



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

THIAGO PINTO BRASIL

**ANÁLISE DAS MUTAÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS
DE 1ª E 2ª LINHAS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR**

FORTALEZA

2024

THIAGO PINTO BRASIL

ANÁLISE DAS MUTAÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS DE
1ª E 2ª LINHAS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Doenças infecto parasitárias.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B83a Brasil, Thiago Pinto.
ANÁLISE DAS MUTAÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS
DE 1ª E 2ª LINHAS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR / Thiago
Pinto Brasil. – 2024.
101 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota.

1. tuberculose. 2. droga-resistente à tuberculose. 3. genes de resistência. 4. sequenciamento
genômico completo.

CDD 571.9

THIAGO PINTO BRASIL

ANÁLISE DAS MUTAÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS DE
1ª E 2ª LINHAS DO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Doenças infecto parasitárias.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Elizabeth Clara Barroso
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Karla Valéria Batista Lima
Instituto Evandro Chagas (IEC)

Profa. Dra. Maria Jânia Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

À minha família, por acreditarem no meu zelo e empenho dedicados à minha educação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inesgotável de sabedoria e guia constante em minha jornada. Agradeço por Sua graça, que foi de fundamental importância para que eu pudesse superar todos os desafios e alcançar este marco acadêmico.

À minha família, de onde, obtenho o apoio incondicional, o amor constante e lições valiosas. Agradeço por serem a força que impulsiona meus sonhos, pelos conselhos sábios, e pelo suporte inabalável. Vocês são a base sólida e o porto seguro ao longo da minha vida.

À Instituição CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, pelo apoio financeiro, com a manutenção da bolsa de auxílio.

À minha orientadora, Doutora Cristiane Frota, pela paciência, dedicação, orientação, incentivo, assim como por todo o conhecimento transmitido no decorrer deste percurso acadêmico. Sua expertise e determinação foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço a inspiração, apoio constante e valiosas contribuições que moldaram não apenas este projeto, mas também o meu crescimento como pesquisador.

À professora Karla Valéria e toda a sua equipe da Seção de Bacteriologia e Micologia (SABAC) do Instituto Evandro Chagas (IEC) - Davi Marcon, Isabel Montoril, Marcos Jessé, Pabllo Antonny e Vera Cordeiro, onde fui muito bem recebido para a realização de uma etapa fundamental desta pesquisa.

Ao técnico Sandro Patroca por sua habilidade excepcional e dedicação ao executar o sequenciamento de DNA. O seu profissionalismo foi fundamental para o sucesso desse importante projeto.

Estendo meus sinceros agradecimentos aos amigos do Laboratório de Micobactérias da UFC: Soraya de Oliveira Sancho, Maria do Socorro Silva, Thales Campelo, Paulo Rafael, Lucas Romão, Claudinha e João. Sua colaboração, seja de maneira direta ou indireta, foi fundamental durante todo o processo de desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus amigos, Caroliny Soares, Gabriel Castro, Nadine Salgueiro, Carol Martello, Bruno Frota, Vítor Marcelo, Karol Roger e Mariana Menezes, por todo incentivo e apoio. A amizade de vocês tem sido um constante suporte, repleto de risos, compreensão e inestimáveis momentos compartilhados. Cada um de vocês contribuiu de maneira única para minha jornada. Agradeço por estarem ao meu lado, fortalecendo os laços que nos mantem juntos. Esta jornada é ainda mais especial com a presença de cada um de vocês.

À Valéria Cordeiro, a quem carinhosamente chamo de 'Val', por toda a assistência prestada, sempre disposta a ajudar em cada pedido de socorro. Todo o auxílio e explicações foram muito importantes para que eu pudesse chegar à finalização desse ciclo.

Também quero dedicar meu agradecimento aos amigos da turma de mestrado, Camylla Almeida, Janaína Moraes, Thiago Gomes, Vitor Caetano e Gérson Fernandes, pelas reflexões, críticas e sugestões valiosas que compartilharam. Além disso, agradeço por sempre estarem disponíveis para me ouvirem nos momentos de maior estresse. O apoio generoso de vocês desempenhou um papel fundamental em minha jornada, servindo como alicerce sólido ao longo desses anos.

“Se faltar calor, a gente esquenta. Se ficar pequeno, a gente aumenta. E se não for possível, a gente tenta” (Engenheiros do Hawaii).

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma patologia infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), sendo classificada como uma doença negligenciada. Pesquisas epidemiológicas apontam para altas taxas de mortalidade e incidência de TB em escala global. Mutações no genoma do Mtb, em genes como *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC*, *gyrA*, *pncA*, *embB*, *rpsL*, *gidB*, *rrS*, *ethA* e *Rv1258c*, são responsáveis por diminuir a suscetibilidade à fármacos específicos utilizados no tratamento. Essa resistência medicamentosa é considerada um problema de saúde pública importante, envolvendo a doença, pois implica em várias consequências como o aumento da morbidade e mortalidade, dificuldade de tratamento e desafios de controle da doença. Dentro deste contexto, a presente pesquisa avaliou o perfil de mutações associadas à resistência aos fármacos antituberculose na TB pulmonar de participantes atendidos em hospital de referência em Fortaleza, Ceará. A amostragem foi feita por conveniência e 100% dos isolados (33/33) clínicos de TB pulmonar, incluídos neste estudo, foram resistentes a pelo menos um fármaco. Do total das amostras, 24 apresentaram dados clínicos completos. Destes, 95,8% (23/24) possuíam um perfil fenotípico de resistência para isoniazida e 83,3% (20/24) para rifampicina. Vários dados sociodemográficos, de comorbidade e hábitos de vida, bem como as características clínicas, foram avaliados e comparados com o perfil de resistência, não sendo identificados resultados significantes. Dos 33 isolados, através da técnica reação em cadeia da polimerase multiplex alelo específica (PCR-MAS), 32 apresentaram mutações genéticas, correspondendo a uma taxa de 97% (32/33). Essas mutações foram indicativas de resistência para os seguintes fármacos: rifampicina, isoniazida, estreptomicina, etambutol e fluoroquinolonas. Apenas 24,2% isolados (8/33) apresentaram o DNA íntegro para o Sequenciamento Genômico Completo (WGS) e todos pertenciam à linhagem 4 do complexo Mtb. Com relação à sublinhagem, cerca de 50% (4/8) pertenciam ao subgrupo 4.3.4.1. Das oito amostras avaliadas pelo WGS, foi identificada uma taxa de resistência de 62,5% (5/8), e essas mutações encontradas sugerem resistência à rifampicina, isoniazida, estreptomicina e etionamida. Entre os isolados estudados, detectamos uma alta prevalência de resistência aos principais fármacos utilizados no tratamento da TB, rifampicina e isoniazida. O estudo destaca a relevância da vigilância genômica do Mtb para entender e combater a resistência antibiótica, além de desenvolver medidas eficazes de controle, prevenção e tratamento da tuberculose.

Palavras-chave: tuberculose; droga-resistente à tuberculose; genes de resistência; sequenciamento genômico completo.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), classified as a neglected disease. Epidemiological research points to high mortality and incidence rates of TB on a global scale. Mutations in the Mtb genome, in genes such as *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC*, *gyrA*, *pncA*, *embB*, *rpsL*, *gidB*, *rrS*, *ethA*, and *Rv1258c*, are responsible for decreasing susceptibility to specific drugs used in treatment. This drug resistance is considered a significant public health problem associated with the disease, as it results in several consequences, such as increased morbidity and mortality, treatment difficulties, and disease control challenges. In this context, the present research evaluated the mutation profile associated with antituberculosis drug resistance in pulmonary TB patients treated at a referral hospital in Fortaleza, Ceará. Sampling was done by convenience, and 100% of the clinical isolates (33/33) of pulmonary TB included in this study were resistant to at least one drug. Of the total samples, 24 had complete clinical data. Of these, 95.8% (23/24) had a phenotypic resistance profile to isoniazid and 83.3% (20/24) to rifampicin. Various sociodemographic data, comorbidities, lifestyle habits, and clinical characteristics were evaluated and compared with the resistance profile, with no significant results identified. Of the 33 isolates, 32 presented genetic mutations via allele-specific multiplex polymerase chain reaction (PCR-MAS), corresponding to a rate of 97% (32/33). These mutations indicated resistance to the following drugs: rifampicin, isoniazid, streptomycin, ethambutol, and fluoroquinolones. Only 24.2% of isolates (8/33) had intact DNA for Whole Genome Sequencing (WGS), and all belonged to lineage 4 of the Mtb complex. Regarding sublineage, about 50% (4/8) belonged to the 4.3.4.1 subgroup. Among the eight samples evaluated by WGS, a resistance rate of 62.5% (5/8) was identified, and these mutations suggested resistance to rifampicin, isoniazid, streptomycin, and ethionamide. Among the isolates studied, we detected a high prevalence of resistance to the main drugs used in TB treatment, rifampicin and isoniazid. The study highlights the relevance of genomic surveillance of Mtb to understand and combat antibiotic resistance, as well as to develop effective measures for the control, prevention, and treatment of tuberculosis.

Keywords: tuberculosis; drug-resistant tuberculosis; resistance genes; whole genome sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura da parede celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
Figura 2 - Tendência global nas notificações de casos de pessoas recém-diagnosticadas com tuberculose, 2015-2021.....	17
Figura 3 – Estimativa da incidência da tuberculose em 2022	18
Figura 4 – Incidência e números de casos novos da TB no Brasil, período de 2013 a 2023 ...	19
Figura 5 – Registro de casos novos de TB-DR no Brasil, período de 2015 a 2023	20
Figura 6 – Incidência e número de casos novos de TB no Ceará, 2010 a 2023	20
Figura 7 – Taxa de mortalidade e número de óbitos. Ceará, 2010 a 2023.....	21
Figura 8 – Notificações de TB-DR. Ceará, 2015 a 2022.....	21
Figura 9 – Fluxograma do estudo	33
Figura 10 – Fluxograma dos isolados clínicos	34
Figura 11 – Esquema de amplificação tipo alelo específico com os iniciadores do gene <i>inhA</i> para identificação da mutação C15T	41
Figura 12 – Baciloscopia de colônia de <i>M. tuberculosis</i>	50
Figura 13 – Visualização do produto de amplificação da região genômica <i>IS6110</i> de isolados positivos para a espécie <i>M. tuberculosis</i>	50
Figura 14 – Corrida eletroforética dos produtos da PCR-MAS para análise da mutação C15T localizada no gene <i>inhA</i>	51
Figura 15 – Análise da contagem das leituras dos oitos isolados de <i>M. tuberculosis</i> sequenciados por WGS fornecida pelo software FASTQC	58
Figura 16 – Representação da árvore filogenéticas dos isolados de <i>M. tuberculosis</i>	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Percentual de amostras com o perfil fenotípico de resistência à isoniazida (H) e rifampicina (R)	44
Gráfico 2 – Número de amostras com mutações nos genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>oxyR-ahpC</i> , <i>gyrA</i> , <i>pncA</i> , <i>embB</i> , <i>rpsL</i> , <i>gidB</i> , <i>rrS</i> , <i>ethA</i> e <i>Rv1258c</i> detectadas através de técnica PCR-MAS	52
Gráfico 3 – Frequência das mutações relacionadas à resistência à rifampicina em isolados TB-R (N=24), detectadas por PCR-MAS	54
Gráfico 4 – Frequência das mutações relacionadas a resistência à isoniazida, detectadas por PCR-MAS dentre as 23 mutações pontuais	55
Gráfico 5 – Frequência das mutações relacionadas à resistência ao etambutol, detectadas por PCR-MAS	56
Gráfico 6 – Frequência das mutações relacionadas à resistência à estreptomicina, detectadas por PCR-MAS	57
Gráfico 7 – Classificação dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> de acordo com a sublinhagem identificada pelo WGS	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes relacionados à resistência aos medicamentos de 1ª e 2ª linhas utilizados no tratamento da tuberculose	26
Tabela 2 – Iniciadores para reação da PCR da sequência <i>IS6110</i> do <i>M. tuberculosis</i>	38
Tabela 3 - Número de acesso dos genes hospedados no GenBank	39
Tabela 4 – Iniciadores alelo específicos para a técnica PCR-MAS dos genes investigados	40
Tabela 5 – Padrão de resistência aos fármacos anti-TB dos isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> de 24 participantes com TB pulmonar	45
Tabela 6 – Dados sociodemográficos dos 24 participantes com TB pulmonar DR, Fortaleza, Ceará-Brasil	46
Tabela 7 – Características relativas a comorbidades e hábitos sociais dos 24 participantes diagnosticados com TB pulmonar DR, Fortaleza, Ceará-Brasil.....	47
Tabela 8 – Características clínicas dos 24 participantes diagnosticados com TB pulmonar DR, Fortaleza, Ceará-Brasil	48
Tabela 9 – Frequência das mutações encontradas nos genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>oxyR-ahpC</i> , <i>gyrA</i> , <i>pncA</i> , <i>embB</i> , <i>rpsL</i> , <i>gidB</i> , <i>rrS</i> , <i>ethA</i> e <i>Rv1258c</i> nos isolados dos 33 participantes com TB pulmonar	53
Tabela 10 - Número de mutações presentes no gene <i>Rv1258c</i> relacionado à bomba de efluxo associados aos perfis de resistência em 24 isolados de <i>M. tuberculosis</i> com teste de sensibilidade aos antimicobacterianos	57
Tabela 11 – Identificação das mutações através das técnicas de WGS e PCR-MAS dos 8 isolados de <i>M. tuberculosis</i>	61
Tabela 12 – Comparação das mutações nos genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>oxyR-ahpC</i> , <i>gyrA</i> , <i>pncA</i> , <i>embB</i> , <i>rpsL</i> , <i>gidB</i> , <i>rrS</i> , <i>ethA</i> e <i>Rv1258c</i> e fenótipo de resistência em isolados de <i>M. tuberculosis</i> resistentes aos fármacos, Fortaleza, Ceará	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI	Amicacina
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
CAN	Canamicina
CAP	Capreomicina
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
COVID-19	Doença do coronavírus
E	Etambutol
Et	Etionamida
H	Isoniazida
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HM	Hospital de Messejana
ILTB	Infecção latente por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-MAS	Reação em cadeia da polimerase multiplex alelo específica
R	Rifampicina
S	Streptomicina
TB	Tuberculose
TB-DR	Tuberculose droga resistente
TBE	Tris Borato EDTA
TB-MDR	Tuberculose multirresistente
TBP	Tuberculose pulmonar
TB-RR	Tuberculose resistente a rifampicina
TB-XDR	Tuberculose com resistência extensiva
TRM-TB	Teste rápido molecular para tuberculose
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
WGS	Sequenciamento Genômico Completo
Z	Pirazinamida

LISTA DE SÍMBOLOS

x	Vezes
μm	Micrômetro
%	Porcentagem
^a	Indicador ordinal
®	Marca registrada
<	Menor que
N ^o	Número
°C	Grau Celsius
mL	Mililitro
mg	Miligrama
ng	Nanograma
pMol	Picomole
H ₂ O	Água
V	Volt
A	Ampere
mM	Milimolar
kb	Quilobase
>	Maior que
≥	Maior ou igual a
+	Mais
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual a
p	Probabilidade de significância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
1.2	Epidemiologia no mundo	17
1.3	Epidemiologia no Brasil	18
1.4	Epidemiologia no Ceará	20
1.5	Diagnóstico da tuberculose pulmonar	22
1.6	Tratamento	23
1.7	Resistência aos antimicobacterianos	24
1.8	Mecanismos de resistência	24
1.8.1	<i>Mecanismo de resistência adquirida do M. tuberculosis</i>	24
1.9	Genes de resistência	27
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo Geral	31
2.2	Objetivos Específicos	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Desenho do estudo	32
3.2	Local do estudo	32
3.3	População e fluxograma do estudo	32
3.4	Tamanho da amostra	33
3.5	Critérios de inclusão	34
3.6	Critérios de exclusão	34
3.7	Análise estatística	35
3.8	Aspectos éticos	35
3.9	Cultivo primário e teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas	35
3.10	Subcultivo das amostras estocadas no biorrepositório e inativação celular	36
3.11	Baciloscopia	36
3.12	Extração do DNA genômico	37
3.13	Identificação de <i>M. tuberculosis</i> pela amplificação de <i>IS6110</i>	38
3.14	Identificação das mutações nos genes <i>rpoB</i>, <i>katG</i>, <i>inhA</i>, <i>oxyR-ahpC</i>, <i>gyrA</i>, <i>pncA</i>, <i>embB</i>, <i>rpsL</i>, <i>gidB</i>, <i>rrS</i>, <i>ethA</i> e <i>Rv1258c</i>	39

3.14.1	<i>Condições da PCR-MAS</i>	41
3.15	Eletroforese de detecção dos produtos dos genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> , <i>inhA</i> , <i>oxyR-ahpC</i> , <i>gyrA</i> , <i>pncA</i> , <i>embB</i> , <i>rpsL</i> , <i>gidB</i> , <i>rrS</i> , <i>ethA</i> e <i>Rv1258c</i>	42
3.16	Sequenciamento Genômico Completo (WGS).....	42
3.17	Análise dos dados obtidos com o WGS	43
4	RESULTADOS	44
4.1	Perfil fenotípico dos isolados clínicos aos fármacos de primeira linha, rifampicina (R) e isoniazida (H)	44
4.2	Características dos participantes	45
4.2.1	<i>Indicadores sociodemográficos</i>	45
4.2.2	<i>Características relacionadas a comorbidades e hábitos sociais</i>	46
4.2.3	<i>Características clínicas</i>	48
4.3	Identificação dos isolados como espécie <i>M. tuberculosis</i>	49
4.4	Genotipagem da resistência a medicamentos anti-TB	51
4.4.1	<i>Análise das mutações presentes nos genes <i>rpoB</i>, <i>katG</i>, <i>inhA</i>, <i>oxyR-ahpC</i>, <i>gyrA</i>, <i>pncA</i>, <i>embB</i>, <i>rpsL</i>, <i>gidB</i>, <i>rrS</i>, <i>ethA</i> e <i>Rv1258c</i> através da técnica PCR-MAS</i>	51
4.5	Mutações identificadas por meio da PCR-MAS em isolados com perfil fenotípico de resistência à rifampicina	53
4.6	Mutações identificadas por meio da PCR-MAS em isolados com perfil fenotípico de resistência à isoniazida	54
4.7	Mutações identificadas pela PCR-MAS em isolados com perfil fenotípico de resistência ao etambutol	55
4.8	Mutações identificadas por meio da PCR-MAS em isolados com perfil fenotípico de resistência à estreptomicina	56
4.9	Mutações identificadas por meio da PCR-MAS no gene <i>Rv1258c</i> em isolados com perfil fenotípico de resistência preestabelecido	57
4.10	Análise dos resultados do Sequenciamento Genômico Completo (WGS)	58
4.10.1	<i>Caracterização da linhagem dos isolados micobacterianos</i>	58
4.11	Alterações genéticas relacionadas a resistência aos fármacos antimicobacterianos, identificados por <i>whole genome sequencing</i>	60
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÃO	72

APÊNDICE A – TABELAS COMPARATIVAS ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES E A RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTI-TB.....	84
APÊNDICE B – PRODUÇÕES CIENTÍFICAS.....	86
ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO

Apontada como um problema sério de saúde pública global (QIN *et al.*, 2022), a tuberculose (TB) é classificada como uma patologia infecciosa cuja transmissão ocorre através da aspiração de gotículas contendo o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (RUIZ-TAGLE; NAVES; BALCELLS, 2020). Dentre as doenças infecciosas, sob o contexto mundial, a TB é tida como a doença dominante em ocasionar óbitos (FRANCO; PERI, 2021). Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), no período de 2016 a 2020, o Brasil foi uma das nações onde ocorreu muitos casos TB, bem como, da coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV é a sigla em inglês) (CONCEIÇÃO *et al.*, 2021).

A possibilidade de desenvolver a TB está relacionada à presença de vários fatores de riscos, sendo destacados: os indivíduos HIV positivos, com idade menor que dois anos ou maior que 60 anos e a presença de determinadas condições clínicas (comorbidades e/ou tratamentos imunossupressores) (NOUBIAP *et al.*, 2019). Alguns grupos populacionais estão em maior vulnerabilidade de exposição para a TB, tais como: pessoas vivendo em situação de rua, pessoas vivendo com o HIV, pessoas privadas de liberdade e indígenas. Esses grupos populacionais têm risco aumentado de adoecimento por TB variando de 3 vezes nos indígenas até 56 vezes nas pessoas vivendo em situação de rua, comparados a população em geral (BRASIL, 2019a).

Apesar da TB atingir principalmente o tecido pulmonar, ela ainda possui a capacidade de acometer quaisquer outros órgãos do corpo humano, como: coração, pâncreas, intestino, rins e bexiga (BAYKAN *et al.*, 2022). Dessa forma, a TB pode ser designada de três formas: pulmonar (a mais predominante), extrapulmonar e/ou mista (TAHAN; GABARDO; ROSSONI, 2020). Em grande parte dos pacientes, a sintomatologia pode se apresentar com febre vespertina, adinamia, sudorese noturna, perda de peso, bem como manifestações próprias no local infectado, no entanto, a tosse persistente representa o principal sintoma na forma pulmonar (TBP) (SILVA *et al.*, 2021). Na década de 1940, surgiram as primeiras terapias quimioterápicas que demonstraram eficácia contra a TB. Portanto, a disponibilidade destes medicamentos resultou na cura clínica da maioria dos pacientes. Contudo ao longo dos anos tem ocorrido aumento no número de isolados clínicos resistentes (DALBERTO *et al.*, 2020). A resistência aos fármacos no tratamento da TB leva a maior morbidade ao paciente, dificulta o tratamento e a prevenção da doença e aumenta a mortalidade (O'TOOLE, 2022). Sendo assim,

essa problemática configura uma emergência de saúde pública e um perigo à segurança sanitária (NUNES *et al.*, 2020).

1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

As micobactérias pertencem a ordem *Actinomycetales*, classe *Actinomycetes*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. Possuem taxa de crescimento lenta, em torno de 20 a 36 horas para a espécie Mtb. Quanto a estrutura das colônias, são verificadas diferenças entre as espécies da família, podendo apresentar pigmentação ou não, além de variar entre rugosa ou lisa (NATARAJAN *et al.*, 2020). Além disso, apresentam variação quanto ao diâmetro e comprimento, de 0,2 a 0,6 μm e de 1 a 10 μm , respectivamente. São caracterizadas por serem bacilos ligeiramente curvos ou retos, imóveis, que necessitam de oxigênio para o seu crescimento e não produzem esporos (AHAMAD; GUPTA; PARASHAR, 2022).

