total, proteína total, albumina, globulinas, glicose em jejum, fosfatase alcalina, SGOT, SGTP, tempo de protombina.

C) Análise Imunológica: citocinas IL-1 e IL-8

D) Análise Sorológica para: HIV.e

E) Dosagem dos medicamentos no sangue

Amostras de fezes deverão ser colhidas para identificação de agentes patogênicos outras substâncias, tipos celulares ou enzimas que interessam à pesquisa. Amostras de seu escarro serão enviadas ao Laboratório Central para exame de cultura e teste de sensibilidade do bacilo aos medicamentos da tuberculose. Sua urina será testada para a dosagem de açúcares que você ingeriu.

iv - A administração oral de 20 mL de uma solução contendo esses 2 tipos de açúcares (de lactulose e de manitol), não costuma ter efeito colateral . Mas deve ser lembrado que a administração de qualquer substância pode causar reações imprevisíveis.

v – A sua participação neste estudo não tem objetivo de se submeter a um tratamento terapêutico.

vi. - Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido estudo.

viii - Tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento médico desta Instituição.

ix - A sua desistência não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe do Programa de Controle da Tuberculose da sua Unidade de Saúde.

x – Sua identidade, bem como os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, para qualquer pessoa alheia a pesquisa ou por ocasião da exposição e/ou publicação dos resultados.

xi – Não receberá qualquer pagamento por sua livre participação nesse estudo

Fortaleza,

---

Assinatura do voluntário

Dra Valeria Góes Ferreira Pinheiro – 278 6211

Dra Helena Serra Azul Monteiro - 2888437

Dr Aldo Ângelo Moreira Lima. -2888437

**ANEXO C**

Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

**Of. N° 241/2001**

Fortaleza, 28 de setembro de 2001

**Protocolo n° 134/01**

**Pesquisador responsável:** Dra. Valéria Goes

**Dept°./Serviço:** Departamento de Medicina Clínica/UFC

**Título do Projeto:** “Estudo da fisiologia intestinal em pacientes com tuberculose pulmonar ativa repercussões sobre absorção de drogas antituberculose”

Levamos ao conhecimento de V.S<sup>a</sup>. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n°196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução n° 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 27 de setembro de 2001.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita em tinta preta de Mirian Parente Monteiro.

Dra. Mirian Parente Monteiro  
Coordenadora Adjunta do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
COMEPE/HUWC/UFC