A família *Mycobacteriaceae* contém mais de 170 espécies (MEKONNEN *et al.*, 2021). Em 2018, a família foi dividida em cinco gêneros, o gênero *Mycobacterium* abrangendo o clado "Tuberculosis-Simiae", que inclui todos os principais patógenos humanos, e quatro gêneros novos, viz. *Mycolicibacterium* gen. nov., *Mycolicibacter* gen. nov., *Mycolicibacillus* gen. nov. e *Mycobacteroides* gen. nov. correspondendo aos clados "Fortuitum-Vaccae", "Terraе", "Triviale" e "Abscessus-Chelonae", respectivamente (GUPTA; LO; SON, 2018).

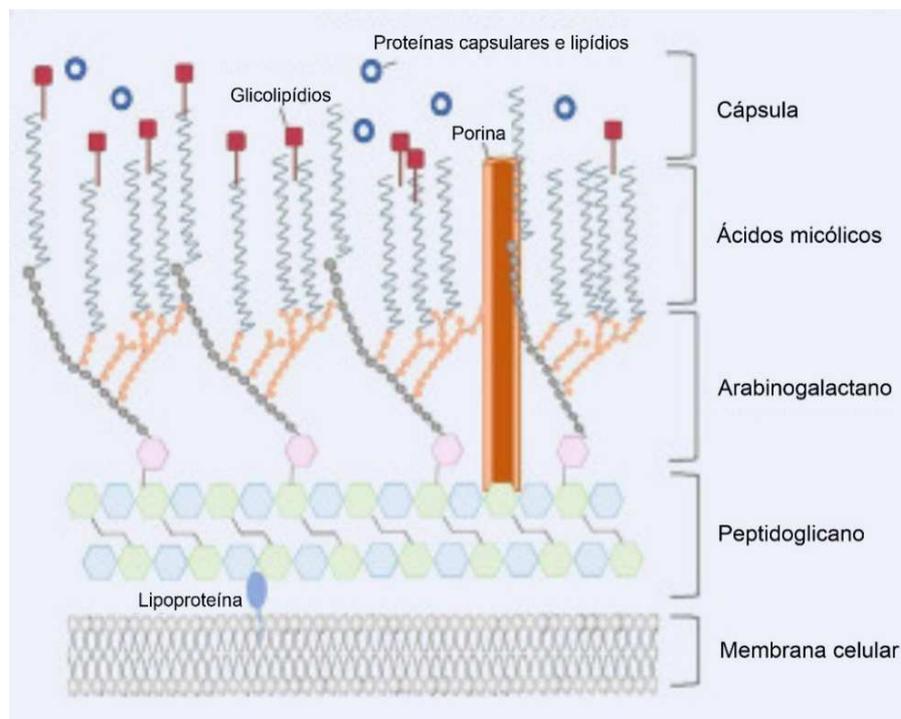
O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) compreende nove espécies geneticamente relacionadas que são responsáveis, sobretudo em ocasionar TB em mamíferos: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. mungi*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae* e *M. orygis*. As espécies mais relevantes em ocasionar a doença em humanos são o *M. tuberculosis* e *M. africanum* (ASARE *et al.*, 2021). As espécies do CMTB diferem quanto ao aspecto fenotípico, a habilidade de provocar doença e na predileção do hospedeiro (TULU; AMENI, 2018).

O bacilo do Mtb foi visualizado pela primeira vez em 1882 pelo médico alemão Robert Koch, sendo conhecido como "Bacilo de Koch", ou simplesmente "BK". À vista disso, o médico iniciou vários experimentos como o cultivo da bactéria em soros de cordeiro e boi, além de conseguir reproduzir a doença em cobaias (KESTLER; TYLER, 2022). No entanto, embora a doença possa ser reproduzida em animais de laboratório, o homem é considerado o único hospedeiro natural e reservatório para o Mtb (EHRT; SCHNAPPINGER; RHEE, 2018).

A partir da coloração desenvolvida por Franz Ziehl e Friedrich Neelsen, conhecida

como coloração de Zeihl-Neelsen, vários aprimoramentos foram feitos com a finalidade de melhorar a identificação do microrganismo. O bacilo possui uma estrutura de parede celular característica, que a diverge das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A parede é constituída por um alto teor de lipídeos e derivados lipídicos, em especial ácidos micólicos, ligados a moléculas arabinogalactanos (Figura 1). A camada espessa de lipídeos confere à parede celular bacteriana resistência à descoloração com solução álcool-ácido após os bacilos serem corados com fucsina de Ziehl, dessa forma esses bacilos recebem a denominação de “bacilo álcool-ácido resistente” ou simplesmente BAAR (VILCHÈZE; KREMER, 2017).

Figura 1 – Estrutura da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*



Fonte: XU *et al.* (2022, com adaptações).

Além de atuarem como uma camada hidrofóbica, impedindo a permeabilidade de moléculas hidrossolúveis, as moléculas da parede também exercem papel na patogênese e sobrevivência da micobactéria. Tais propriedades fazem com que a síntese da parede micobacteriana também seja alvo de fármacos para o tratamento da doença (ABRAHAMS; BESRA, 2018).

1.2 Epidemiologia no mundo

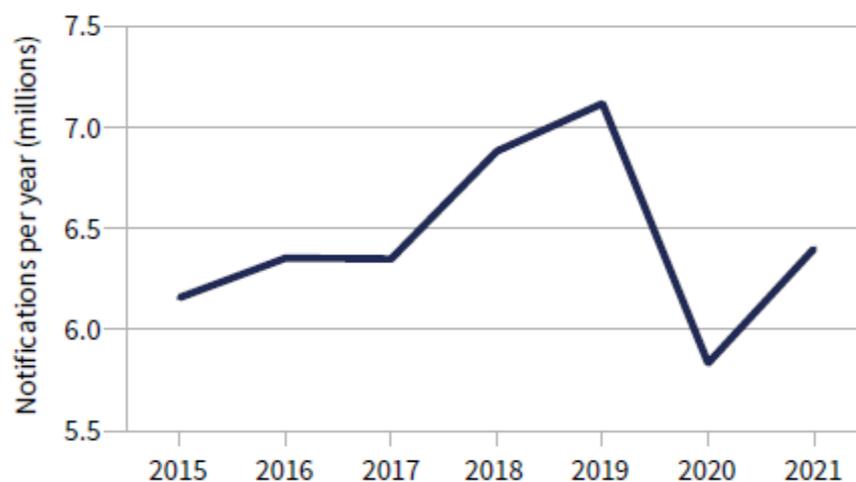
Dentre as doenças infecciosas, a TB é apontada como uma das principais causas de óbitos a nível global (ZAMPARELLI *et al.*, 2022). Com a alta letalidade provocada pela TB, a OMS propôs em 2015 a estratégia “Fim da TB”, que são propostas que têm por finalidade a redução, até o ano de 2035, do número de mortes e de casos novos de TB em 95% e 90%, respectivamente (WHO, 2021a).

É avaliado que cerca de 1,7 bilhão de pessoas ao redor do mundo estejam com a forma latente da doença. Indivíduos com a infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis* (ILTB) podem progredir para a forma ativa da doença nos primeiros 12 a 18 meses. A reativação da ILTB também pode ocorrer anos após a primeira infecção (GOPALASWAMY *et al.*, 2020).

A ausência de exames efetivos para o diagnóstico específico para ILTB e o aparecimento de TB resistente são alguns dos agravos considerados desafiadores para o controle da doença, causando prejuízos no que se refere à prevenção e tratamento (GONG *et al.*, 2022).

De acordo com a OMS, devido a pandemia da COVID-19, em 2020 houve uma redução no número de casos notificados de TB em comparação ao ano de 2019 (Figura 2). As reduções no número relatado de pessoas diagnosticadas com TB em 2020 e 2021, sugerem que o número de pessoas com TB não diagnosticadas e não tratadas aumentou, resultando primeiro no aumento da transmissão comunitária, seguido do aumento do número de mortes por TB (WHO, 2022).

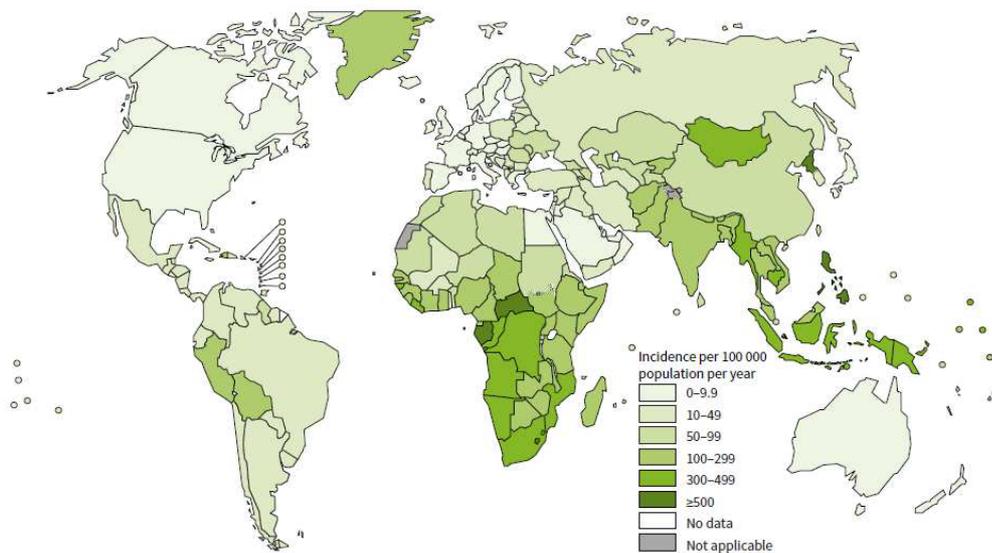
Figura 2 - Tendência global nas notificações de casos de pessoas recém-diagnosticadas com tuberculose, 2015-2021



Fonte: WHO (2022).

Em 2022, avaliou-se que, cerca de 10,6 milhões de pessoas, foram acometidas com TB, contraposto a 10,3 milhões em 2021 e 10 milhões em 2020, mantendo o recuo no declínio dos números ocasionados pelo impacto da pandemia da COVID-19. Além disso, também foi estimado um aumento na taxa de incidência de TB, um crescimento de 3,9% entre os anos de 2020 e 2022 (Figura 3), ou seja, houve redução de diagnóstico durante a pandemia e em 2022 já é observada uma melhora das taxas de detecção (WHO, 2023).

Figura 3 – Estimativa da incidência da tuberculose em 2022



Fonte: WHO (2023). Variação da taxa de novos casos de TB entre os países.

Em relação ao número de ocorrências referentes a TB drogarresistente (TB-DR), foi constatada uma redução de 22% nos anos de 2019 e 2020, apresentando um total de 157.903 novos casos, onde 132.222 correspondem a TB resistente à rifampicina (TB-RR) e TB multirresistente (TB-MDR), e 25.681 de TB com resistência extensiva (TB-XDR) ou TB-préXDR (TIBERI *et al.*, 2022).

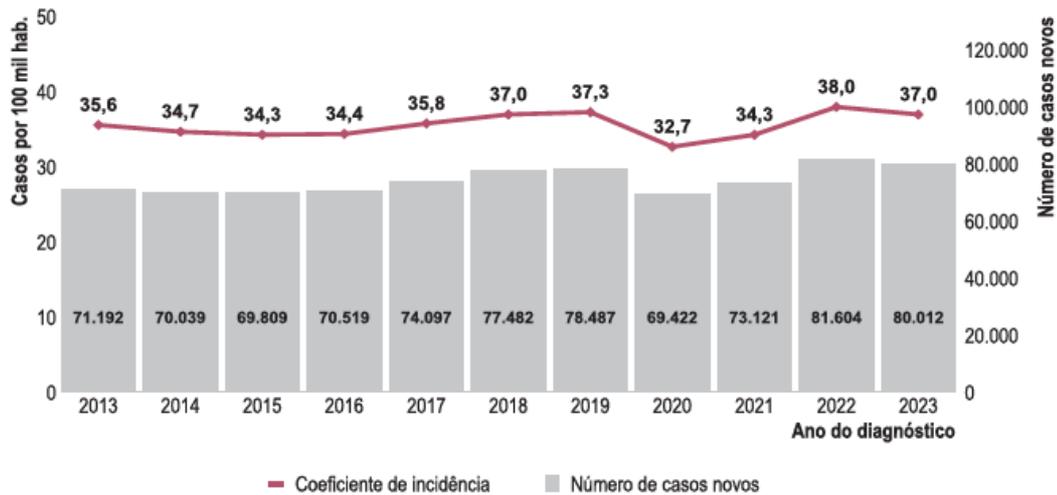
1.3 Epidemiologia no Brasil

No Brasil, foi observado um aumento do coeficiente de incidência da TB nos anos de 2016 a 2019 e depois, uma notável redução no ano de 2020, devido à pandemia da COVID-19 (BRASIL, 2023). Esta redução da detecção dos casos novos é justificada por alterações da oferta e da demanda dos serviços de diagnóstico e tratamento de TB. Dentre essas influências, é inferida a capacidade reduzida do sistema de saúde para continuar a fornecer serviços, a

diminuição da procura por atendimento no contexto de bloqueios e restrições associados à circulação de pessoas, as preocupações sobre os riscos de ir às unidades de saúde durante a pandemia e o estigma associado às semelhanças entre os sintomas relacionados à TB e à COVID-19 (BRASIL, 2022).

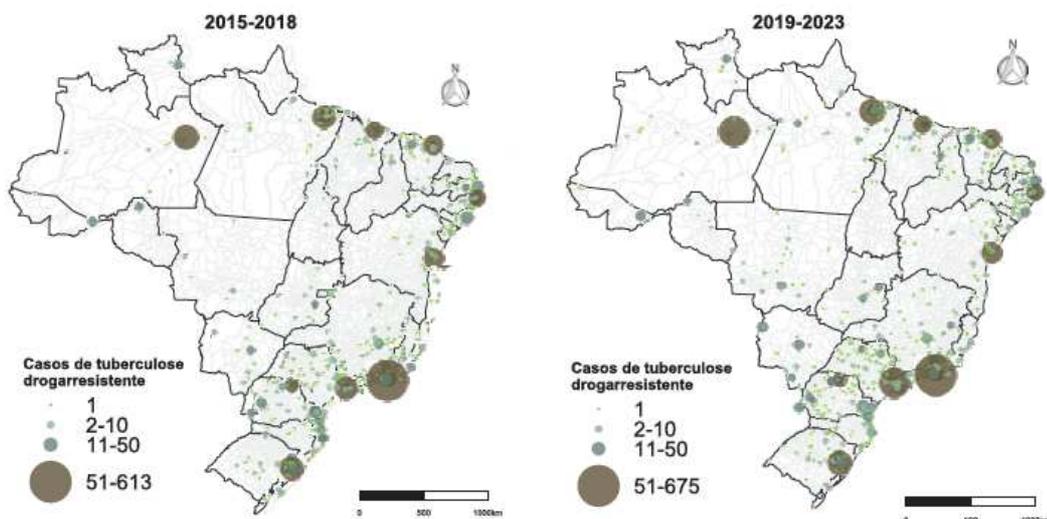
A partir de 2021, foi observada uma tendência crescente de TB. Em 2023, foi verificada uma redução no total de casos novos de TB registrados no Brasil em relação ao ano de 2022, totalizando 80.012 (Figura 4). Em 2023, as Unidades da Federação (UF) que apresentaram populações sob maior risco de adoecimento por TB foram Roraima (85,7 casos por 100 mil hab.), Amazonas (81,6 casos por 100 mil hab.) e Rio de Janeiro (70,7 casos por 100 mil hab.). Nos anos de 2015 a 2023, todos os estados do Brasil registraram casos de indivíduos portadores de TB-DR, apresentando uma maior relevância para as capitais (Figura 5) (BRASIL, 2024).

Figura 4 – Incidência e números de casos novos da TB no Brasil, período de 2013 a 2023



Fonte: BRASIL (2024).

Figura 5 – Registro de casos novos de TB-DR no Brasil, período de 2015 a 2023



Fonte: BRASIL (2024).

1.4 Epidemiologia no Ceará

De modo semelhante ao que ocorreu em todo o Brasil, em decorrência das medidas de contenção à pandemia do COVID-19, os serviços de saúde do estado do Ceará tiveram que priorizar os efeitos causados pela pandemia. Assim sendo, houve redução da notificação dos casos novos em 2020, seguido de aumento da incidência no ano de 2021 (CEARÁ, 2021). Em 2023, foi registrado um total de 4.103 casos novos de TB, sendo observada uma taxa de incidência ultrapassando a dos anos de 2018 e 2019 (Figura 6) (CEARÁ, 2024).

Figura 6 – Incidência e número de casos novos de TB no Ceará, 2010 a 2023



Fonte: CEARÁ (2024).

No período de 2014 a 2023, foram estimados 2.086 óbitos por TB, onde 236 desse montante se refere apenas ao ano de 2023 (Figura 7) (CEARÁ, 2024). No que se refere a TB-DR, o Ceará ocupa a 6ª posição entre os estados que mais notificam, e Fortaleza está na 7ª posição entre os municípios que mais registram TB-DR no país (Figura 8) (CEARÁ, 2023).

Figura 7 – Taxa de mortalidade e número de óbitos. Ceará, 2010 a 2023



Fonte: CEARÁ (2024).

Figura 8 – Notificações de TB-DR. Ceará, 2015 a 2022



Fonte: CEARÁ (2023).

1.5 Diagnóstico da tuberculose pulmonar

Para diagnosticar a TBP, que é a forma clínica ativa mais comum, são utilizadas amostras do trato respiratório, sendo o escarro o material mais recomendado, por poder ser coletado pelo próprio paciente e por não ser invasivo. Outros materiais clínicos são o lavado broncoalveolar, escarro obtido de forma induzida, aspirado traqueal ou ainda o fragmento pulmonar (SINGH; SAKET; KACHHI, 2019).

O exame de baciloscopia direta do escarro, através da coloração de Ziehl-Nielsen, por ser um método simples e seguro, é realizado nos laboratórios públicos de saúde e pelos laboratórios privados tecnicamente habilitados. É o método mais empregado para a identificação de casos de TBP (RAKOTOSAMIMANANA *et al.*, 2017) e recomendado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2019a). Em pacientes com amplas lesões cavitárias pulmonares, a sensibilidade da baciloscopia pode ser de até 80%. Entretanto, em pessoas que apresentam pequenas lesões cavitárias, a sua sensibilidade exibe uma variação em torno de 40 e 60% e em casos de coinfeção com o HIV a sensibilidade fica entre 20 e 60% (SILVA *et al.*, 2021).

A cultura microbiológica é mais uma ferramenta utilizada para o diagnóstico da TB. Esse procedimento é citado como padrão de referência para a identificação do Mtb, apresentando uma alta sensibilidade, sendo necessárias somente de 10 a 100 células bacterianas para positivar o teste. Contudo, a cultura em meios sólidos, que tem baixo custo, demanda um tempo prolongado para detecção do crescimento bacteriano, que pode variar de 14 a 30 dias, podendo estender-se por até oito semanas (SAKTIAWATI *et al.*, 2019). Como método alternativo, pode ser utilizado o cultivo em meios líquidos em métodos automatizados disponíveis no Brasil, entre eles MGIT[®], que reduz o tempo de resultado, variando entre 5 a 12 dias, quando positivo (SANTOS *et al.*, 2020).

Os testes que possuem como fundamento a amplificação de ácidos nucleicos, possibilitam um diagnóstico rápido para a TB, pois não há realização de cultivo, reduzindo o tempo do diagnóstico (ENGEL *et al.*, 2022). Além disso, esses ensaios genotípicos demonstram elevada especificidade na identificação das micobactérias, possibilitando a caracterização dos microrganismos pertencentes ao CMTB e os que são micobactérias não tuberculosas (MOREL *et al.*, 2020).

O teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB), disponível no Brasil e recomendado pelo Ministério da Saúde, é baseado na amplificação de ácidos nucleicos utilizado para detecção de DNA dos bacilos do CMTB e triagem de cepas resistentes à rifampicina (R)

pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). O teste é indicado para o diagnóstico de casos novos de TBP e laríngea em adultos e adolescentes, com sensibilidade de cerca de 90% sendo superior à da baciloscopia. O TRM-TB também pode ser utilizado para diagnóstico de TB extrapulmonar, nas amostras de líquido, gânglios linfáticos e outros tecidos, contudo a sensibilidade é bem inferior comparada a amostras pulmonares (BRASIL, 2019a).

1.6 Tratamento

No interior do macrófago o crescimento dos bacilos é lento ou intermitente, sendo denominados de latentes ou persistentes, e são responsáveis pelas recidivas da doença. Por conta da existência dessas populações bacilares, o tratamento da TB deve ser prolongado (COURA, 2013).

O esquema quimioterápico indicado para tratar pacientes com TB, além de demandar um tempo maior para a sua execução, pode ocasionar vários efeitos adversos, causando implicações tanto na adesão quanto na resposta terapêutica (HEYCKENDORF *et al.*, 2022). O esquema básico para casos novos ou retratamento de TB ativa, exceto forma meningoencefálica e ostearticular, tem duração de 6 meses. Os casos de ILTB em crianças, adolescentes e adultos <50 anos têm duração de 4 a 9 meses, dependendo do fármaco utilizado no regime terapêutico (BRASIL, 2019b).

O esquema básico terapêutico preconizado para TBP consiste na administração de isoniazida (H), R, etambutol (E) e pirazinamida (Z) por um período de 2 meses, chamado de fase intensiva, seguido por mais 4 meses, de manutenção, com R e H (SUÁREZ *et al.*, 2019). Ainda que a grande parte dos pacientes seja curada com o tratamento padrão, certos indivíduos apresentam falha terapêutica mesmo tendo adotado integralmente a terapia. Isso se dá, sobretudo, devido a aspectos, como: carga micobacteriana, hábito de fumar, má absorção do fármaco por ingestão de antiácidos e administração conjunta com carboidratos, portador do HIV e a existência de lesões cavitárias (GOOSSENS; SAMPSON; RIE, 2021).

Os esquemas especiais e esquemas para TB-DR incluem fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, oxazolidinonas, rimonofenazina, diarilquinolina (bedaquilina) e nitroimidazólicos (delaminid). Quando comparados as drogas de primeira linha, os fármacos de segunda linha e injetáveis possuem maior frequência de reações adversas, representando maior dificuldade na adesão ao tratamento (SINGH; CHIBALE, 2021).

É importante salientar que as chances de insucesso na terapia de pacientes com TB-DR são maiores quando comparadas a pessoas com TB sensível às drogas, bem como há uma necessidade maior de recursos a serem aplicados para a terapêutica (GÜNTHER; RUSWA; KELLER, 2022). Em casos de TB-DR ocorre a necessidade de fármacos complementares por um tempo maior de administração, contudo, com o advento de novas medicações como a bedaquilina e delamanid foi possível a elaboração de terapias em um intervalo de tempo menor para o tratamento de pessoas com TB-MDR (GOPALASWAMY *et al.*, 2020).

1.7 Resistência aos antimicobacterianos

Vários aspectos têm tornado possível a seleção de isolados de Mtb resistentes aos medicamentos, citam-se: a utilização inadequada dos fármacos no tratamento sem a aplicação de testes de suscetibilidade às drogas, menor aderência dos pacientes à terapia, uso de fármacos com menor eficácia esterilizante e transmissão de isolados Mtb resistentes (MASE; CHORBA, 2019).

Embora a monorresistência seja identificada para alguns medicamentos, como H, R e S, diversos isolados resistentes de Mtb apresentam resistência a no mínimo dois fármacos (ROSSINI; VINICIUS; DIAS, 2023).

Atualmente, com a finalidade de vigilância e tratamento, a TB resistente é classificada em: TB-RR que é a TB resistente à R identificada por meio do TRM-TB exclusivamente, TB-MDR que é TB multirresistente com resistência a pelo menos R e H e TB-XDR, TB com resistência extensiva (HORNE *et al.*, 2019). Essa última, TB-XDR é a resistência à R e H acrescida de resistência a fluoroquinolona (qualquer delas) e aos injetáveis de segunda linha amicacina (AMI), Canamicina (CAN) ou capreomicina (CAP) (LI; SUN; ZHANG, 2019).

1.8 Mecanismos de resistência

1.8.1 Mecanismo de resistência adquirida do *M. tuberculosis*

Nas condições ideais, nas lesões cavitárias da TB pulmonar formam-se grandes populações bacilares, com frequência variável, de subpopulações de bacilos com mutações genéticas que conferem resistência aos medicamentos usados no tratamento da TB (COURA,

2013). Contudo, se o esquema terapêutico é equivocado, realizado de maneira irregular, com doses inadequadas ou interrompido precocemente, cepas resistentes aos medicamentos podem ser selecionadas, caracterizando a resistência adquirida. Portanto, é importante a escolha do esquema terapêutico mais efetivo, adesão ao tratamento, realização de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos e monitoramento da resistência (WU *et al.*, 2022).

A ação das drogas é um estímulo ambiental captado pelo Mtb, e esse sinal pode também gerar uma cadeia de eventos que leva a mutações de genes-alvo, podendo derivar uma proteína modificada ou suprimir a sua expressão. Além disso, na ausência de mutações, mas havendo ação irregular de proteínas-alvo ou mudanças na expressão de fatores de transcrição, isso pode, da mesma forma, causar resistência ou um fenótipo de tolerância às drogas (ARORA *et al.*, 2021).

Os bacilos de Mtb são desprovidos de plasmídeos, portanto, a resistência se deve ao acúmulo de mutações pontuais, tais como: polimorfismos de nucleotídeo único ou pequenas inserções, assim como deleções e, de forma eventual, deleções ou inversões mais amplas (NIMMO *et al.*, 2022).

Atualmente, para qualquer fármaco utilizado no tratamento da TB, há registros de mutações em um ou múltiplos genes. Cada alteração genética está associada a níveis distintos de resistência às drogas. As frequências das mutações variam geograficamente e também de acordo com as populações de risco (Tabela 1) (NGUYEN *et al.*, 2019). Nos últimos anos diversas mutações gênicas ligadas à resistência às drogas pelo Mtb já tiveram a sua caracterização bem definida, e elas transcorrem de forma constante no alvo ou no ativador da droga (LI *et al.*, 2022). Em 2021, a OMS publicou um catálogo com as possíveis mutações relacionadas à resistência no Mtb (WHO, 2021b).

Tabela 1 – Genes relacionados à resistência aos medicamentos de 1ª e 2ª linhas utilizados no tratamento da tuberculose

Grupo	Fármaco	Gene relacionado à resistência	Função	Frequência da mutação em isolados (%)
1ª linha	Rifampicina	<i>rpoB</i> ,	Subunidade β da RNA polimerase	90–100
	Isoniazida	<i>katG</i>	catalase-peroxidase	40–97
		<i>inhA</i>	proteína transportadora enoil acil redutase	8–64
	Etambutol	<i>embB</i>	arabinosil transferase	47–89
	Pirazinamida	<i>pncA</i>	Pirazinamidase	44–97
	Estreptomicina		<i>rrs</i>	Subunidade 16S rRNA
<i>rpsL</i>			Proteína ribossomal S12	40–68
<i>gidB</i>			7-metilguanosina metiltransferase	5–13
2ª linha	Amicacina, Canamicina, Capreomicina	<i>rrs</i>	Subunidade 16S rRNA	40–90
		<i>eis</i>	Acetiltransferase ou proteína da sobrevivência intracelular melhorada	28–80
		<i>tlyA</i>	RNA metiltransferase	4–13
	Ofloxacina, Levofloxacina, Moxifloxacina, Gatifloxacina	<i>gyrA</i>	Subunidade A da DNA girase	70–90
		<i>gyrB</i>	Subunidade B da DNA girase	0–11
	Etionamida	<i>inhA</i>	proteína transportadora enoil acil redutase	33–62
		<i>ethA</i>	Monooxigenase ativadora da pró droga etionamida	46–72
		<i>ethR</i>	repressor transcricional	0–4

Fonte: Soundararajan *et al.* (2020, com adaptações).

1.9 Genes de resistência

Diversos métodos genotípicos são empregados para a detecção de genes alvo contendo mutação, estas mutações são chamadas de marcadores genéticos. Estes métodos diagnósticos são úteis para a identificação de cepas resistentes, citam-se: PCR, enzimas de endorrestrição, sequenciamento de Sanger e de genoma completo (RAMIREZ; VARGAS; DIAZ, 2020).

O gene *rpoB* é um marcador genético ligado à resistência ao fármaco R. A maioria dos isolados resistentes (90-95%) apresenta mutações na região determinante de resistência à R. O mecanismo subjacente aos 5% restantes ainda é desconhecido (LI *et al.*, 2021). Mutações no gene *rpoB*, associadas à resistência ao R, ocorrem no fragmento de 81 pares de bases (pb) da região determinante de resistência à R, mais especificamente nos códons 531, 526 e 516, entre os códons 507 e 533 (SEID; BERHANE; NUREDDIN, 2022).

As mutações no gene *katG* são as mais comuns associadas à resistência à H. (LEMPENS *et al.*, 2018).

Assim como a H, a etionamida (Et) é um pró-fármaco, ou seja, a molécula será convertida em sua forma ativa dentro do bacilo por ação da enzima KatG para H e EthA para Et, respectivamente. Os metabólitos formados se combinam com NAD⁺ e bloqueiam a proteína carreadora 2-trans-enoil-acil redutase que é vital para a produção dos ácidos micólicos (HO *et al.*, 2021).

A ativação da Et também pode ser realizada por outras proteínas, como Rv0565c, MymA, MshA e EthR2. Contudo, as alterações em EthA são encontradas em maior frequência nos isolados clínicos de Mtb resistentes a Et (DE SOUZA *et al.*, 2020). Enquanto KatG é codificada por *katG*, a EthA é codificada por *ethA* e a frequência de mutação nesse gene varia entre 37 e 100% em cepas de Mtb com resistência à Et (ISLAM *et al.*, 2019).

Consideradas drogas análogas, a H e a Et são capazes de provocar no Mtb uma labilidade no microambiente ácido, como no bloqueio da síntese de ácidos micólicos. Além da mutação C-15T, a mutação em *inhA* (S94A) também é capaz de ocasionar resistência cruzada a ambos os fármacos no Mtb (VILCHÈZE; JACOBS JR, 2014).

As mutações genéticas relacionadas à resistência à H ocorrem em múltiplos loci, sendo possível encontrá-las também no gene promotor do *inhA*, relacionado à alquil hidroperóxido redutase (*ahpC*) e na região intergênica, que abrange tanto o gene *oxyR* quanto o gene *ahpC* (*oxyR-ahpC*) (GUO; CHONGSUVIVATWONG; LEI, 2022).

O gene *pncA* é responsável por codificar a pirazinamidase, importante para a conversão da Z para o ácido pirazinóico, sendo este último a sua forma ativa, que atua na inibição da síntese de ácidos graxos das bactérias. Portanto, mutações associadas ao gene *pncA* estão relacionadas à resistência à Z (ANSARI *et al.*, 2023). Pertencente ao CMTB, todas as cepas de *M. bovis* apresentam uma resistência natural à Z, com mutações em *pncA*, sendo encontradas alterações na posição C16G (ANJOS *et al.*, 2022).

O E tem como alvo a parede celular bacteriana, interferindo na enzima arabinosil transferase, que é controlada pelo operon *embCAB* (*emBA*, *emBB* e *emBC*), e está relacionada a síntese de arabinogalactano e lipoarabinomanano. Sendo mais comum mutações no códon 306 do gene *embB* (MOHAMMADI *et al.*, 2020).

A estreptomicina (S) se une de forma estável aos componentes da subunidade ribossômica 30S, à proteína ribossômica S12 e ao rRNA 16S (KHOSRAVI *et al.*, 2017). Apesar de não está completamente claro o mecanismo molecular de resistência no Mtb à S, mutações nos genes *rpsL*, *rrs* e *gidB* codificadores da proteína ribossômica S12, 16S rRNA e 16S rRNA metiltransferase específica, respectivamente, podem resultar em resistência em cepas clínicas de Mtb (WANG *et al.*, 2019). A S tem como finalidade a inibição da síntese proteica em células bacterianas e as mutações mais comuns são encontradas na alça 530 do RNAr 16S alterada pela metilase codificada pelo gene *gidB* e na região 912 em *rrs*, ou ainda nos códons 43 ou 88 do gene *rpsL* (SMITTIPAT *et al.*, 2016).

Em relação aos fármacos injetáveis de segunda linha, a saber, AMI, CAN e CAP, as modificações no RNA ribossômico 16S, codificado pelo gene *rrs*, constitui o principal fator relacionado à resistência (KAMBLI *et al.*, 2016). Frequentemente, a alteração ribossômica A1401G em *rrs* está relacionada à resistência simultânea aos três fármacos (CONKLE-GUTIERREZ *et al.*, 2022).

As enzimas DNA topoisomerasas são alvos antibacterianos conhecidos, pois catalisam mudanças na topologia do DNA, pois alternam a forma superespiralada e relaxada do DNA, desempenhando um papel essencial na replicação, transcrição e transmissão do DNA e outros processos celulares. Estas enzimas são classificadas em tipo I e tipo II, baseado em diferenças de estrutura e de mecanismo. Ao contrário de outras espécies bacterianas, Mtb codifica somente um topoisomerase tipo II (ASHLEY *et al.*, 2017; MARURI *et al.*, 2012). Sua DNA girase é codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB* e possui funções de girase e topoisomerase IV. As fluoroquinolonas, usadas como segunda opção no tratamento TB-MDR, atuam inibindo a ação da DNA girase. Mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas são encontradas principalmente em *gyrA* em relação à *gyrB* (ANSARI *et al.*, 2023; MARURI *et al.*, 2012).

A proteína da bomba de efluxo Rv1258c, também conhecida como Tap ou P55, está situada na membrana celular bacteriana (JIA *et al.*, 2022a). Estes sistemas de exportação são proteínas transportadoras ativas essenciais para o metabolismo bacteriano e estão relacionadas com o estresse oxidativo e a captação de ferro. A proteína desempenha um papel crucial para o bacilo, excretando a proteína ESX-3 para captar ferro do meio intrabacteriano (SUN *et al.*, 2024). No entanto, é importante destacar que mutações no gene *Rv1258c*, especialmente nas posições V219A e S292L, foram associadas à resistência aos fármacos antituberculose (LIU *et al.*, 2019).

JUSTIFICATIVA

O advento da resistência aos medicamentos para o tratamento da tuberculose (TB) tem complicado o controle efetivo dessa doença. Isso pode levar a uma realidade onde tratamentos eficazes se tornem escassos. A ameaça que a resistência aos fármacos representa para os programas de controle da TB é notável. Assim, é essencial intensificar a vigilância da tuberculose droga resistente (TB-DR) através de pesquisas que apontem novas abordagens para o seu manejo (ASARE *et al.*, 2021).

Dado o risco que a TB representa para a saúde global e seu agravamento devido à propagação de cepas resistentes a antibióticos, é de fundamental importância a busca por conhecimentos associados a dados genéticos relacionadas a essa doença. Isso vai permitir aprofundar o entendimento sobre como essa enfermidade se desenvolve e se dissemina, com o propósito de aprimorar diagnósticos e tratamentos (COHEN *et al.*, 2019).

A TB-DR tem um relevante efeito financeiro sobre os pacientes devido à natureza complexa e a longa duração dos regimes de tratamento. Também é destacado o impacto econômico pela perda de empregos e da produtividade associados a fase intensiva inicial do tratamento (MCNALLY *et al.*, 2019).

Os estudos de vigilância genômica da TB-DR são, portanto, essenciais para identificar de modo precoce os casos de TB-DR, identificar novas mutações associadas à resistência, rastrear a disseminação da TB-DR, visto que permite monitorar as cepas persistentes e avaliar a eficácia das intervenções para o controle da doença. A resistência na TB é dinâmica, ou seja, o bacilo acumula mutações e desenvolve novas mutações à medida que aumenta o número de casos, ou há concentração geográfica de casos, além de sofrer interferência do tratamento empregado no paciente. Portanto, os estudos de monitoramento podem fornecer informações cruciais que serão usadas para desenvolver novos tratamentos, melhorar as estratégias de prevenção e rastrear a resistência. Além disso, outros estudos podem apoiar a criação de programas que intencionem o controle e a vigilância da TB-DR (NGABONZIZA *et al.*, 2022).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de mutações associadas à resistência aos fármacos antituberculose na TB pulmonar de participantes atendidos em hospital de referência em Fortaleza, Ceará.

2.2 Objetivos Específicos

- Relacionar as características sociodemográficas, história de tratamento prévio e variáveis clínicas à TB-DR;
- Investigar as mutações nos genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR*, *ahpC*, *gyrA*, *pncA*, *embB*, *rpsL*, *gidB*, *rrS*, *ethA* e *Rv1258c* nos isolados de Mtb da população estudada;
- Relacionar o perfil fenotípico de sensibilidade aos antibióticos às mutações gênicas identificadas dos isolados clínicos de Mtb;
- Identificar as mutações genéticas associadas à resistência antimicobacteriana e as linhagens filogenéticas dos isolados de Mtb.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo do tipo observacional e retrospectivo, no qual foram incluídos 33 isolados clínicos de Mtb, coletados no período de 2007 a 2018. Estas amostras fazem parte do biorrepositório do Laboratório de Micobactérias do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

3.2 Local do estudo

A pesquisa foi realizada nas entidades descritas abaixo:

- Laboratório de Micobactérias, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza-CE);
- Seção de Bacteriologia e Micologia (SABAC) do Instituto Evandro Chagas (IEC) (Belém-PA).

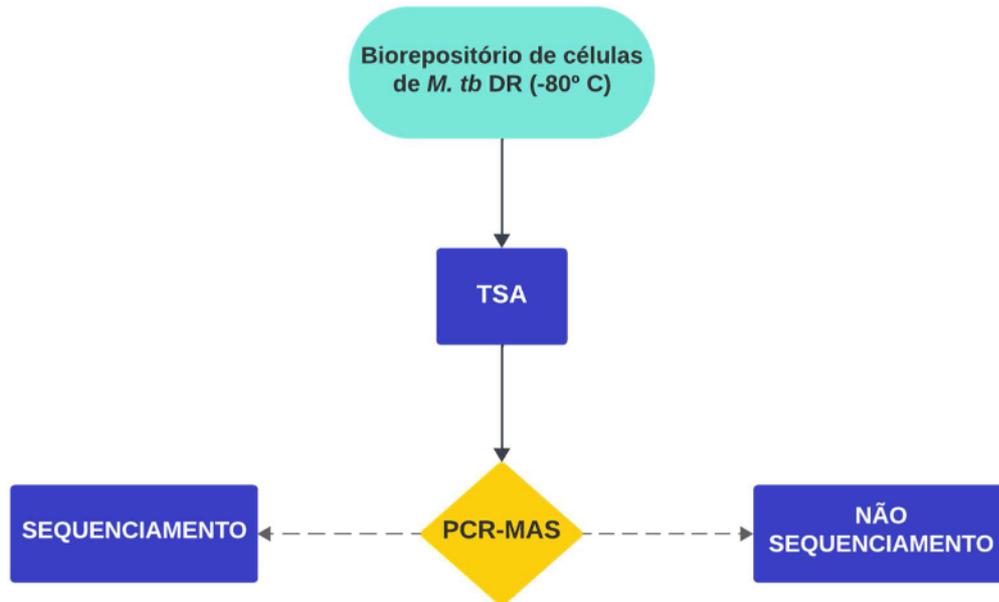
3.3 População e fluxograma do estudo

Todos os isolados de Mtb incluídos neste estudo foram extraídos de escarro e lavado broncoalveolar de casos com TBP, de participantes atendidos no Hospital da rede da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Ceará, Hospital Dr. Carlos Alberto Studart Gomes, denominado também como Hospital de Messejana (HM) em Fortaleza-Ceará.

Todos os participantes incluídos no presente estudo aceitaram participar da pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE, anexo A).

Na Figura 9 é apresentada o fluxograma do processo, descrevendo as etapas do estudo.

Figura 9 – Fluxograma do estudo

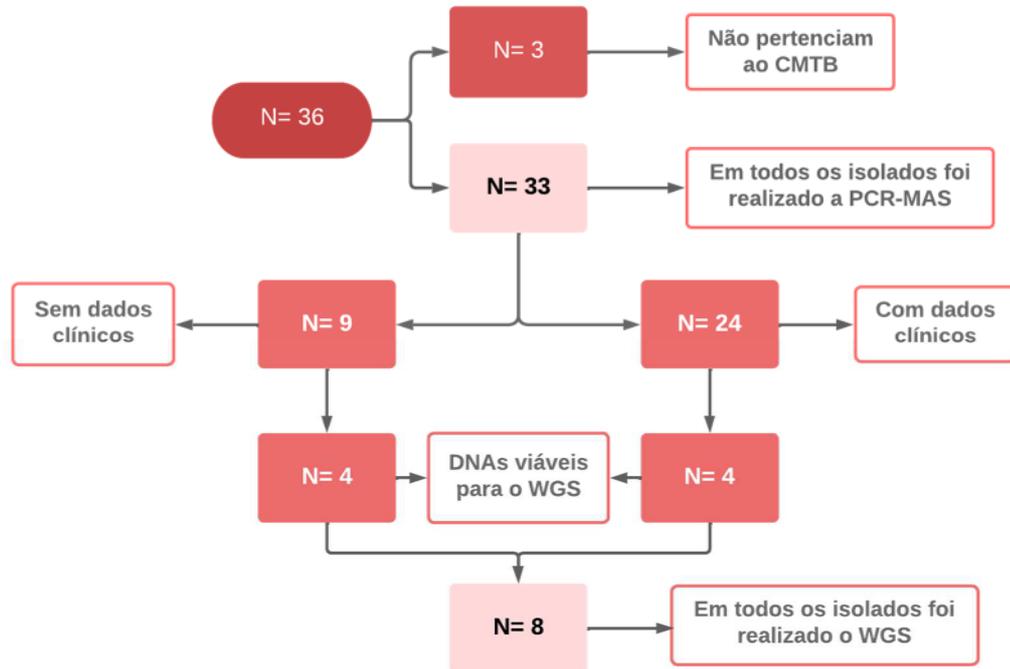


Fonte: Elaborado pelo autor. TSA- teste de sensibilidade aos antimicrobianos; PCR-MAS- reação em cadeia da polimerase multiplex alelo específica. WGS-Sequenciamento Genômico Completo. A PCR-MAS foi aplicada para identificação de mutações nos genes: *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC*, *gyrA*, *pncA*, *embB*, *rpsL*, *gidB*, *rrS*, *ethA* e *Rv1258c*.

3.4 Tamanho da amostra

Neste estudo foi realizada amostragem por conveniência. Do total de 33 culturas confirmadas como Mtb, em 24 destas foram possíveis as análises dos dados clínicos, sendo os seus perfis fenotípicos de resistência aos fármacos anti-TB adquiridos por teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) ou pelo sistema BD BACTEC MGIT 460TB. As demais amostras restantes (nove) entraram apenas na fase experimental, PCR e WGS (Figura 10).

Figura 10 – Fluxograma dos isolados clínicos



Fonte: Elaborado pelo autor. CMTB – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*; PCR-MAS- reação em cadeia da polimerase multiplex alelo específica. WGS-Sequenciamento Genômico Completo.

3.5 Critérios de inclusão

Foram incluídos na pesquisa participantes com TBP com idade igual ou maior que 18 anos, que exibiram cultivo positivo para *M. tuberculosis*, apresentando um padrão de resistência a pelo menos um fármaco anti-TB, que foram atendidos no ambulatório de tisiologia do HM.

3.6 Critérios de exclusão

Foram excluídos aqueles que não permitiram consentimento após receberem informações, ou por opção ou incapacidade e os participantes que tinham HIV. Além disso, foram excluídos da pesquisa os participantes que apresentaram culturas com contaminação.

3.7 Análise estatística

Após a compilação dos dados no Programa *Microsoft® Excel* 2010, foi realizada a análise descritiva. Os dados foram organizados em tabelas simples e cruzadas. Para avaliar a associação entre TB resistente com as características dos participantes foram utilizados os testes de Qui-Quadrado. As análises estatísticas cujos valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

3.8 Aspectos éticos

Os projetos de pesquisa das amostras incluídas no presente estudo foram aprovados no Comitê de Ética em Pesquisa do HM e da Universidade Federal do Ceará. Os projetos são “Caracterização molecular de *Mycobacterium tuberculosis* multidroga e extensivamente resistente em unidade de referência” com parecer N° 1.956.894 de 09/03/2017 e “Dinâmica da transmissão da tuberculose multirresistente e sensível e avaliação da susceptibilidade ao *Mycobacterium tuberculosis* em serviço de referência no Estado do Ceará” com parecer N° 238/05 de 04/07/2005 (ANEXO B).

Aos participantes do estudo foram garantidos o sigilo das informações e o anonimato, de acordo com as normas éticas da investigação científica. Os nomes dos participantes não foram relacionados aos questionários e foram identificados apenas por códigos.

3.9 Cultivo primário e teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas

As amostras incluídas no presente estudo são todas de material respiratório (escarro e lavado broncoalveolar) e são originadas de dois períodos diferentes: 9 amostras coletadas entre 2007 e 2008 e 24 coletadas entre 2017 e 2018, totalizando 33 amostras de Mtb.

As amostras coletadas em 2007 e 2008 que apresentavam bacterioscopia positiva para bacilo álcool ácido resistente (BAAR) foram enviadas ao Laboratório Central do Estado do Ceará (LACEN) para cultivo primário, identificação de micobactérias seguido do TSA por método das proporções (CANETTI; RIST; GROSSET, 1963).

As amostras coletadas em 2017 e 2018 foram enviadas ao Laboratório de

microbiologia do HM e cultivadas no sistema BD BACTEC Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT) 460TB. Em seguida, as amostras com cultivo positivo foram submetidas ao TSA: rifampicina, isoniazida, estreptomicina e etambutol.

As amostras identificadas como *M. tuberculosis* DR foram enviadas ao Laboratório de Micobactérias da UFC e estocadas a -80°C em meio de conservação (Caldo de Soja e Triptona contendo 20% de glicerol).

3.10 Subcultivo das amostras estocadas no biorrepositório e inativação celular

Todas as etapas do subcultivo até inativação celular foram realizadas em cabine de segurança biológica Purifier Class II Total Exhaust do tipo IIB (Labconco), situada na Sala de Cultivo de Micobactérias, que possui o Nível de Biossegurança 3 – NB3, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC. Foram seguidas todas as normas de biossegurança apropriadas, como o uso de máscaras com filtro N-95, luvas duplas, aventais e toucas.

O subcultivo das cepas de *M. tuberculosis* resistentes, foi feito em meio Löwenstein-Jensen com posterior incubação a 37 °C em estufa bacteriológica (Olidex) por um período de 14 a 21 dias.

Previamente à extração de DNA, a cabine de segurança biológica foi descontaminada com glutaraldeído 2% e exposição à luz ultravioleta por 20 minutos. As colônias de micobactérias cultivadas em meio Löwenstein-Jensen foram coletadas por raspagem com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril e transferidas para microtubo de 2,0 mL do tipo Eppendorf® contendo 300 µL de tampão TE (0,01M Tris-HCl e 0,001 EDTA [pH 8,0]). O microtubo foi vedado com Parafilm® e foi submetido a aquecimento em banho-maria, sob temperaturas de 80 a 100 °C, por um período de 20 minutos, resultando na inativação das células micobacterianas.

3.11 Baciloscopia

As culturas de micobactérias que exibiram crescimento visível, bem como aquelas que estavam em fase exponencial (entre 10 a 15 dias de cultivo) foram submetidas à confirmação como BAAR por meio da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen (BRASIL. *et al.*, 2005) com posterior visualização dos bacilos em microscópio óptico binocular modelo Zeiss

Axio Scope.A1 em objetiva de imersão.

3.12 Extração do DNA genômico

O processo de extração de DNA teve como base o protocolo descrito por Parish e Stoker (2001). Foi adicionado à suspensão de células inativadas, à temperatura ambiente, 10 μ L de lisozima (50 mg/mL). Em seguida, foi realizada a homogeneização do tubo por lenta inversão com posterior incubação a 37 °C por 2 horas em thermo-shaker (VHD). Posteriormente, foi adicionado 150 μ L de proteinase K (10 mg/mL) e 30 μ L de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 20%. Novamente, o microtubo foi homogeneizado por lenta inversão e incubado a 45 °C *overnight* em thermo-shaker (VHD). Ao extrato de DNA, foi adicionado um volume equivalente à mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (na proporção de 25:24:1), em seguida, o volume foi misturado lentamente por cerca de 5 vezes por inversão. O microtubo foi centrifugado a 3830 xg (temperatura ambiente) em centrífuga (Eppendorf), por um período de 10 minutos. A fase aquosa superior, que continha o DNA, foi coletada em outro microtubo, sendo adicionado um volume equivalente de clorofórmio. A mistura foi agitada suavemente por inversão e, em seguida, centrifugada a 3830 xg por 10 minutos (temperatura ambiente). Por fim, a fase aquosa superior foi novamente coletada e repetido o processo anterior.

Ao extrato de DNA foi adicionado 1/50 volumes (em relação ao volume da fase superior aquosa) de NaCl 5 M e 2 volumes de álcool etílico absoluto. Posteriormente, a mistura foi homogeneizada com cuidadosas inversões (2-4 vezes), até a formação de 'nuvem' de DNA. Opcionalmente, para facilitar a visualização da 'nuvem' de DNA, o microtubo foi incubado a -20 °C (*freezer*) por até 30 minutos. O extrato de DNA foi então centrifugado a 3830 xg por 20 minutos. Então, o sedimento passou por uma lavagem com 1 mL de álcool etílico a 70% em temperatura 4 °C e, em sequência, foi submetido a uma centrifugação a 17982 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão do microtubo, mantendo-se o sedimento. Quanto ao resíduo de etanol, este foi evaporado à temperatura ambiente, por até 30 minutos. Em seguida, o sedimento de DNA foi dissolvido em 100 μ L de tampão TE. A amostra de DNA foi incubada a 65 °C *overnight* e depois estocado a -20 °C. Posteriormente, a concentração de DNA foi determinada através de nanoespectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific) no comprimento de onda de 260 nm.

3.13 Identificação de *M. tuberculosis* pela amplificação de *IS6110*

A caracterização do CMTB foi realizada pela amplificação do gene *rv2168c*, que codifica a transposase *IS6110*. O número de cópias da região *IS6110* varia de 1 a 25 vezes na espécie *M. tuberculosis* (MCEVOY *et al.*, 2007). Esta sequência é encontrada de 0 a 1 cópia em outras espécies do CMTB. Os iniciadores foram desenhados pela Dra. Cristiane C. Frota usando o programa Primer3Plus versão 3.3.0 (<https://www.primer3plus.com/index.html>) baseado na região genômica do *M. tuberculosis* H37Rv, depositado no GenBank (NCBI:txid83332).

O processo de amplificação do alvo genético no gene *rv2168c* foi composto por 1 µL de DNA genômico (20 ng/µL), 1 µL de cada iniciador (25 pMol/µL) (Tabela 2), 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix, 1,25 µL de dimetilsulfóxido e 8,25 µL de H₂O livre de nucleases, completando assim o volume final para cada reação (25 µL). O controle negativo foi adicionado em todas as reações através da substituição do DNA pela água livre de nucleases, sendo o controle positivo, a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (20 ng/µL).

Tabela 2 – Iniciadores para reação da PCR da sequência *IS6110* do *M. tuberculosis*

Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Tm (°C)	Produto (pb)
IS6110 up	GAG CGG GCG GTG CGG ATG GTC	72	179 pb
IS6110 low	TCA GCG GAT TCT TCG GTC GTG GTC	66	

Fonte: COLE *et al.* (1998).

A reação de amplificação de sequência foi executada no Termociclador Mastercicler Personal (Eppendorf) e teve como etapas a desnaturação inicial das fitas de DNA por 2 minutos a 94 °C, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 63,4 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 15 minutos. Ao final da reação, as amostras permaneceram no termociclador a uma temperatura de 4 °C e, posteriormente, foram estocadas a -20 °C até a realização da técnica de eletroforese.

Os produtos da PCR foram visualizados através da técnica de eletroforese pela adição de 10 µL em gel de agarose a 1%, preparado com tampão Tris Borato EDTA (TBE) 1× contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/ mL. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pb (Promega) para comparação do tamanho das bandas. A eletroforese foi realizada a 90 V e 400 A no Eletrophoresis Power Supply EPS 300 (GE Healthcare) e as

bandas foram digitalizadas em transiluminador ultravioleta Imagequant 300 (GE Healthcare). O produto adquirido foi de 179 pb.

3.14 Identificação das mutações nos genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC*, *gyrA*, *pncA*, *embB*, *rpsL*, *gidB*, *rrs*, *ethA* e *Rv1258c*

A cepa referência para o desenho dos primers alelo específico foi a *M. tuberculosis* H37Rv NCBI Reference Sequence: NC_000962.3. A tabela 3 evidencia o número de acesso no Genbank de cada gene cujas mutações foram estudadas nessa pesquisa.

Os iniciadores tinham como alvo as seguintes mutações dos respectivos genes: C531T do *rpoB*, G315C do *katG*, C-15T e S94A do *inhA*, -10A, G-9A e -6G do *oxyR-ahpC*, A94G do *gyrA*, C169G do *pncA*, A916G do *embB*, AAG128AGG do *rpsL*, GCG218 do *gidB*, A1401G do *rrs*, T-8A e T-11C do *ethA* e 656GTC> e 875CAT> do *Rv1258c* (Tabela 4).

Para o códon 531 do gene *rpoB* e códon 94 do gene *gyrA* foram empregados os iniciadores do VADWAI; SHETTY; RODRIGUES (2012), para o códon 315 do gene *katG* os de SIU *et al.* (2011) e os demais iniciadores foram desenhados com o software Primer3Plus versão: 3.3.0 (<https://www.primer3plus.com/index.html>).

Tabela 3 - Número de acesso dos genes hospedados no GenBank

Gene	Sequência de referência	Região
<i>rpoB</i>	NC_000962.3	759807-763325
<i>katG</i>	NC_000962.2	2155009-2155443
<i>inhA</i>	NC_000962.3	1674202-1675011
<i>oxyR-ahpC</i>	NC_000962.3	2726060-2726267
<i>gyrA</i>	NC_000962.3	7302-9818
<i>pncA</i>	NC_000962.3	c2289286-2288632
<i>embB</i>	NC_000962.3	4246019-4250303
<i>rpsL</i>	NC_000962.3	781503-781989
<i>gidB</i>	NC_000962.3	c4408242-4407487
<i>rrs</i>	NC_000962.3	1471846-1473382
<i>ethA</i>	NC_000962.3	c4327625-4327413
<i>Rv1258c</i>	NC_000962.3	c1407340-1406081

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Iniciadores alelo específicos para a técnica PCR-MAS dos genes investigados

Mutação	Iniciadores	Sequência (5' > 3')	Tm (°C)	Produto (pb)
C531T	<i>rpoB</i> F	CGTTGATCAACATCCGGCCGGTG	74	243
	<i>rpoB</i> R	CCACCTTGCGGTACGGCGTT	66	
	<i>rpoB</i> 531 F	CCACAAGCGCCGACTGTC	60	164
G315C	<i>katG</i> 315_0Fx	GCAGATGGGGCTGATCTACGTGAACC	72	435
	<i>katG</i> 315_4Rx	AACGGGTCCGGGATGGTGCC	70	
	<i>katG</i> 315_5Rx	TCCATACGACCTCGATGCCGC	72	296
C-15T	<i>inhA</i> F	CCAGAAAGGGATCCGTCATG	58	221
	<i>inhA</i> R	ACAACCTATCGTCTCGCCG	59,5	
	<i>inhA</i> Out R	GTAACCAGGACTGAACGGGA	59	155
S94A	<i>inhA</i> F	TGCATTCGATTGGGTTTCATGC	59,87	468
	<i>inhA</i> R	ACGAACCTGTTGACCGACTC	59,97	
	<i>inhA</i> -Out F	GTCGATCGCGTTTCACATCG	60	250
G9A	<i>oxyR-ahpC</i> F	CCGCTTTGATGATGAGGAGAGT	60,16	246
	<i>oxyR-ahpC</i> R	CGAACGTGAAGTCTTTCGGC	59,84	
	<i>oxyR-ahpC</i> Out F	ACTTCACGGCACGATGGAAT	60	206
A94G	<i>gyrA</i> F	ATCGCCGGGTGCTCTATGCGA	66	327
	<i>gyrA</i> R	GCACCCGGCCGTCGTAGTTA	66	
	<i>gyrA</i> 94 F	CGACGCGTCGATCTACGA	58	218
C169G	<i>pncA</i> F	GTGACCACTTCTCCGGCAC	60,67	289
	<i>pncA</i> R	CGGTGTAGGCACCCTTGTAG	60,11	
	<i>pncA</i> Out F	ATCATCGTCGACGTGCAGAA	59,83	138
A916G	<i>embB</i> F	CTGGGCATGCCCCGAGT	61,86	487
	<i>embB</i> R	GTCGCTGACATGGGTCATCA	60,11	
	<i>embB</i> Out F	GCAGATTGTCTGGGGTGTTC	60,61	126
A128G	<i>rpsL</i> F	AAACAGAACGTGAAAGCGCC	59,97	373
	<i>rpsL</i> R	AGTTCGGCTTCTTCGGAGTG	60	
	<i>rpsL</i> Out R	GTTTGCGGTCTTTCGACACCC	59,97	178
A80P	<i>gidB</i> F	GCGTGCCATTGGCGATAG	59,37	363
	<i>gidB</i> R	CCTTTGATGGCGAGCATTTCG	59,97	
	<i>gidB</i> Out F	GCTATGGGACCGGCATCTAC	60	265
A1401G	<i>rrs</i> F	CCAGGGCTTCACACATGCTA	60	305
	<i>rrs</i> R	CGACTTTCATGACGTGACGG	59,29	
	<i>rrs</i> Out R	CTTCCGGTACGGCTACCTTG	60,18	207
T11C	<i>ethA</i> F	GCCATGTCTGGCTTGATTGAC	59,9	498
	<i>ethA</i> R	CGGTCATGGATCCACGCTATC	60,67	
	<i>ethA</i> Out R	CGGAGCGAATTCGGGATAA	59,97	339
V219A	<i>Rv1258c</i> F	CTACGAGGCGATCCTCAACC	59,97	316
	<i>Rv1258c</i> R	ATACCCGCAGGTTCCAGACG	61,96	
	<i>Rv1258c</i> Out R	GTATTTCCGGGAACAGCACGC	59,9	239
S292L	<i>Rv1258c</i> F	AGCGTGCTGTTCCCGAAATA	60	332
	<i>Rv1258c</i> R	GAACCGCGGTCGACATGG	61,19	
	<i>Rv1258c</i> R	GACGTCATCACCCCGACTAC	59,9	157

Fonte: Elaborado pelo autor. Em negrito e sublinhado são mostradas as bases dos iniciadores alelo específicos para a mutação alvo.

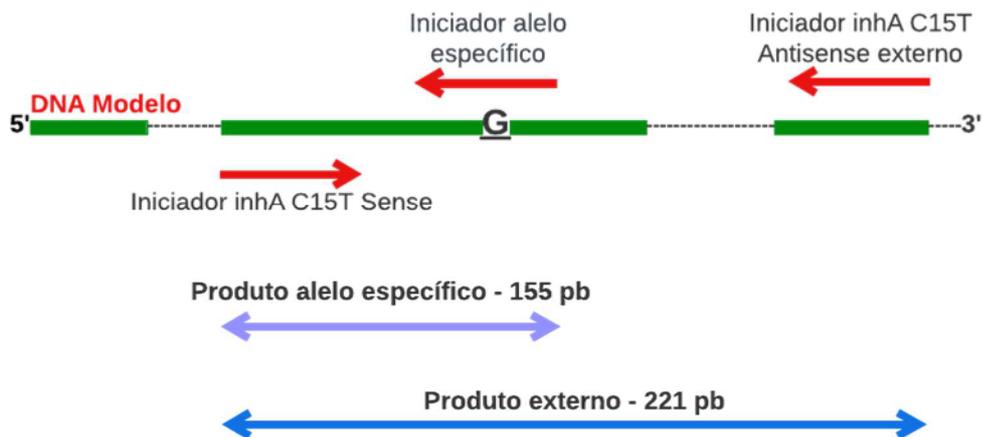
3.14.1 Condições da PCR-MAS

Para as ampliações foram empregados 0,5 µL do iniciador alelo específico (25 pMol), 1,0 µL do iniciador forward ou reverse (25 pMol), 0,5 µL do iniciador externo (25 pMol), 2 µL de DNA (50 ng/ µL), 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix, 0,75 µL de dimetilsulfóxido e 7,75 µL de água. As concentrações do primer variaram de acordo com a posição do iniciador em relação ao alelo alvo da mutação investigada, de acordo com a Tabela 3.

As condições da reação no termociclador foram 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, T_m °C (específica para cada conjunto de iniciadores e como indicado na Tabela 3) por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 14 minutos (Figura 11).

Para todas as reações de PCR-MAS, foi utilizado como controle positivo 2 µL de DNA (20 ng/µL) de *M. tuberculosis* da cepa H37Rv, sensível aos fármacos. Para controle negativo foi empregado água livre de nucleases em substituição ao DNA. Ao final de cada reação, as amostras permaneceram no termociclador a uma temperatura de 4 °C e, posteriormente, foram estocadas a -20 °C até a realização da técnica de eletroforese.

Figura 11 – Esquema de amplificação tipo alelo específico com os iniciadores do gene *inhA* para identificação da mutação C15T



Fonte: Elaborado pelo autor. PCR-MAS- reação em cadeia da polimerase multiplex alelo específica. Em caso de isolado de *Mtb* sem mutação foram amplificados dois produtos (produto externo e produto alelo específico), enquanto no isolado resistente, somente foi amplificado o produto externo.

3.15 Eletroforese de detecção dos produtos dos genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC*, *gyrA*, *pncA*, *embB*, *rpsL*, *gidB*, *rrS*, *ethA* e *Rv1258c*

Os produtos foram separados por eletroforese na fonte voltaica “Eletrophoresis Power Supply” - EPS 300 (GE Healthcare) em gel de agarose a 3% para os produtos dos genes *rpoB* e *gyrA*, e a 2% para os demais, em tampão TBE 1× (tris base 1 mM, ácido bórico 0,9 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e coloração com 0,5 µL de brometo de etídio 10 mg/ mL. Os produtos foram distribuídos nos poços dos géis em ordem padronizada dos iniciadores. No primeiro poço e último poço foram aplicados 5 µL do marcador de DNA de peso molecular de 100 pb (Promega). Do segundo poço em diante, foi adicionado 10 µL de cada produto de PCR-mix correspondente da placa, seguido pela adição do controle positivo e do controle negativo, que permaneceu na penúltima posição.

Os géis foram preparados em bandejas eletroforéticas de 12 por 8 cm de tamanho. As corridas ocorreram a 90 V e 400 A, por 40 a 55 minutos (Figura 12). Ao final da técnica, as bandas foram digitalizadas e visualizadas no sistema “ImageQuant” 300 (GE Healthcare).

3.16 Sequenciamento Genômico Completo (WGS)

Essa etapa ocorreu em parceria com a Seção de Bacteriologia e Micologia (SABAC) do Instituto Evandro Chagas (IEC), em Ananindeua, Pará.

Antes do sequenciamento, a quantidade de DNA foi determinada com os kits de ensaio QubitdsDNA BR (Broad Range) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel em gel de agarose ultrapuro a 1% em TBE 1x e utilizando uma escada Plus DNA de 1 kb (Thermo Fisher Scientific).

As bibliotecas genômicas foram preparadas usando o kit de preparação de biblioteca de DNA Nextera XT (Illumina, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e a qualidade controlada usando o kit Agilent High Sensitivity DNA (Agilent, CA, EUA), seguido pelo sequenciamento no equipamento “Illumina NextSeq 550 Instrument” usando uma química de extremidade emparelhada 2 × 150 pb, sendo duas no sentido forward e duas reverse. A profundidade média de leitura foi >20×.

3.17 Análise dos dados obtidos com o WGS

As sequências brutas obtidas do sequenciador foram processadas para qualidade utilizando o software Trimmomatic v0.32 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Em seguida, o pipeline Maximum Accessible Genome for Mtb Analysis (MAGMA) (HEUPINK *et al.*, 2023) foi aplicado para análise de resistência, detectando variantes e comparando-as com o repositório do programa TB-Profiler v6.10 (PHELAN *et al.*, 2019), que inclui dados do catálogo de mutações da OMS versão 2 atualizado com mutações relacionadas à resistência aos novos medicamentos anti-TB (bedaquilina, linezolida, clofazimina, pretomanida e delamanida).

Para determinar se a posição filogenética das amostras correspondia a outras cepas de Mtb, uma filogenia de máxima verossimilhança foi inferida usando o RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) e representada através da ferramenta online iTOL v. 6.9 (LETUNIC; BORK, 2024).

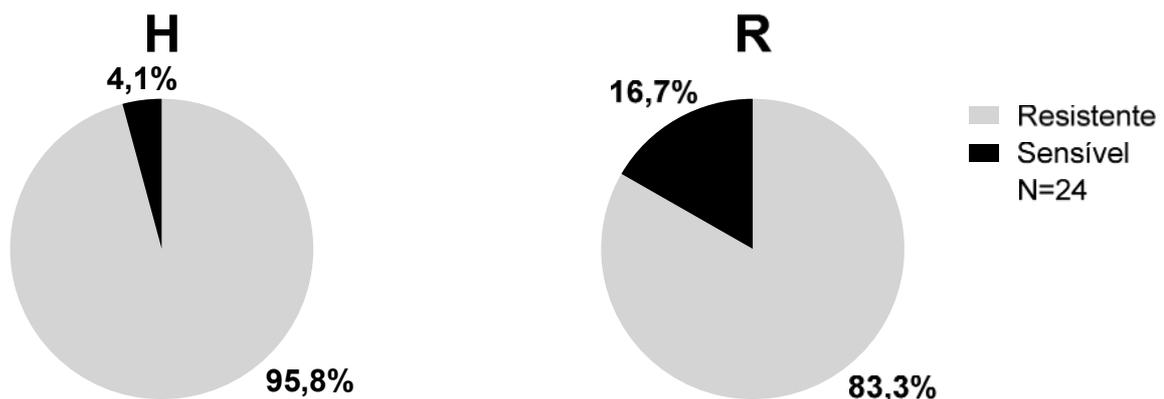
As previsões de resistência foram relatadas contra os fármacos anti-TB e seis respectivos genes associados à resistência, foram eles: R (*rpoB*), H (*fabG1*, promotor *fabG1*, *inhA*, *ndh*, *katG*, *mshA*, *ahpC* e promotor *ahpC*), pirazinamida (promotor *pncA*, *pncA* e *rpsA*), E (operon *embCAB*), S (*rpsL*) capreomicina (*rrs* e *tlyA*), Et (*inhA*), canamicina (promotor *rrs* e *eis*), amicacina (*rrs*) e levofloxacina e moxifloxacina (*gyrA* e *gyrB*).

4 RESULTADOS

4.1 Perfil fenotípico dos isolados clínicos aos fármacos de primeira linha, rifampicina (R) e isoniazida (H)

Entre os 24 isolados de Mtb com dados clínicos, foi verificado que 83,3% (20/24) foram resistentes a R, seja como monorresistência ou associada à resistência a outros fármacos. Para resistência à H, foi evidenciada uma frequência superior à da R, onde, constatou-se um percentual de 95,8% (23/24), como monorresistência ou associada à resistência a outros fármacos (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Percentual de amostras com o perfil fenotípico de resistência à isoniazida (H) e rifampicina (R)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Descrevendo um pouco mais sobre o perfil fenotípico, foi verificado que 16,7% (4/24) foram resistentes a um único fármaco, dos quais 12,5% (3/24) exibiram resistência à H e 4,2% (1/24) exibiram resistência à R. As amostras que demonstraram resistência simultânea a dois fármacos corresponderam a 50% (12/24), onde 45,8% (11/24) foram caracterizadas como TB-MDR e outros 4,2% (1/24) demonstraram resistência à H e ao E (Tabela 5).

No que se refere ao padrão de resistência a mais de dois fármacos, foi constatado uma proporção de 33,3% (8/24). Onde, dentre estas, 16,7% (4/24) dos isolados apresentaram resistência simultânea aos quatro fármacos testados: R, H, E e S.

Tabela 5 – Padrão de resistência aos fármacos anti-TB dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* de 24 participantes com TB pulmonar

Padrão de resistência	<i>M. tuberculosis</i> (N)	(%)
1 fármaco	4	16,7
H	3	12,5
R	1	4,2
2 fármacos	12	50,0
H+R (TB-MDR)	11	45,8
H+E	1	4,2
≥ 3 fármacos	8	33,3
H+R+S	2	8,3
H+R+E	2	8,3
H+R+E+S	4	16,7
Total	24	100

Fonte: Elaborado pelo autor. H – isoniazida, R – rifampicina, E – etambutol, S – estreptomicina.

4.2 Características dos participantes

4.2.1 Indicadores sociodemográficos

Na Tabela 6 é possível verificar os dados quanto as características sociodemográficas dos 24 isolados clínicos. Dentre as variáveis analisadas, foi constatado que a maior parte dos participantes tinha idade acima dos 40 anos, atingindo 66,6% (16/24), com mediana da idade igual a 44,5 anos. Considerando o sexo, houve uma prevalência de mulheres quanto ao total de participantes, obtendo um percentual de 58,3% (14/24).

Ao analisar o tempo de escolaridade, foi verificado uma predominância entre os participantes que possuíam entre 1 a 9 anos de estudos 87,5% (21/24). Quanto a variável ocupação, a maior parte dos participantes relataram estarem desempregados à época, com frequência de 70,8% (17/24). Além disso, 20,8% dos participantes relataram outros tipos de ocupação laboral ou renda, como aposentadoria ou auxílio-doença, ou mesmo “do lar”.

Tabela 6 – Dados sociodemográficos dos 24 participantes com TB pulmonar DR, Fortaleza, Ceará-Brasil

Variáveis	Total	(%)	p
Idade (anos)			
Mediana (\pm IQR)	44,5 (\pm 11,3)		
≤ 40	8	33,3	
41 - 49	11	45,8	
≥ 50	5	20,8	
Sexo			
Masculino	10	41,7	0,1432
Feminino	14	58,3	
Escolaridade (em anos de estudo)			
≤ 9 anos	22	91,7	0,602
10 a 13	2	8,3	
Ocupação			
Desempregado	17	70,8	0,317
Autônomo	2	8,3	
Outros	5	20,8	

Fonte: Elaborado pelo autor. IQR – Intervalo interquartil. p: teste Quiquadrado, o resultado foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

Houve uma prevalência maior do fenótipo de TB-MDR em participantes com a idade de 40 a 49 anos, 54,5% (6/11). Em homens, foi possível observar que 40% (4/10) correspondiam a um perfil fenotípico de TB-MDR e o mesmo percentual, 40% (4/10), foi encontrado para resistência à H+R+E+S para esse mesmo grupo. Em mulheres, também houve uma maior predominância de TB-MDR, obtendo um percentual de 50% (7/14), seguido de 21,4% (3/14) com monorresistência à H. Entre os que tiveram uma escolaridade de 1 a 9 anos de estudo prevaleceu a resistência à H+R, com 42,8% (9/21), assim como para os que se declararam desempregados até aquela época com 47% (8/17).

4.2.2 Características relacionadas a comorbidades e hábitos sociais

Ao analisar as informações referentes as comorbidades e hábitos sociais (Tabela 7), foi constatado que dos 24 participantes com TB-DR, 29,2% (7/24) tinham diabetes, 37,5% (9/24) informaram que faziam o consumo de bebidas alcólicas e o mesmo percentual, 37,5%, também relatou o hábito de fumar. Foi observado que quanto a utilização de drogas ilícitas, 54,2% (13/24)

não quiseram responder, 37,5% (9/24) alegaram não fazer esse tipo de consumo e apenas 8,3% (2/24) confirmaram o uso de drogas.

Tabela 7 – Características relativas a comorbidades e hábitos sociais dos 24 participantes diagnosticados com TB pulmonar DR, Fortaleza, Ceará-Brasil

Variáveis	Total	(%)	p
Diabetes			
Sim	7	29,2	0,725
Não	6	25	
Não informado	11	45,8	
Etilismo			
Sim	9	37,5	0,949
Não	7	29,2	
Não informado	8	33,3	
Tabagismo			
Sim	9	37,5	0,519
Não	6	25	
Não informado	9	37,5	
Uso de drogas ilícitas			
Sim	2	8,3	0,658
Não	9	37,5	
Não informado	13	54,2	

Fonte: Elaborado pelo autor. O resultado é considerado estatisticamente significante quando $p < 0,05$.

Com relação ao fenótipo de resistência entre os participantes que informaram ter diabetes, foi encontrado 57,1% (4/7) com TB-MDR, seguidos de 28,6% (2/7) com H+R+E+S e 14,3% (1/7) com H+R+E. Quanto aos que alegaram o consumo de álcool, 33,3% (3/9) foram resistentes à H+R+E+S, 22,2% (2/9) à H+R, 22,2% (2/9) foram monorresistentes a H, 11,1% (1/9) a H+E e 11,1% (1/9) a H+R+S.

Entre os que informaram possuir o hábito de fumar, 44,4% (4/9) tiveram um perfil de resistência TB-MDR, 22,2% (2/9) à H+R+E+S, 11,1% (1/9) à H, 11,1% (1/9) à R e 11,1% (1/9) à H+R+S. No que se refere aos usuários de drogas ilícitas, 50% (1/2) apresentaram um fenótipo TB-MDR e 50% (1/2) foi resistente à H+R+E+S.

4.2.3 Características clínicas

Ao analisar os dados clínicos dos participantes (Tabela 8), foi constatado que 58,3% (14/24) não haviam feito em algum momento progresso o tratamento para TB, ou seja, são considerados casos de tuberculose com resistência primária. Em relação ao contato com outro caso de TB, 50% (12/24) dos participantes relataram contato intradomiciliar. Com relação ao padrão radiológico torácico, 29,1% (7/24) apresentaram acometimento unilateral e em 37,5% (9/24) evidenciou-se a presença de grandes cavitações nas imagens.

No que se refere ao exame de baciloscopia para pesquisa de BAAR, apenas um participante não teve o teste realizado, 20,8% (5/24) tiveram resultado negativo e em 41,7% (10/24) foi evidenciado a presença de positividade de uma cruz.

Tabela 8 – Características clínicas dos 24 participantes diagnosticados com TB pulmonar DR, Fortaleza, Ceará-Brasil

Variáveis	Total	(%)	p
História de tratamento anterior			
Sim	10	41,7	0,5581
Não	14	58,3	
Contato intradomiciliar			
Sim	12	50	0,3864
Não	12	50	
Padrão da radiografia do tórax			
Unilateral	7	29,1	0,5536
Bilateral	4	16,7	
Presença de cavitação no raio-X			
Grandes cavidades	9	37,5	0,7638
Pequenas cavidades	4	16,7	
Baciloscopia (em cruz)			
Negativo	5	20,8	0,2631
Uma cruz	10	41,7	
≥ Duas cruces	8	33,3	
Exame não realizado	1	4,2	

Fonte: Elaborado pelo autor. O resultado é considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

Entre os participantes com história de tratamento prévio, 50% (5/10) apresentaram o perfil de TB-MDR, 20% (2/10) foram resistentes à H+R+E+S, enquanto os que tiveram resistência à H+E, H+R+S e à H+R+E corresponderam a 10% (1/10) cada. Quanto aos que

declararam nunca terem realizado o tratamento prévio para TB, 42,9% (6/14) corresponderam a um perfil de TB-MDR, 21,4% (3/14) exibiram resistência à H, 14,4% (2/14) demonstraram um perfil resistente à H+R+E+S e foi identificada uma taxa de 7,1% (1/14) de resistência para R, H+R+S e H+R+E.

Em relação ao contato intradomiciliar com outro caso de TB, o perfil de resistência foi o seguinte: 50% (6/12) de TB-MDR, 33,3% (4/12) à H+R+E+S, 8,3% (1/12) de monoresistência à R e 8,3% (1/12) à H+R+S.

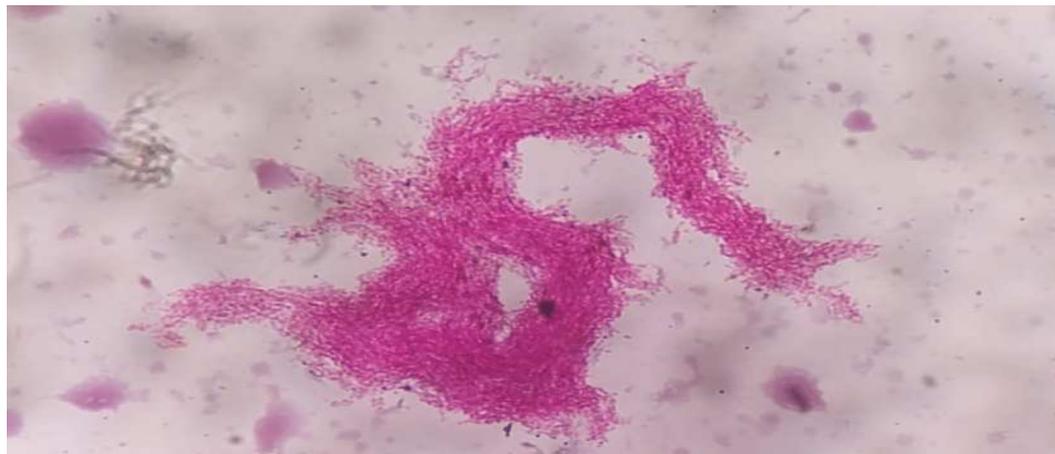
Quanto as características da lesão mostrada na radiografia do tórax, àquelas com padrão unilateral apresentaram resistência aos seguintes fármacos: 28,6% (2/7) à H+R+E+S, 28,6% (2/7) à H+R, 28,6% (2/7) à H e 14,2% (1/7) à H+R+S. Quanto ao padrão bilateral, 75% (3/4) corresponderam à resistência à H+R e 25% (1/4) à H+R+E. Entre as grandes cavidades foi determinado que 33,3% (3/9) foram resistentes à H+R, 22,2% (2/9) à H+R+E+S, e à mesma taxa, 11,1% (1/9), correspondeu para cada um dos seguintes perfis de resistência: monoresistência à H, monoresistência à R, à H+E e à H+R+S. Sobre o padrão de pequenas cavidades, 75% (3/4) foram resistentes à H+R e 25% (1/4) à H+R+E.

Ao avaliar o fenótipo de resistência quanto ao resultado da baciloscopia, foi observado que entre os que tiveram uma resposta negativa para o teste, 80% (4/5) foram resistentes à H+R e 20% (1/5) à H+R+E. Os que evidenciaram uma cruz no teste, tiveram uma taxa de resistência de 30% (3/10) à H+R, 20% (2/10) à H, 10% (1/10) à R, 10% (1/10) à H+R+E+S, 10% (1/10) à H+E, 10% (1/10) à H+R+S e 10% (1/10) à H+R+E. Para as amostras que evidenciaram a presença de duas cruzes ou mais, 37,5% (3/8) foram resistentes à H+R, 37,5% (3/8) à H+R+E+S, 12,5% (1/8) à H e 12,5% (1/8) à H+R+S (Tabela 8).

4.3 Identificação dos isolados como espécie *M. tuberculosis*

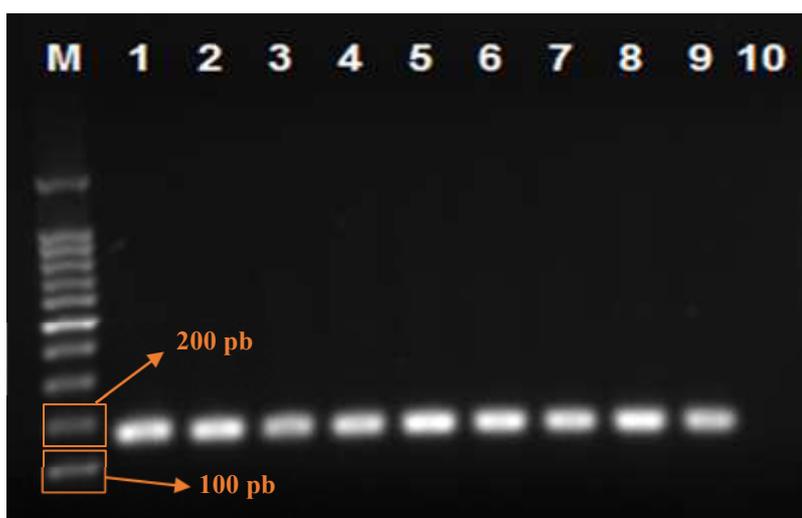
Todas as 33 culturas foram confirmadas como sendo BAAR através da técnica coloração de Ziehl-Neelsen (Figura 12), seguido de confirmação pela amplificação da região *IS6110*, específica para a espécie de Mtb (Figura 13).

Figura 12 – Baciloscopia de colônia de *M. tuberculosis*



Fonte: Elaborado pelo autor. Baciloscopia de colônia cultivada em Löwenstein-Jensen, corada pela técnica de Ziehl-Neelsen, formação de fator corda. Aumento de 100 .

Figura 13 – Visualização do produto de amplificação da região genômica *IS6110* de isolados positivos para a espécie *M. tuberculosis*



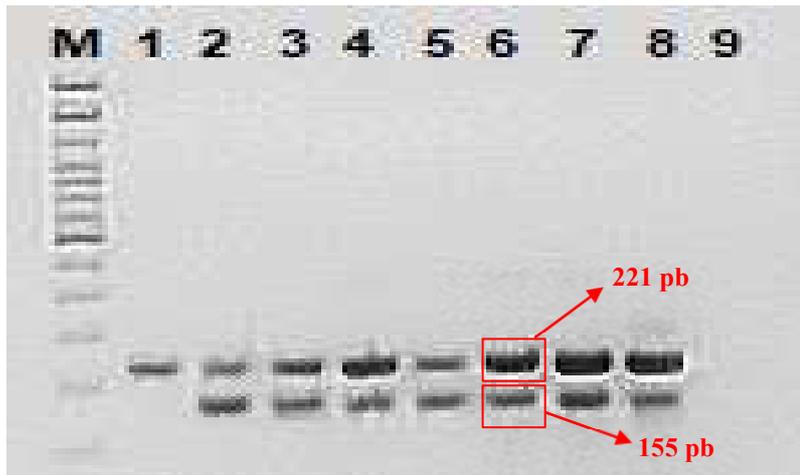
Fonte: Elaborado pelo autor. Amplificação da região *IS6110* do Mtb (produto de 179 pb) em gel de agarose a 1%. Poço M – Marcador (100 pb), poços do 1 ao 8 – isolados positivos, poço 9 – Controle positivo (cepa *M. tuberculosis* H37Rv), poço 10 – Controle negativo (H₂O em substituição ao DNA).

4.4 Genotipagem da resistência a medicamentos anti-TB

4.4.1 Análise das mutações presentes nos genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC*, *gyrA*, *pncA*, *embB*, *rpsL*, *gidB*, *rrS*, *ethA* e *Rv1258c* através da técnica PCR-MAS

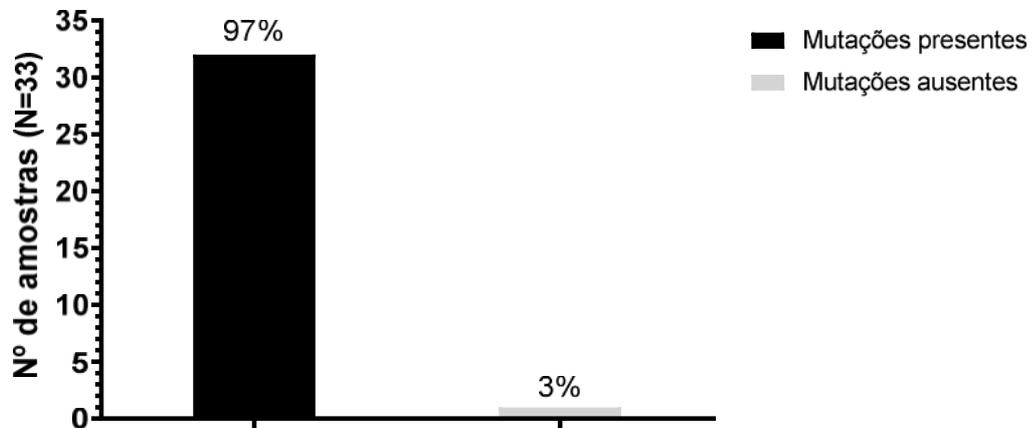
As 33 amostras positivas para a *IS6110* foram submetidas a técnica PCR-MAS para identificar mutações presentes nos genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC*, *gyrA*, *pncA*, *embB*, *rpsL*, *gidB*, *rrS*, *ethA* e *Rv1258c* (Figura 14). Dos 33 isolados estudados, foram encontradas mutações nos genes alvo em 32 isolados, correspondendo a uma taxa de 97% (32/33) do total (Gráfico 2). Uma taxa de 3% (1/33) foi correspondente ao isolado no qual não foi evidenciado mutações gênicas. Contudo, o mesmo evidenciou um perfil fenotípico resistente à H+R.

Figura 14 – Corrida eletroforética dos produtos da PCR-MAS para análise da mutação C15T localizada no gene *inhA*



Fonte: Elaborado pelo autor. Poço M – Marcador (100 pb), poços do 1 ao 7 – isolados dos participantes, poço 8 – Controle positivo (cepa *M. tuberculosis* H37Rv), poço 9 – Controle negativo (H₂O em substituição ao DNA). Na amostra 1 foi encontrada a presença da amplificação do produto externo (221 pb) e a ausência da amplificação do produto do alelo específico (155 pb), indicando a presença de mutação.

Gráfico 2 – Número de amostras com mutações nos genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC*, *gyrA*, *pncA*, *embB*, *rpsL*, *gidB*, *rrS*, *ethA* e *Rv1258c* detectadas através de técnica PCR-MAS



Fonte: Elaborado pelo autor.

Um total de 67 mutações pontuais diferentes foram detectadas em 32 amostras das 33 analisadas (Tabela 9). Foi encontrada mutação genética no gene *katG* (G315C) em 22 isolados de Mtb, percentual de 32,8% (22/67). Também foi observado que 12 isolados de Mtb apresentaram alterações na região intergênica *oxyR-ahpC* (alelos -10, -9, -6), demonstrando um percentual de 17,9% (12/67).

Em 11 amostras foram detectadas mutações no gene *embB*, com uma representação de 16,4% (11/67). Mutações no gene *rpoB* (C531T) foram identificadas em 10 isolados, representando 14,9% (10/67).

Foram observadas mutações no gene *gidB* em quatro amostras, exibindo uma taxa de frequência de 11,8% (4/34).

Além disso, foi observada a presença de mutações em duas amostras para cada um dos genes *rpsL*, *Rv1258c* (S292L), *Rv1258c* (V219A), correspondendo a uma taxa de 5,9% (2/34).

A mutação na posição C15T do gene *inhA*, assim como a mutação no gene *gyrA* (A94G), foram identificadas em uma amostra para cada gene, correspondendo a 1,5% (1/67) cada, do total de mutações localizadas através da técnica.

Tabela 9 – Frequência das mutações encontradas nos genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC*, *gyrA*, *pncA*, *embB*, *rpsL*, *gidB*, *rrs*, *ethA* e *Rv1258c* nos isolados dos 33 participantes com TB pulmonar

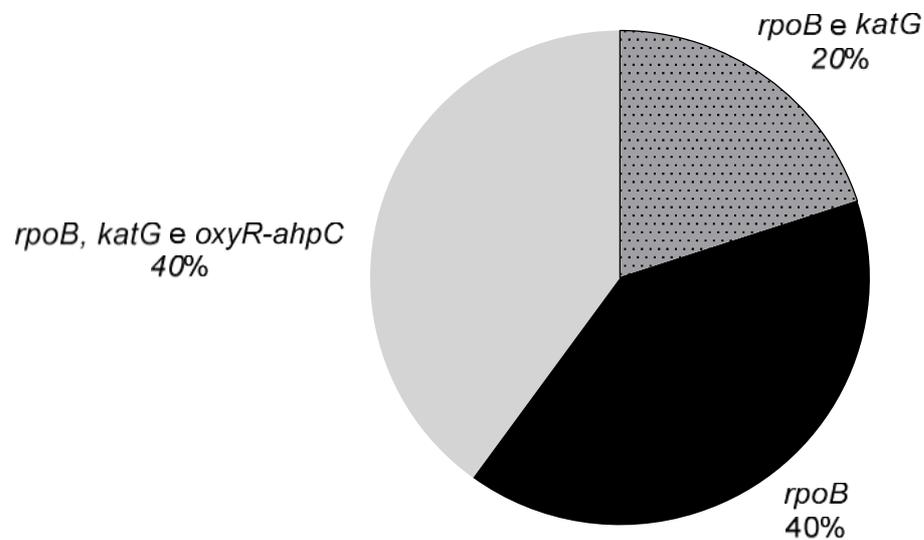
Genes	Mutação	N	(%)
<i>katG</i>	(G315C)	22	32,8
<i>oxyR-ahpC</i>	(-10, -9, -6)	12	17,9
<i>embB</i>	(A916G)	11	16,4
<i>rpoB</i>	(C531T)	10	14,9
<i>gidB</i>	(GCG218)	4	6
<i>rpsL</i>	(A128G)	2	3
<i>Rv1258c</i>	(S292L)*	2	3
<i>Rv1258c</i>	(V219A)*	2	3
<i>gyrA</i>	(A94G)	1	1,5
<i>inhA</i>	(C15T)	1	1,5
<i>inhA</i>	(S94A)*	0	0
<i>pncA</i>	(C169G)	0	0
<i>rrs</i>	(A1401G)	0	0
<i>ethA</i>	(T-8A e T-11C)	0	0
Total		67	100,0

Fonte: Elaborado pelo autor. A tabela classifica as mutações quanto a aminoácidos (*) e nucleotídeos, identificadas através da técnica PCR-MAS (reação em cadeia da polimerase multiplex alelo específica).

4.5 Mutações identificadas por meio da PCR-MAS em isolados com perfil fenotípico de resistência à rifampicina

Dentre os 24 isolados que apresentavam dados do perfil fenotípico de resistência (teste de sensibilidade aos antimicrobianos) aos fármacos, vinte tinham fenótipo de resistência à R. Contudo, apenas em cinco isolados foram identificadas mutações no gene *rpoB*, obtendo uma taxa de 25% (5/20). O perfil fenotípico identificado no laboratório de rotina das cinco amostras foi de TB-MDR. Entretanto, apenas dois destes isolados apresentaram mutações associadas ao gene *katG* e na região intergênica *oxyR-ahpC*, que são genes cuja ocorrência de mutações estão relacionadas à resistência à H, correspondendo a uma taxa de 40% (2/5) e uma mutação associada à *katG*, representando uma taxa de 20% (1/5) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Frequência das mutações relacionadas à resistência à rifampicina em isolados TB-R (N=24), detectadas por PCR-MAS



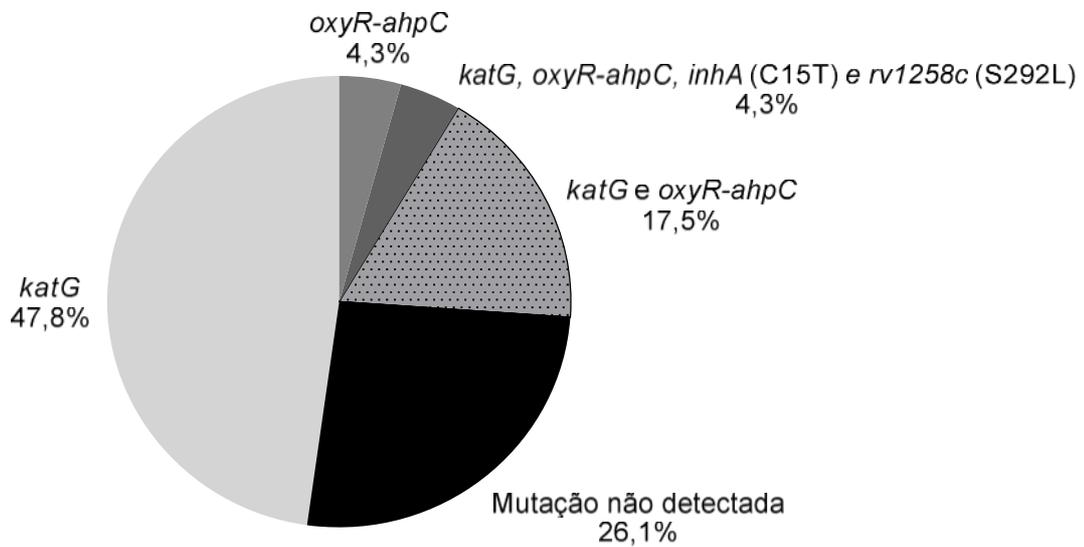
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Mutações identificadas por meio da PCR-MAS em isolados com perfil fenotípico de resistência à isoniazida

Dos 24 isolados com perfil fenotípico de resistência preestabelecido, um total de 23 apresentaram fenótipos resistentes à H, sendo identificadas 23 mutações pontuais relacionadas à resistência ao referido fármaco em 17 isolados.

Dentre as 23 mutações pontuais associadas à resistência à H, ocorreu uma maior prevalência de mutações localizadas no gene *katG*, correspondendo a uma taxa de 69,6% (16/23), seguidos de mutações na região intergênica *oxyR-ahpC*, exibindo uma taxa de 26,1% (6/23) e uma mutação no gene *inhA* (C15T) obtendo um percentual de 4,3% (1/23). Com relação a associação de mutações, quatro isolados com mutação em *katG* apresentaram mutação associada com alterações em *oxyR-ahpC*, obtendo uma taxa de 17,5% (4/23). Além disso, em um isolado com mutação em *katG* foi identificado mutações em conjunto em *oxyR-ahpC*, *inhA* (C15T), que codifica a proteína transportadora 2-trans-enoil-acil redutase, e na bomba de efluxo *Rv1258c* (S292L) representando assim, um percentual de 4,3% (1/23) (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Frequência das mutações relacionadas a resistência à isoniazida, detectadas por PCR-MAS dentre as 23 mutações pontuais

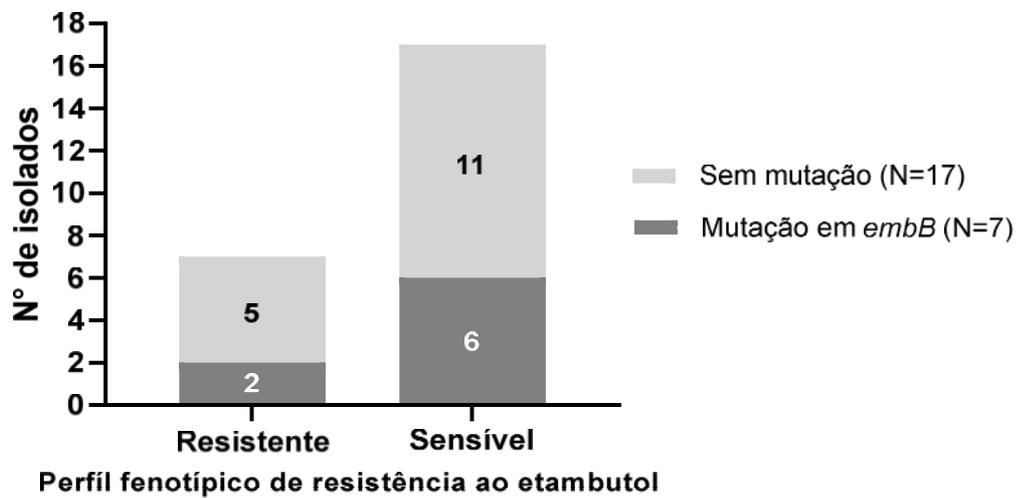


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Mutações identificadas pela PCR-MAS em isolados com perfil fenotípico de resistência ao etambutol

O percentual de isolados que mostraram um perfil de resistência ao E foi de 29,2% (7/24), contudo, apenas duas amostras (2/7; 28,5%) foram detectadas mutações no gene *embB*, que codifica a enzima arabinosil transferase alvo do fármaco E. Do total de 24 isolados com dados referentes à resistência medicamentosa, oito isolados apresentaram mutações no gene *embB*, exibindo uma taxa de 33,3% (8/24). As outras seis mutações encontradas em *embB*, 25% (6/24) eram nos isolados E sensível e relacionadas ao perfil de resistência à H+R (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Frequência das mutações relacionadas à resistência ao etambutol, detectadas por PCR-MAS



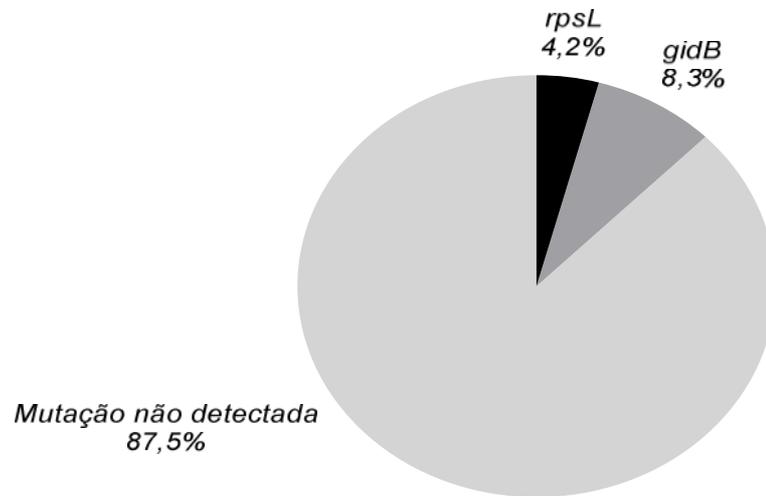
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8 Mutações identificadas por meio da PCR-MAS em isolados com perfil fenotípico de resistência à estreptomicina

Um total de 25% (6/24) dos isolados apresentaram um perfil de resistência a S. Em relação ao gene *rpsL*, que codifica a proteína ribossomal S12, foi identificado um índice de 4,2% (1/24) para mutação no referido gene. Contudo, o isolado em questão era resistente à H+R.

Quando se analisou os dados correspondentes ao gene *gidB*, que codifica a metiltransferase G da subunidade 16S do RNAr, verificou-se um índice mutacional de 8,3% (2/24) dentre as amostras com perfil fenotípico predeterminado. Porém, dentre as amostras com mutação presente no gene *gidB*, 16,7% (1/6) correspondeu ao perfil de resistência à S, enquanto a outra amostra com mutação apresentou um perfil de resistência à H+R (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Frequência das mutações relacionadas à resistência à estreptomicina, detectadas por PCR-MAS



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9 Mutações identificadas por meio da PCR-MAS no gene *Rv1258c* em isolados com perfil fenotípico de resistência preestabelecido

Adicionalmente, foi destacada a presença de quatro isolados com mutações no gene *Rv1258c* (Tap ou P55) que está relacionado a alterações na bomba de efluxo. Destes, três isolados possuíam o perfil fenotípico de resistência preestabelecido. Um deles com mutação no gene *Rv1258c* (S292L) era monorresistente à H e a PCR-MAS evidenciou mutações nos genes *katG*, *inhA* (C15T) e *oxyR-ahpC*. Um segundo isolado com mutação na posição V219A apresentou um perfil de resistência H+R e o terceiro isolado também com mutação em V219A com H+R+E (Tabela 10).

Tabela 10 - Número de mutações presentes no gene *Rv1258c* relacionado à bomba de efluxo associados aos perfis de resistência em 24 isolados de *M. tuberculosis* com teste de sensibilidade aos antimicobacterianos

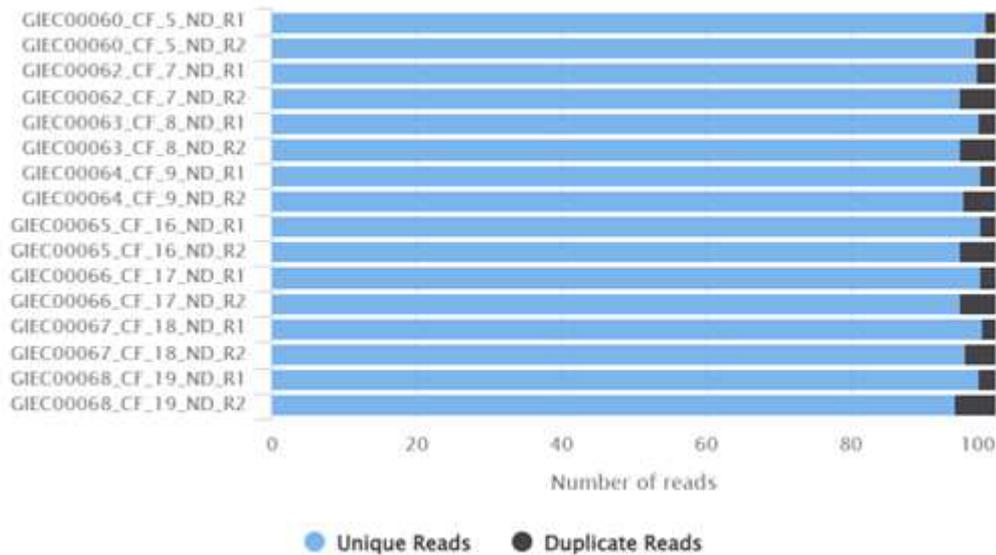
Perfil de resistência*	Total N (%)	Mutação N (%)	Sem mutação N (%)
TB-MDR ou mono	15 (62,5)	2 (66,7)	13 (61,9)
Multirresistência	9 (37,5)	1 (33,3)	8 (38,1)
Total	24 (100)	3 (100)	21 (100)

Fonte: Elaborado pelo autor. * $p = 0,873382$. Foi levado em consideração o padrão de mutações genéticas identificadas pela técnica PCR-MAS para a determinação do tipo de resistência. S292L com resistência para isoniazida (H); V219A com resistência para rifampicina (R) + H e outro isolado com resistência para R + H + Etambutol (E).

4.10 Análise dos resultados do Sequenciamento Genômico Completo (WGS)

Das 33 amostras, oito apresentaram o DNA íntegro para a formação da biblioteca genômica com posterior sequenciamento (Figura 15).

Figura 15 – Análise da contagem das leituras dos oitos isolados de *M. tuberculosis* sequenciados por WGS fornecida pelo software FASTQC

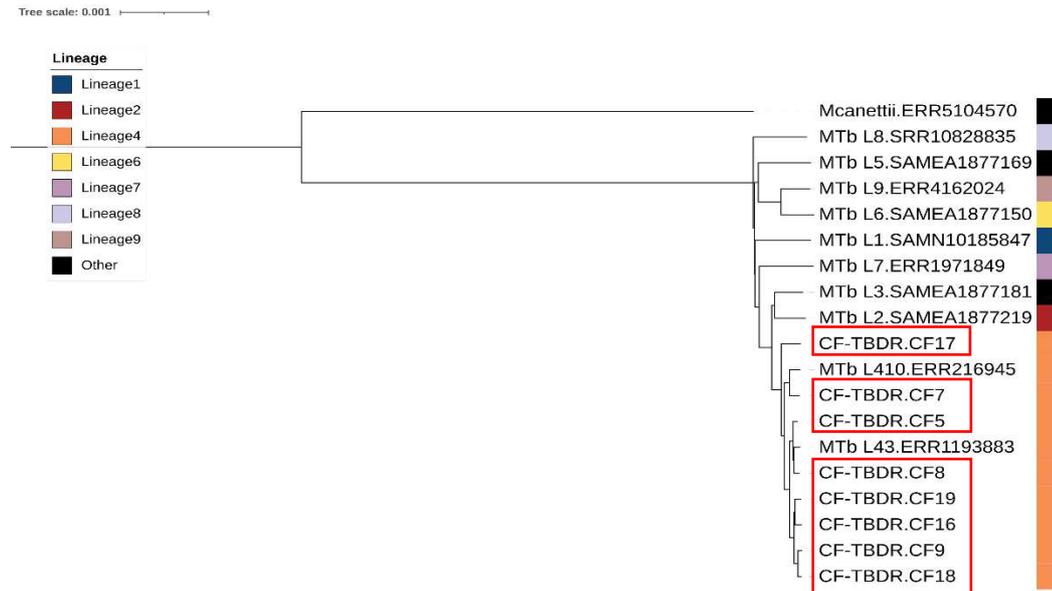


Fonte: Elaborado pelo autor. Criado com MultiQC. FastQC é uma ferramenta destinada ao controle de qualidade de dados provenientes de sequenciamento de alto rendimento. O eixo vertical representa a identificação em duplicata de cada um dos 8 isolados de *Mtb* e o eixo horizontal representa o número nucleotídeos em pares de base (pb) lidos por vez.

4.10.1 Caracterização da linhagem dos isolados micobacterianos

Entre as sete linhagens do CMTB conhecidas por infectar os seres humanos, foi identificada a linhagem 4 em todos os oito isolados. Esta linhagem é conhecida como Euro-americana. Na figura 16 é mostrada a árvore filogenética dos isolados de *Mtb* analisados neste estudo.

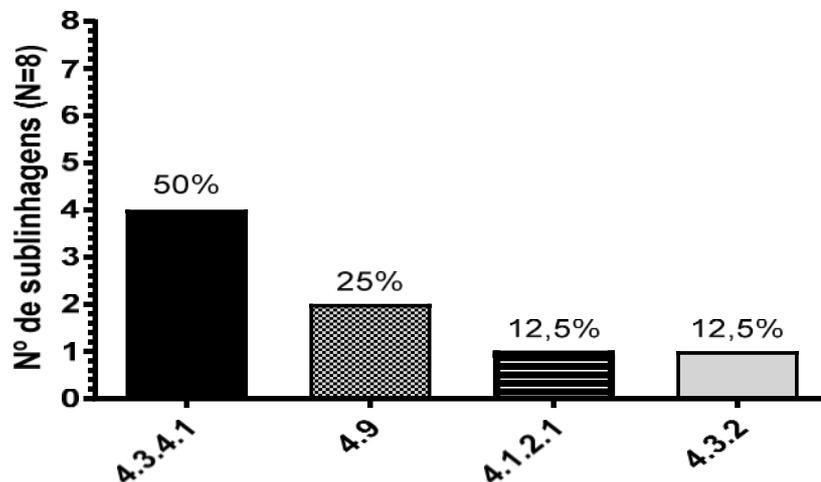
Figura 16 – Representação da árvore filogenéticas dos isolados de *M. tuberculosis*



Fonte: Elaborado pelo autor. Em destaque, os oito isolados de *Mtb* que tiveram a sua linhagem genética determinada através da técnica WGS - Sequenciamento Genômico Completo. A espécie *M. canettii* indica outro grupo da árvore filogenética e os isolados adicionais constituem referências representativas para cada linhagem específica de *Mtb*.

Categorizando cada amostra pela sublinhagem, foram identificadas que 50% (4/8) dos isolados pertencem ao subgrupo 4.3.4.1, 25% (2/8) estão classificadas no sublinhagem 4.9, 12,5% (1/8) correspondem a 4.1.2.1 e 12,5% (1/8) a sublinhagem 4.3.2 (Gráfico 7). A sublinhagem 4.3.2, identificada em um isolado do nosso estudo, é conhecida como Latino-Americana-Mediterrâneo (LAM).

Gráfico 7 – Classificação dos isolados de *M. tuberculosis* de acordo com a sublinhagem identificada pelo WGS



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.11 Alterações genéticas relacionadas a resistência aos fármacos antimicobacterianos, identificados por *whole genome sequencing*

Entre os oito isolados de *Mtb* sequenciados, foi encontrado um percentual de resistência de 62,5% (5/8). Para resistência à R foi detectado mutação no códon 531 (TCG para TTG) e no códon 435 (Asp435Tyr) do gene *rpoB* em uma taxa de 50% (4/8). Deste total (N=8), quatro isolados apresentaram perfil fenotípico de resistência determinado e destes dois isolados tiveram a resistência confirmada por WGS. Já pela técnica PCR-MAS foi determinada uma taxa de 62,5 (5/8) para a presença de mutação no gene *rpoB*, entretando, apenas três isolados destes, 37,5% (3/8), foram correspondentes as mutações no gene *rpoB* encontradas através da técnica WGS (Tabela 11).

Em relação à resistência à H, através do método do WGS foram identificadas por mutações no gene *katG* (Ser315Thr) em 25% (2/8), e na posição 777C>T do gene *inhA* em 25% (2/8), mais especificamente no promotor do gene (15C>T), já pelo método da PCR-MAS verificamos uma taxa de mutação de 62,5 (5/8) para mutações encontradas no gene *katG* e um percentual de 37,5% (3/8), encontradas na região intergênica *oxyR-ahpC*.

Quanto a detecção de variações genéticas no gene *pncA*, o WGS evidenciou uma taxa de 25% (2/8) (Trp119Cys e Val139Gly), enquanto não foi encontrada mutação por PCR-MAS.

Em relação ao gene *embB*, o WGS evidenciou um percentual de alterações genéticas (Gln497Lys) de 12,5% (1/8), enquanto a PCR-MAS detectou uma taxa de 25% (2/8). Referente ao gene *rpsL*, associado à resistência à estreptomicina, o WGS demonstrou uma taxa de 37,5% (3/8) de mutações no referido gene (Lys88Arg e Lys43Arg). Enquanto que a PCR-MAS apresentou uma taxa de 12,5% (1/8) para a detecção de modificações no DNA (Tabela 11).

Referente a mutações no gene *ethA*, o WGS, assim como a PCR-MAS, não detectaram alterações na região analisada. Contudo, o WGS identificou resistência a etionamida em 25% (2/8) das amostras, associada a mutações no gene *inhA* (777C>T) (Tabela 11).

Uma proporção de 12,5% (1/8) foi determinada pelo WGS para mutação no gene *gyrA* (Ala90Val), que está relacionado a resistência as fluoroquinolonas. Por outro lado, através da PCR-MAS não foi constatado alterações genéticas no referido gene (Tabela 11).

Mutações não foram determinadas nos genes *gidB*, *rrs* e *Rv1258c* nos oito isolados por ambas as técnicas, WGS e PCR-MAS. A tabela 12 apresenta uma descrição das mutações identificadas no âmbito deste estudo, acompanhadas das correspondentes associações com os fármacos pertinentes.

Tabela 11 – Identificação das mutações através das técnicas de WGS e PCR-MAS dos 8 isolados de *M. tuberculosis*

ID	Rifampicina		Isoniazida		Pirazinamida		Etambutol		Estreptomicina		Etionamida		Fluoroquinolonas	
	WGS	PCR-MAS	WGS	PCR-MAS	WGS	PCR-MAS	WGS	PCR-MAS	WGS	PCR-MAS	WGS	PCR-MAS	WGS	PCR-MAS
5t	---	---	---	---	---	---	---	<i>embB</i>	---	---	---	---	---	---
7t	---	---	---	<i>oxyR-ahpC</i>	---	---	---	<i>embB</i>	---	---	---	---	---	---
8t	<i>rpoB</i> Ser450 Leu	<i>rpoB</i>	<i>katG</i> Ser31 5Thr	<i>katG/</i> <i>oxyR-ahpC</i>	<i>pncA</i> Trp119 Cys	---	---	---	<i>rpsL</i> Lys88A rg	---	---	---	---	---
9t	<i>rpoB</i> Ser450 Leu	<i>rpoB</i>	---	<i>katG</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
16t	---	<i>rpoB</i>	<i>inhA</i> C- 777T	---	---	---	---	---	---	<i>rpsL</i>	<i>inhA</i> C- 777T	---	---	---
17t	<i>rpoB</i> Asp43 5Tyr	---	<i>inhA</i> C- 777T	<i>katG</i>	<i>pncA</i> Val139 Gly	---	<i>embB</i> Gln49 7Lys	---	<i>rpsL</i> Lys88A rg	---	<i>inhA</i> C- 777T	---	<i>gyrA</i> Ala90 Val	---
18t	<i>rpoB</i> Ser450 Leu	<i>rpoB</i>	<i>katG</i> Ser31 5Thr	<i>katG/</i> <i>oxyR-ahpC</i>	---	---	---	---	<i>rpsL</i> Lys43Ar g	---	---	---	---	---
19t	---	<i>rpoB</i>	---	<i>katG</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Fonte: Elaborado pelo autor. WGS posição do códon correspondente em *M. tuberculosis*. (-) Ausência de mutações. *rpoB* Ser450Leu ou TCG531TTG; *inhA* C-777T ou C-15T. Amostras com o perfil fenotípico pré-determinado 5t, 7t, 8t, 9t.

Tabela 12 – Comparação das mutações nos genes *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC*, *gyrA*, *pncA*, *embB*, *rpsL*, *gidB*, *rrs*, *ethA* e *Rv1258c* e fenótipo de resistência em isolados de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos, Fortaleza, Ceará

Fármaco ou classe	Gene (aa ou nt)	Fenótipo Resistencia (N=24)		PCR-MAS (N=33)	WGS (N=8)
		S N (%)	R N (%)	N (%)	Mutação positiva N (%)
Rifampicina	Total ^a	4 (16,7)	20 (83,3)	11 (33,3)	4 (50)
	<i>rpoB</i> (Ser531Leu e/ou Asp435Tyr)			10 (30,3)	4 (50)
	<i>Rv1258c</i> (Val219Ala)			1 (3,0)	-
	<i>Rv1258c</i> (Ser292Leu)			-	-
Isoniazida	Total ^a	1 (4,2)	23 (95,8)	32 (97,0)	4 (50)
	<i>katG</i> (Ser315Tre e/ou Ser315Thr)			22 (66,7)	2 (25)
	<i>oxyR-ahpC</i>			12 (36,4)	-
	<i>inhA</i> (C-15T)			1 (3,0)	2 (25)
	<i>inhA</i> (Ser94Ala)			-	-
	<i>Rv1258c</i> (Ser292Leu)			2 (6,1)	-
Etambutol	Total ^a	17 (70,8)	7 (29,2)	14 (42,4)	1 (12,5)
	<i>embB</i> (Met306Val e/ou Gln497Lys)			11 (33,3)	1 (12,5)
	<i>Rv1258c</i> (Val219Ala)			2 (6,1)	-
	<i>Rv1258c</i> (Ser292Leu)			2 (6,1)	-
Estreptomicina	Total ^a	18 (75)	6 (25)	7 (22,2)	3 (37,5)
	<i>rpsL</i> (Lis43Arg e/ou Lys88Arg)			2 (6,1)	3 (37,5)
	<i>gidB</i> (Ala80Pro)			4 (12,1)	-
	<i>rrs</i> (A1401G)			-	-
	<i>Rv1258c</i> (Ser292Leu)			1 (3,0)	-
	<i>Rv1258c</i> (Val219Ala)			2 (6,1)	-
Fluoroquinolonas	Total ^a	nd	nd	3 (3,0)	1 (12,5)
	<i>gyrA</i> (Asp94Ala e/ou Ala90Val)			3 (3,0)	1 (12,5)
Pirazinamida	Total	nd	nd	-	2 (25)
	<i>pncA</i> (His57Tir e/ou Trp119Cys)	-	-	-	2 (25)
Aminoglicosídeos amicacina, canamicina, ou capreomicina	Total ^a	nd	nd	-	-
	<i>rrs</i> (A1401G)	-	-	-	-
Etionamida	Total ^a			4 (12,1)	2 (25)
	<i>inhA</i> (C-15T)			1 (3,0)	2 (25)
	<i>inhA</i> (Ser94Ala)			-	-
	<i>ethA</i> (Tre8Ala, Tre11Cis)	nd	nd	-	-
	<i>Rv1258c</i> (Ser292Leu)			2 (6,1)	-
	<i>Rv1258c</i> (Val219Ala)			2 (6,1)	-

Fonte: Elaborado pelo autor. ^atotal de isolados de *Mtb* com mutações únicas ou em acúmulo em genes diferentes; nd, teste não realizado; -, mutação não encontrada. PCR-MAS, PCR multiplex alelo específico; WGS, sequenciamento genômico completo. Aminoácidos (aa): Asp, Aspartato, Ala, alanina; Cis, cisteína; H, histidina; L, leucina; Lis, lisina; Met, metionina; Pro, prolina; R, arginina; Ser, serina; Tir, tirosina; Tre, treonina; V, valina. Nucleotídeos (nt): A, adenina; G, guanina; C, citosina; T, timina.

5 DISCUSSÃO

Analisando os perfis de resistência aos fármacos dos 24 participantes que possuíam dados clínicos preestabelecidos, um total de 23 destes apresentaram resistência à H, onde apenas três foram monorresistentes para a droga em questão; as outras 20 amostras exibiram resistência associada a outros fármacos. Em comparação a monorresistência identificada entre H e R, a proporção foi de três para um, ou seja, à monorresistência à H foi 3 vezes mais frequente do que à R.

De acordo com Pillay *et al.* (2022), a monorresistência à H é considerada outra ameaça à terapia da tuberculose, sendo este tipo de resistência capaz de triplicar as chances de resultados negativos ao desfecho de cura com o tratamento, além de ser um agente favorável para o desenvolvimento de TB-MDR. É importante ressaltar que em certos municípios do Brasil, o TRM-TB é aplicado para o diagnóstico da TB, e embora apresente um resultado rápido, cerca de duas horas, com a necessidade de apenas uma amostra de escarro, a técnica detecta apenas cepas resistentes à R, não detectando à monorresistência à H (BRASIL, 2019a).

Para diminuir a possibilidade de falha no tratamento, é necessário entender que o diagnóstico da resistência à H é considerado o mais complicado de ser realizado por meio de ensaios moleculares, visto que o fenótipo resistente está relacionado às mutações em diferentes genes. Portanto, deve ser realizado o TSA para a detecção da monorresistência a esse fármaco. Desta forma, pode-se direcionar um tratamento mais adequado para o paciente (RETA *et al.*, 2022).

No que se refere a resistência à R, dos 24 participantes do estudo que apresentavam dados clínicos, 20 apresentaram resistência ao referido fármaco, seja em monorresistência ou associados a outros medicamentos. Além disso, foi determinado que onze perfis fenotípicos dos 24 indivíduos estudados se categorizaram como TB multirresistente, ou seja, resistentes a pelo menos à H e à R, que são fármacos de primeira linha aplicados na terapia da tuberculose.

A resistência à R já está bem consolidada na literatura. Demelash *et al.* (2023) relatam que em 2019, aproximadamente meio milhão de pessoas adquiriram TB resistente à R, e dessas, 78% foram identificadas com TB-MDR. Singpanomchai *et al.* (2021) indicam que a resistência concomitante ente H e R (TB-MDR), que são os medicamentos mais eficazes no tratamento da TB, aumenta a duração da transmissibilidade da doença, resultando no aumento da incidência de casos graves, das taxas de mortalidade e dos fracassos terapêuticos.

Além disso, Dookie *et al.* (2022) relatam que dentre os tipos de TB-DR, geralmente reportados, encontram-se cepas de Mtb com resistência somente à R ou que possuem uma

resistência complementar à H (TB-RR/MDR), ou ainda podem estar associadas a qualquer outro fármaco de primeira ou segunda linha.

No nosso estudo não foram incluídos menores de 18 anos de idade, portanto, a mediana da idade dos 24 participantes foi de 44,5 anos. É de conhecimento geral que a TB afeta todas as faixas etárias. Contudo, em adultos, a proporção de TB primária vem aumentando, chegando a refletir cerca de 34% de todas as ocorrências de TB nesse grupo etário. Além disso, TB pós-primária é vista como uma patologia da adolescência e de fase adulta (WETSCHEREK *et al.*, 2022). O nosso estudo encontrou que 41,7% dos participantes tinha TB pós-primária.

Ainda com relação aos 24 participantes, foi possível descrever alguns fatores sociais, como aqueles que declararam estarem desempregados à época, evidenciando um percentual de 70,8% (17/24); portadores de diabetes 29,2% (7/24); consumo de álcool 37,5% (9/24); tabagismo 37,5% (9/24); e a utilização de drogas ilícitas 8,3% (2/24).

A TB é uma doença ligada à condição de pobreza, e a influência exercida por fatores sociais já é amplamente descrita na literatura (CHAKAYA *et al.*, 2021; HARLING *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2022). Esses fatores são capazes de interferir no acesso ao diagnóstico e no tratamento da doença. Etilismo, tabagismo, subnutrição, estatuto socioeconômico, utilização de drogas, HIV/SIDA, diabetes etc. são alguns exemplos de aspectos sociais que aumentam a suscetibilidade das pessoas ao desenvolvimento de TB (CHAKAYA *et al.*, 2021; DUARTE *et al.*, 2021).

Entendendo a influência desses determinantes para a progressão da TB, é possível verificar no documento “Estratégia para o Fim da TB”, emitido pela OMS no ano de 2015, menções sobre a importância das políticas do setor social e de saúde para fortalecer as respostas nacionais à TB (WU *et al.*, 2023).

Ao verificar as características clínicas dos 24 participantes, foi observada uma taxa de 58,3% (14/24) para aqueles que nunca haviam realizado a terapia antibiótica para tratar a TB, caracterizando, dessa forma, a transmissão de resistência primária, ou seja, esses indivíduos foram infectados pela primeira vez por uma cepa do Mtb já resistente a pelo menos um fármaco anti-TB. Nossos resultados de resistência primária foram bem superiores aos encontrados em estudo realizado em São Paulo, de 36% (N=156) (SAVIOLI; MORRONE; SANTORO, 2019), e pouco inferiores aos encontrados no Rio de Janeiro, de 64,5% (N=31) (BHERING *et al.*, 2022).

É importante salientar que, menores índices de sucesso terapêutico estão associados à resistência do Mtb aos principais medicamentos de primeira e segunda linhas utilizados na terapia da TB (O'TOOLE, 2022).

De acordo com um estudo realizado na África do Sul, a disseminação de cepas de TB resistentes aos antibióticos (resistência primária) tem sido amplamente documentada em todo o globo. Além disso, baseados em seus achados, concluíram propondo que, para um controle mais eficaz da TB resistente, é crucial priorizar a interrupção da transmissão (SHAH *et al.*, 2017).

Ainda em relação aos participantes que afirmaram não ter recebido tratamento prévio para TB, uma taxa de 42,9% (6/14) foi observada como correspondente a um perfil fenotípico de resistência à H+R (TB-MDR). Diversas pesquisas vêm evidenciando que a transmissão de TB-MDR primária está cada vez mais frequente, resultando em uma maior prevalência para esse tipo de resistência (BHERING; KRITSKI, 2020).

Cerca de 50% (12/24) dos participantes do estudo, alegaram que a possível transmissão da TB ocorreu no âmbito domiciliar, devido à convivência com agregados familiares já acometidos pela doença. Adane *et al.* (2020) relatam que a transmissão da TB depende principalmente de fatores de risco ambientais e pessoais, particularmente em ambientes sociais onde há aglomeração e exposição prolongada a pacientes com TB ativa. Além disso, ressaltam que a identificação e o exame de indivíduos infectados que estiveram em contato com pacientes de TB representam a abordagem mais eficiente para prevenir a disseminação da doença nas comunidades.

Prosseguindo com a análise dos dados clínicos, referente às lesões cavitárias evidenciadas no exame radiográfico, a maioria dos participantes apresentou um perfil de resistência TB-MDR, com uma taxa de 46,15% (6/13).

Objetivando descrever dados comparativos sobre sinais radiológicos entre TB sensível e TB-MDR, uma pesquisa bibliográfica realizada por Wáng *et al.* (2018) relatou que as lesões cavitárias estão presentes em cerca de 70% dos pacientes com TB-MDR e 30% em pacientes com TB sensível. A pesquisa também ressalta que as chances são maiores na TB-MDR de as cavidades serem múltiplas e de tamanho aumentado. Além disso, quando é evidenciado a presença de três ou mais cavidades, há uma grande possibilidade de ser TB-MDR.

A presença da TB cavitária, além de estar relacionada a fracassos terapêuticos, também aumenta a possibilidade de transmissão do Mtb. Nas cavidades, devido à formação de uma zona de replicação com um alto teor de oxigênio, ocorre um rápido crescimento de micobactérias, o que pode elevar as taxas de mutações e resultar no desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Além disso, as cavidades são pouco vascularizadas, o que restringe a penetração dos antibióticos utilizados no tratamento. (URBANOWSKI *et al.*, 2020).

Essa exposição diferenciada aos fármacos nas lesões tuberculares também pode ser capaz de promover a resistência antibiótica em cepas de Mtb (STRYDOM *et al.*, 2019).

As características fenotípicas produzidas por mutações genéticas que conferem resistência ao Mtb são consideradas diversificadas e complexas. Isso ocorre porque algumas mutações podem conferir à micobactéria uma resistência intensa a um fármaco, ao passo que outras mutações resultarão em uma resistência moderada. Além disso, existem as 'mutações silenciosas', que, apesar de alterarem uma sequência de DNA, não conferem qualquer manifestação fenotípica de resistência (DICKS; STOUT, 2019)

Utilizando a técnica de PCR-MAS, dos 33 isolados analisados para identificação de marcadores genéticos associados à resistência a medicamentos, 97% (32/33) exibiram mutações genéticas. Em 3% (1/33) dos isolados, não foram identificadas alterações genéticas nas regiões gênicas pesquisadas através da PCR-MAS; no entanto, esse isolado apresentou um perfil fenotípico de resistência à H+R (TB-MDR). No que diz respeito a R, é possível que a mutação que lhe conferiu resistência esteja em outra região do gene *rpoB*, e para H, a resistência ocorre de forma mais complexa, pois está relacionada à mutações em múltiplos genes (GUO; CHONGSUUVIVATWONG; LEI, 2022; RETA *et al.*, 2021).

Devido à complexidade do tratamento da TB-DR, é essencial a aplicação de técnicas de identificação ágil do perfil de sensibilidade aos antibióticos, como a PCR-MAS. Dessa forma, é possível auxiliar na administração de fármacos adequados na terapêutica, bem como na prevenção da transmissão da doença (ULLAH *et al.*, 2019).

Conforme Tajbakhsh *et al.* (2018), a PCR-MAS é uma técnica fácil, rápida, com custo acessível, específica e extremamente sensível. O método foi aplicado em seu estudo para a identificação de mutações no gene *rpoB* que está relacionado à resistência à R. Foram investigados 88 isolados positivos para Mtb, sendo identificados um total de 51 (57,96%) isolados com mutações e 37 (40,04%) sem a presença de alterações genéticas.

Em nosso estudo, através da técnica PCR-MAS, identificamos um total de 67 mutações pontuais em 32 amostras, onde, os maiores percentuais de mutações genéticas encontradas estavam relacionados aos seguintes genes *katG* 32,8% (22/67), *oxyR-ahpC* 17,9% (12/67), *embB* 16,4% (11/67) e *rpoB* 16,4% (10/67).

Um estudo realizado por Zarei *et al.* (2017) analisou por meio da PCR-MAS a presença de mutações nos genes *rpoB* e *katG* em isolados de Mtb. Observou-se que, dentre as 38 amostras que apresentaram resistência fenotípica à H, foi identificado um total de 22 (57,9%) mutações no códon 315 do gene *katG*. Já das 30 amostras com o fenótipo de resistência à R, foi evidenciada apenas uma mutação no códon 531 do gene *rpoB*, com um percentual de 3,3%.

Alguns estudos conduzidos no Brasil evidenciaram uma maior prevalência da mutação Ser531Leu associada à resistência à R (ZAW; EMRAN; LIN, 2018).

Apesar dos genes e mecanismos específicos envolvidos na resistência do Mtb à R e à H terem sido bem documentados, a distribuição e a frequência dessas mutações podem apresentar variações geográficas (SOLO *et al.*, 2020).

Uma pesquisa visando investigar as mutações genéticas relacionadas ao perfil fenotípico de resistência à H em isolados clínicos de Mtb, determinou um percentual de ocorrências de 60% (9/15) em *katG* com prevalência do códon 315, 20% (3/15) em *inhA* (-15), 46,7% (7/15) na região intergênia *oxyR-ahpC*. O percentual de alterações gênicas em *furA*, *kasA* e *ndh* foi de 6,7 (1/15), 26,7% (4/15) e 20% (3/15) respectivamente (BAKHTIYARINIYA *et al.*, 2022). Dos 24 isolados com perfil fenotípico pré-estabelecido, 18 demonstraram alterações gênicas correlacionada com a resistência à H. Em nosso estudo, observamos que uma proporção significativa de 94,4% (17/18) dos isolados com mutações no códon 315 de *katG*, na região intergênica de *oxyR-ahpC* e região promotora -15C *inhA* foram relacionadas com o fenótipo de resistência à H, estando em acordo com a literatura (GUO; CHONGSUVIVATWONG; LEI, 2022; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021b). Somente um isolado (5,6%; 1/18) com mutação no *katG*, foi evidenciado o perfil de monorresistência à R.

Embora grande parte das mutações associadas à resistência à H ocorra em uma taxa de 60% no gene *katG* (S315T) e 19% no gene *inhA*, à resistência a esse fármaco também pode ocorrer devido a mutações em um ou vários genes, como no promotor *mabA-inhA*, nos genes *mshA*, *nat*, *ndh*, *kasA* e *ahpC* (TAFESS *et al.*, 2024).

Por mais que estudos evidenciem um índice relativamente alto de mutações ocorridas em *inhA*, em nossa análise, com a PCR-MAS, a segunda maior frequência de alterações genéticas identificadas foi na região *oxyR-ahpC*, 36,4% (12/33), enquanto que no gene *inhA* foi localizada apenas uma mutação (C15T), 3% (1/33).

A nossa pesquisa identificou um percentual moderadamente elevado de mutações no códon 306 do gene *embB*, que foi de 33,3% (11/33). O E é um medicamento bacteriostático e é sugerido que o mesmo atue impedindo a ação do operon *embCAB*, que está associado a biossíntese de arabinogalactano na parede celular da Mtb. Contudo, processos específicos em nível molecular ainda são objetos de estudos (KAUR *et al.*, 2022).

O E é um fármaco de primeira linha, considerado um possível agente complementar para um esquema de tratamento da TB-MDR e da TB-XDR. O mesmo também pode ser

aplicado em esquemas de TB de forma preventiva contra uma possível resistência não detectada a um dos três principais medicamentos. Um risco elevado de insucesso terapêutico e a aquisição de resistência suplementar estão associados a pacientes acometidos por isolados de Mtb, demonstrando resistência concomitante ao E e H, ou E e R (BARLIANA *et al.*, 2023)

Em TB-MDR, as mutações que conferem resistência ao E são evidenciadas em um percentual de 50-70%, com predominância no códon 306 do gene *embB* (MOHAMMADI *et al.*, 2020). Ainda que a maior prevalência das mutações associadas à resistência ao E ocorram no gene *embB*, o que o torna um potencial marcador genético, certas alterações gênicas no *embA* também estão relacionadas à resistência ao E. No entanto, mutações no *embAB* já foram evidenciadas em isolados não resistentes ao E (LI *et al.*, 2020).

Sabemos que o gerenciamento consistente e tratamento correto de indivíduos com TB são essenciais para combater essa ameaça à saúde pública global. Contudo, com o advento de estirpes de Mtb resistentes aos fármacos, o tratamento da TB tornou-se ainda mais complexo. Para que haja um protocolo terapêutico apropriado, um diagnóstico avaliativo quanto as resistências são de suma importância, e pode ser realizado pela aplicação do TSA, bem como WGS (KHAWBUNG; NATH; CHAKRABORTY, 2021).

Ainda com relação ao método PCR-MAS, para os genes utilizados na identificação de mutações, foi indicado uma taxa de 62,5% (20/32) dos isolados que possuíam alterações genéticas de forma concomitantes com outras mutações. A presença de múltiplas mutações em uma cepa de Mtb que resultam em resistência fenotípica a uma variedade de fármacos é preocupante, pois tende a limitar significativamente as opções de tratamento disponíveis (JABBAR *et al.*, 2019).

Estudos vêm evidenciando que a resistência aos medicamentos anti-TB no Mtb também está relacionada a mecanismos adicionais, como à expressão de bombas de efluxo (KANJI; HASAN; HASAN, 2019; LAWS; JIN; RAHMAN, 2022). As bombas de efluxo são responsáveis por expulsar vários compostos do meio intracelular das micobactérias, inclusive fármacos, reduzindo assim o efeito tóxico do medicamento para a célula. Comumente, esse mecanismo de efluxo confere uma resistência de baixas proporções, contudo são determinantes na evolução de elevados níveis de resistência do Mtb (GHAJAVAND *et al.*, 2019).

Estudos prévios indicaram o envolvimento do gene *Rv1258c* ou Tap ou P55 na determinação de resistência medicamentosa em diversos isolados clínicos de Mtb (FARZANEH *et al.*, 2024; MACHADO *et al.*, 2017; OH *et al.*, 2017). Este gene, tem sido relacionado com tolerância induzida por macrófagos à rifampicina (ADAMS *et al.*, 2019). A expressão deste gene é induzida quando as micobactérias residem em macrófagos humanos cultivados, bem

como em micobactérias presentes no escarro de pacientes com TB submetidos a tratamento com rifampicina. São descritas várias mutações associadas à resistência, contudo as mutações V219A e S292L são as mais relevantes, sendo associadas também com fenótipo resistente à H e Z (JIA *et al.*, 2022).

Shahi *et al.* (2021), ao realizarem um estudo para avaliar em isolados clínicos de TB-MDR a presença de mutações genéticas e a superexpressão de cinco genes de bombas de efluxo, inclusive o *Rv1258c*, concluíram que a resistência da TB-MDR foi decorrente da junção entre a ocorrência de mutações em genes alvos com o efluxo de fármacos. Além disso, em isolados clínicos de TB-XDR já houve a identificação de diversos polimorfismos de nucleotídeo único no gene *Rv1258c*, incluindo o V219A e S292L (JIA *et al.*, 2022).

Algumas dificuldades estão relacionadas ao diagnóstico da TB-DR, como o TSA em meios de cultura sólido, que levam mais tempo para apresentar resultados, de 3 a 8 semanas. Em culturas líquidas, como BACTEC (MGIT[®]), os desfechos ocorrem de 10 a 30 dias e estão mais susceptíveis a contaminação por micobactérias não tuberculosas (MNT), cultivo de outras espécies do CMTB e demandam sistemas de alta complexidade e custo. Além disso, os métodos de cultura exigem pessoal qualificado e instalações de biossegurança, limitando sua aplicação em países de baixa ou média renda para a detecção da TB-DR (NGUYEN *et al.*, 2019).

Diversas técnicas de diagnóstico molecular estão disponíveis para a detecção tanto da TB como da sua resistência aos fármacos. A exemplo disso, temos o Teste Rápido Molecular para TB (TRM-TB) por Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA) que identifica o DNA do *Mtb* e a resistência à R. Contudo o teste não detecta a monorresistência à H ou à resistência combinada à H + E; nosso estudo encontrou 12,5% e 4,2% respectivamente. A implementação dessas novas tecnologias ainda é um obstáculo, pois em muitas partes do mundo a infraestrutura de saúde não está adequadamente preparada para realizar tais testes (GÜNTHER; RUSWA; KELLER, 2022).

A realização de tratamento tardio e inapropriado, a presença de infecções concomitantes com outros microrganismos e o excesso de uso de antibióticos podem estender a duração da terapia, ocasionando assim, em uma intensificação na taxa de mutação no *Mtb*, resultando no desenvolvimento de cepas que são resistentes aos fármacos (DAOQUN *et al.*, 2017). Isso significa que as alterações genéticas que resultam na resistência medicamentosa têm como causa a pressão seletiva do medicamento, que é responsável por impulsionar uma mudança gradual nas características do *Mtb* (SINGH; CHIBALE, 2021).

Alguns estudos sugerem que devido à alta estabilidade dos genomas do *Mtb* dentro do hospedeiro, as mutações que resultam em resistência aos fármacos apresentam uma

tendência em permanecer ao longo do tempo. Além disso, a pressão dos medicamentos parece limitar a diversificação das cepas do Mtb em outras áreas do genoma, concentrando-se principalmente nos locais que conferem resistência aos medicamentos utilizados no tratamento (LEY *et al.*, 2019).

Com a aplicação do WGS em 8 isolados clínicos, conseguimos identificar uma taxa de mutações gênicas equivalente a 62,5% (5/8). Um estudo realizado por Nonghanphithak *et al.* (2020) teve como objetivo criar um paralelo entre os perfis de TSA de isolados de Mtb resistentes, por meio de testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando placas Sensititre MYCOTBI (MYCOTB) e um TSA baseado em WGS. Os resultados do estudo destacam que o WGS possui uma elevada eficácia na identificação de TB-DR e na correlação entre a presença de mutações específicas com os níveis do CIM.

As linhagens filogenéticas do CMTB se distribuem geograficamente de forma diversificada, ocorrendo de maneira endêmica em várias localidades do mundo. As espécies Mtb *sensu stricto* e *M. africanum* são as principais integrantes do CMTB responsáveis em ocasionar a doença em humanos. Essas duas espécies de micobactérias se dividem em sete linhagens filogenéticas, sendo as linhagens 1, 2, 3, 4 e 7 para Mtb e as linhagens 5 e 6 para *M. africanum* (NAPIER *et al.*, 2020).

Mais recentemente, foram identificadas duas linhagens, a 8 e 9. As linhagens 1, 2, 3 e 4 são encontradas em todo o mundo; em contraste, as outras cinco linhagens têm uma distribuição geográfica mais restrita, podendo ser detectadas apenas no continente africano. A linhagem 4, conhecida como Euro-Americano, pode ser dividida em oito sublinhagens: Camarões, Uganda, Gana, tipo X, H37Rv, Haarlem, LAM e TUR (NOORIZHAB *et al.*, 2023).

A linhagem 4 e a linhagem 2, sendo essa última denominada de Leste Asiático, são as variações genéticas que apresentam a maior distribuição territorial, sendo amplamente distribuída por todo o globo (CLICK *et al.*, 2020). Além disso, essas duas linhagens possuem uma forte ligação com a resistência aos medicamentos (GUIMARÃES *et al.*, 2020).

Em nossa pesquisa, após a aplicação do WGS para verificar as linhagens filogenéticas dos isolados estudados, foi constatado que todas as cepas pertenciam a linhagem 4. Woodman, Haeusler e Grandjean (2019) relatam que há uma predominância da linhagem Euro-Americano na América do Sul, onde, sua distribuição global reforça a teoria de que ela foi introduzida e espalhada pelos colonizadores europeus entre os séculos XVI e XIX.

Um estudo realizado no sul do Brasil, avaliou 305 isolados de Mtb resistentes a medicamentos, identificando uma predominância de 99,3% para a linhagem 4. Adicionalmente, foi realizado uma análise quanto as sublinhagens dessas estirpes, sendo encontrado um

predomínio constituído pelas seguintes variantes, 4.3.4.2 (América Latina e Mediterrâneo - LAM/RD174), 4.3.3 (LAM/RD115) e 4.1.2.1 (Haarlem/RD182) (SALVATO *et al.*, 2021).

Ao avaliarmos os determinantes genotípicos relacionados à resistência aos medicamentos pelo Mtb, obtidos através dos resultados dessa pesquisa, não houve a identificação de nenhum determinante novo. Contudo, este estudo corrobora com vários outros encontrados na literatura. Isso significa que nossos resultados estão consistentes com as descobertas anteriores, reforçando a importância e a confiabilidade desses determinantes genotípicos na resistência aos medicamentos pelo Mtb.

Com relação as limitações desse estudo, alguns dos isolados investigados aqui apresentaram um DNA de baixa qualidade que inviabilizaram a análise por WGS. Dificuldades foram apontadas na apuração das informações dos participantes da pesquisa, como a localização dos dados do paciente junto ao hospital, onde alguns destes sequer estavam cadastrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAM.

Tanto a PCR-MAS quanto o WGS são técnicas altamente sensíveis. Contudo é preciso salientar a presença de certas limitações metodológicas. A PCR-MAS apresenta um custo mais acessível, é utilizada para a pesquisa de mutações já conhecidas e apresenta riscos de falsos positivos e falsos negativos. O WGS dispõe de um custo mais elevado, a análise de dados é mais complexa e pode ocorrer contaminação e erros durante o processo.

6 CONCLUSÃO

No âmbito desta pesquisa, identificamos que entre os isolados clínicos de *Mtb*, obtidos de um hospital de referência, ocorreu uma alta predominância de resistência aos fármacos anti-TB de primeira linha, R e H. Onde, uma parte significativa dos isolados evidenciaram resistência a pelo menos um desses antibióticos, com uma elevada prevalência para TB-MDR.

Exploramos a relação entre os dados sociodemográficas, hábitos sociais e comorbidades e o perfil de resistência aos fármacos. Embora uma alta frequência da TB-MDR tenha sido detectada em vários aspectos dos integrantes deste estudo, como em indivíduos com idade entre 40 e 49 anos, portadores de diabetes, tabagistas, entre outros, não foi comprovada diferença estatística quando comparados os perfis fenotípicos e as características dos participantes.

As análises genotípicas por meio da PCR-MAS evidenciaram uma alta incidência de alterações nos genes alvos em 32 dos 33 isolados estudados, indicando uma prevalência significativa de resistência genética associada aos fármacos utilizados no tratamento da TB.

O WGS foi capaz de prever mutações associadas à resistência em isolados resistentes, além de identificar mutações em isolados com fenótipo sensível, incluindo um isolado com perfil pré-extensivamente resistente

Além disso, o WGS determinou a linhagem 4 do CMTB para todos os isolados investigados nesta técnica, com uma predominância para a sublinhagem 4.3.4.1/LAM, fornecendo perspectivas sobre a epidemiologia molecular da TB na área orgânica.

Os dados obtidos com a presente pesquisa destacam a importância da contínua execução de vigilância e pesquisa relacionadas à genômica do *Mtb*, com o objetivo de um entendimento mais aprofundado dos mecanismos de resistência antibiótica. Dada a eficácia das novas metodologias e sua significativa contribuição para o controle da TB, é crucial continuar aprimorando as técnicas moleculares para que possam ser implementadas na prática clínica, visando medidas eficazes de controle, prevenção e tratamento dessa doença mundialmente prevalente.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMS, K. A.; BESRA, G. S. Mycobacterial cell wall biosynthesis: A multifaceted antibiotic target. **Parasitology**, v. 145, n. 2, p. 116–133, 2018.
- ADAMS, K. N. *et al.* Diverse Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Develop Macrophage-Induced Rifampin Tolerance. **Journal of Infectious Diseases**, v. 219, n. 10, p. 1554–1558, 2019.
- ADANE, A. *et al.* Prevalence and Associated Factors of Tuberculosis among Adult Household Contacts of Smear Positive Pulmonary Tuberculosis Patients Treated in Public Health Facilities of Haramaya District, Oromia Region, Eastern Ethiopia. **Tuberculosis Research and Treatment**, 2020.
- AHAMAD, N.; GUPTA, S.; PARASHAR, D. Using Omics to Study Leprosy, Tuberculosis, and Other Mycobacterial Diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. February, p. 1–15, 2022.
- ANJOS, T. R. DOS *et al.* Genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* variant bovis strains isolated from bovine in the state of Mato Grosso, Brazil. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2022.
- ANSARI, M. A. *et al.* Deciphering the emerging role of phytochemicals: Implications in the management of drug-resistant tuberculosis and ATDs-induced hepatic damage. **Journal of Infection and Public Health**, v. 16, n. 9, p. 1443–1459, 2023.
- ARORA, G. *et al.* Role of post-translational modifications in the acquisition of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **FEBS Journal**, v. 288, n. 11, p. 3375–3393, 2021.
- ASARE, P. *et al.* The Relevance of Genomic Epidemiology for Control of Tuberculosis in West Africa. **Frontiers in Public Health**, v. 9, n. July, p. 1–17, 2021.
- ASHLEY, R. E. *et al.* Recognition of DNA Supercoil Geometry by *Mycobacterium tuberculosis* Gyrase. **Biochemistry**, v. 56, n. 40, p. 5440–5448, 2017.
- BAKHTIYARINIYA, P. *et al.* Detection and characterization of mutations in genes related to isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Iran. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 7, p. 6135–6143, 2022.
- BARLIANA, M. I. *et al.* Genetic polymorphism related to ethambutol outcomes and susceptibility to toxicity. **Frontiers in Genetics**, v. 14, n. April, p. 1–12, 2023.
- BAYKAN, A. H. *et al.* Extrapulmonary tuberculosis: an old but resurgent problem. **Insights into Imaging**, 2022.
- BHERING, M. *et al.* Barriers faced by patients in the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis in Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 56, p. 1–11, 2022.
- BHERING, M.; KRITSKI, A. Primary and acquired multidrug-resistant tuberculosis: Predictive factors for unfavorable treatment outcomes in Rio de Janeiro, 2000a-2016. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 44, p. 1–10,

2020.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BRASIL. *et al.* Manual de Bacteriologia da Tuberculose. **Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2005.

BRASIL. Manual de Recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**, n. 2, p. 364, 2019a.

BRASIL. Guia de Vigilância em Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Ministério da Saúde**. v. único, p. 1–740, 2019b

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Tuberculose. **Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde**, p. 1–52, 2022.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Tuberculose. **Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde**, v. Mar. 2023, n. Número Especial, p. 1–64, 2023.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Tuberculose. **Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde**, v. Mar. 2024, n. Número especial, p. 1–72, 2024.

CANETTI, G.; RIST, N.; GROSSET, J. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. **Revue de tuberculose et de pneumologie**, v. 27, n. February 1963, p. 217–272, 1963.

CEARÁ. Boletim epidemiológico. Tuberculose. Fortaleza: Governo do Estado Ceará. **Secretaria da Saúde**, p. 1–15, 2021.

CEARÁ. Boletim epidemiológico. Tuberculose. Fortaleza: Governo do Estado Ceará. **Secretaria da Saúde**, p. 1–21, 2023.

CEARÁ. Boletim epidemiológico. Tuberculose. Fortaleza: Governo do Estado do Ceará. **Secretaria da Saúde**, p. 1–21, 2024.

CHAKAYA, J. *et al.* Global Tuberculosis Report 2020 – Reflections on the Global TB burden, treatment and prevention efforts. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 113, n. Suppl 1, p. S7–S12, 2021.

CLICK, E. S. *et al.* Phylogenetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in two geographically distinct locations in Botswana – The Kopanyo Study. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 81, n. January, p. 104232, 2020.

COHEN, K. A. *et al.* Deciphering drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using whole-genome sequencing: Progress, promise, and challenges. **Genome Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2019.

COLE, S. T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. NOVEMBER, p. 537–544, 1998.

CONCEIÇÃO, E. C. *et al.* Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil before the whole genome sequencing era: A literature review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 116, n. 1, p. 1–14, 2021.

CONKLE-GUTIERREZ, D. *et al.* Distribution of Common and Rare Genetic Markers of Second-Line-Injectable-Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Revealed by a Genome-Wide Association Study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 6, 2022.

COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

DALBERTO, P. F. *et al.* Handling the Hurdles on the Way to Anti-tuberculosis Drug Development. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, n. November, p. 1–27, 2020.

DAOQUN, L. *et al.* Screening mutations in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Yunnan, China. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 5, p. 630–636, 2017.

DE SOUZA, V. C. *et al.* Insights into the mechanism of ethionamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* through an in silico structural evaluation of etha and mutants identified in clinical isolates. **Catalysts**, v. 10, n. 5, p. 1–15, 2020.

DEMELASH, M. *et al.* Prevalence of rifampicin resistant pulmonary tuberculosis using geneXpert assay in Ethiopia, a systematic review and meta-analysis. **Heliyon**, v. 9, n. 9, p. e19554, 2023.

DICKS, K. V.; STOUT, J. E. Molecular diagnostics for *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Annual Review of Medicine**, v. 70, p. 77–90, 2019.

DOOKIE, N. *et al.* The Changing Paradigm of Drug-Resistant Tuberculosis. **Clinical Microbiology Reviews** v. 35, n. 4, p. 1–30, 2022.

DUARTE, R. *et al.* Different disease, same challenges: Social determinants of tuberculosis and COVID-19. **Pulmonology**, v. 27, n. 4, p. 338–344, 2021.

EHRT, S.; SCHNAPPINGER, D.; RHEE, K. Y. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 496–507, 2018.

ENGEL, N. *et al.* Rapid molecular tests for tuberculosis and tuberculosis drug resistance: a qualitative evidence synthesis of recipient and provider views. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2022, n. 4, 2022.

FARZANEH, S. S. *et al.* Novel mutation in efflux pump Rv1258c (Tap) gene in drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Iran. **Journal of infection in developing countries**, v. 18, n. 2, p. 243–250, 2024.

FRANCO, A. R.; PERI, F. Developing new anti-tuberculosis vaccines: Focus on adjuvants. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2021.

GHAJAVAND, H. *et al.* Scrutinizing the drug resistance mechanism of multi- and extensively-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Mutations versus efflux pumps. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2019.

GONG, W. *et al.* Peptide-Based Vaccines for Tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. January, p. 1–41, 2022.

GOOSSENS, S. N.; SAMPSON, S. L.; RIE, A. VAN. Mechanisms of Drug-Induced Tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. October 2020, p. 1–21, 2021.

GOPALASWAMY, R. *et al.* Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections - A comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 1–17, 2020.

GUIMARÃES, A. E. D. S. *et al.* Evaluation of drug susceptibility profile of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 1 from Brazil based on whole genome sequencing and phenotypic methods. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, n. 11, p. 1–6, 2020.

GÜNTHER, G.; RUSWA, N.; KELLER, P. M. Drug-resistant tuberculosis: advances in diagnosis and management. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 28, n. 3, p. 211–217, 2022.

GUO, S.; CHONGSUVIVATWONG, V.; LEI, S. Comparison on Major Gene Mutations Related to Rifampicin and Isoniazid Resistance between Beijing and Non-Beijing Strains of *Mycobacterium tuberculosis* A Systematic Review and Bayesian Meta Analysis. **Genes**, v. 13, n. 10, p. 1849, 2022.

GUPTA, R. S.; LO, B.; SON, J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. Feb., p. 1–41, 2018.

HARLING, G. *et al.* Determinants of tuberculosis transmission and treatment abandonment in Fortaleza, Brazil. **BMC Public Health**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017.

HEUPINK, T. H. *et al.* The MAGMA pipeline for comprehensive genomic analyses of clinical *Mycobacterium tuberculosis* samples. **PLoS Computational Biology**, v. 19, n. 11 November, p. 1–24, 2023.

HEYCKENDORF, J. *et al.* Tuberculosis Treatment Monitoring and Outcome Measures: New Interest and New Strategies. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 35, n. 3, p. 1–21, 2022.

HO, V. Q. T. *et al.* Heterologous Expression of ethA and katG in *Mycobacterium marinum* Enables the Rapid Identification of New Prodrugs Active against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 1–13, 2021.

- HORNE, D. *et al.* Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 6, 2019.
- ISLAM, M. M. *et al.* Detection of novel mutations associated with independent resistance and cross-resistance to isoniazid and prothionamide in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 8, p. 1041.e1-1041.e7, 2019.
- JABBAR, A. *et al.* Whole genome sequencing of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a high burden tuberculosis region of North West Pakistan. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.
- JIA, H. *et al.* Rv1258c acts as a drug efflux pump and growth controlling factor in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 133, p. 102172, 2022.
- KAMBLI, P. *et al.* Correlating rrs and eis promoter mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with phenotypic susceptibility levels to the second-line injectables. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, n. 1, p. 1–6, 2016.
- KANJI, A.; HASAN, R.; HASAN, Z. Efflux pump as alternate mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 66, n. 1, p. 20–25, 2019.
- KAUR, P. *et al.* The Genetics of Ethambutol-Induced Optic Neuropathy: A Narrative Review. **Neuro-Ophthalmology**, v. 46, n. 5, p. 304–313, 2022.
- KESTLER, B.; TYLER, S. K. Latent tuberculosis testing through the ages: the search for a sleeping killer. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 322, n. 3, p. L412–L419, 2022.
- KHAWBUNG, J. L.; NATH, D.; CHAKRABORTY, S. Drug resistant Tuberculosis: A review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 74, p. 101574, 2021.
- KHOSRAVI, A. D. *et al.* Frequency of rrs and rpsL mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Iranian patients. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 9, p. 51–56, 2017.
- LAWS, M.; JIN, P.; RAHMAN, K. M. Efflux pumps in *Mycobacterium tuberculosis* and their inhibition to tackle antimicrobial resistance. **Trends in Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 57–68, 2022.
- LEMPENS, P. *et al.* Isoniazid resistance levels of *Mycobacterium tuberculosis* can largely be predicted by high-confidence resistance-conferring mutations. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.
- LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. **Nucleic Acids Research**, p. 1–5, 2024.
- LEY, S. D. *et al.* Deciphering Within-Host Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* through Whole-Genome Sequencing: the Phenotypic Impact and Way Forward. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 83, n. 2, p. 1–21, 2019.

- LI, M. C. *et al.* Detecting Ethambutol Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in China: A Comparison Between Phenotypic Drug Susceptibility Testing Methods and DNA Sequencing of embAB. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. May, p. 1–7, 2020.
- LI, M. C. *et al.* RpoB mutations and effects on rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, n. October, p. 4119–4128, 2021.
- LI, S. *et al.* CRISPRi chemical genetics and comparative genomics identify genes mediating drug potency in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 766–779, 2022.
- LI, Y.; SUN, F.; ZHANG, W. Bedaquiline and delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Promising but challenging. **Drug Development Research**, v. 80, n. 1, p. 98–105, 2019.
- LIU, J. *et al.* Mutations in efflux pump Rv1258c (Tap) cause resistance to pyrazinamide, isoniazid, and streptomycin in *M. tuberculosis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 1–7, 2019.
- MACHADO, D. *et al.* Interplay between mutations and efflux in drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. APR, p. 1–18, 2017.
- MARURI, F. *et al.* A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 819–831, 2012.
- MASE, S.; CHORBA, T. Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. **Clinics in chest medicine**, v. 40, n. 4, p. 775–795, 2019.
- MCEVOY, C. R. E. *et al.* The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 87, n. 5, p. 393–404, 2007.
- MCNALLY, T. W. *et al.* Improving outcomes for multi-drug-resistant tuberculosis in the Peruvian Amazon - A qualitative study exploring the experiences and perceptions of patients and healthcare professionals. **BMC Health Services Research**, v. 19, n. 1, p. 1–17, 2019.
- MEKONNEN, D. *et al.* Lipid droplets and the transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis* from direct sputa: a literature review. **Lipids in health and disease**, v. 20, n. 1, p. 129, 2021.
- MOHAMMADI, B. *et al.* Frequency of Codon 306 Mutations in embB Gene of *Mycobacterium tuberculosis* Resistant to Ethambutol: A Systematic Review and Meta-Analysis Abstract. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 11, 2020.
- MOREL, F. *et al.* Molecular diagnosis of tuberculosis. **Revue des Maladies Respiratoires**, v. 37, n. 5, p. 412–416, 2020.
- NAPIER, G. *et al.* Robust barcoding and identification of *Mycobacterium tuberculosis* lineages for epidemiological and clinical studies. **Genome Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2020.

- NATARAJAN, A. *et al.* A systemic review on tuberculosis. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 67, n. 3, p. 295–311, 2020.
- NGABONZIZA, J. C. S. *et al.* Multidrug-resistant tuberculosis control in Rwanda overcomes a successful clone that causes most disease over a quarter century. **Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases**, v. 27, 2022.
- NGUYEN, T. N. A. *et al.* Molecular Diagnosis of Drug-Resistant Tuberculosis: A Literature Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. Mar, p. 1–12, 2019.
- NIMMO, C. *et al.* Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in the genomic era. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, n. October, p. 1–12, 2022.
- NONGHANPHITHAK, D. *et al.* Whole-genome sequence analysis and comparisons between drug-resistance mutations and minimum inhibitory concentrations of *Mycobacterium tuberculosis* isolates causing M/XDR-TB. **PLoS ONE**, v. 15, n. 12 December, p. 1–14, 2020.
- NOORIZHAB, M. N. F. *et al.* Exploration of the diversity of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex in Lagos, Nigeria using WGS: Distribution of lineages, drug resistance patterns and genetic mutations. **Tuberculosis**, v. 140, p. 102343, 2023.
- NOUBIAP, J. J. *et al.* Global prevalence of diabetes in active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis of data from 2·3 million patients with tuberculosis. **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 4, p. e448–e460, 2019.
- NUNES, J. E. S. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* shikimate pathway enzymes as targets for the rational design of anti-tuberculosis drugs. **Molecules**, v. 25, n. 6, 2020.
- OH, T. S. *et al.* RNA expression analysis of efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in South Korea. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 49, p. 111–115, 2017.
- O'TOOLE, R. F. Antibiotic resistance acquisition versus primary transmission in the presentation of extensively drug-resistant tuberculosis. **International Journal of Mycobacteriology**, 2022.
- PARISH, T.; STOKER, N. G. ***Mycobacterium tuberculosis* Protocols**. Totowa, Nova Jersey: Humana Press, 2001.
- PHELAN, J. E. *et al.* Integrating informatics tools and portable sequencing technology for rapid detection of resistance to anti-tuberculous drugs. **Genome Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2019.
- PILLAY, S. *et al.* Xpert MTB/XDR for detection of pulmonary tuberculosis and resistance to isoniazid, fluoroquinolones, ethionamide, and amikacin. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2022, n. 5, 2022.
- QIN, Y. *et al.* The relationship between previous pulmonary tuberculosis and risk of lung cancer in the future. **Infectious Agents and Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2022.

- RAKOTOSAMIMANANA, N. *et al.* Exploring tuberculosis by molecular tests on DNA isolated from smear microscopy slides. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 56, p. 248–252, 2017.
- RAMIREZ, L. M. N.; VARGAS, K. Q.; DIAZ, G. Whole genome sequencing for the analysis of drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review for bedaquiline and delamanid. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, p. 1–14, 2020.
- RETA, M. A. *et al.* Prevalence of drug resistance-conferring mutations associated with isoniazid- and rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 26, p. 207–218, 2021.
- RETA, M. A. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Drug Resistance in Ethiopia: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 10, p. 1–20, 2022.
- ROSSINI, N. D. O.; VINICIUS, M.; DIAS, B. Mutations and insights into the molecular mechanisms of resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. **Genetics and Molecular Biology**, v. 46, n. 1, p. 1–17, 2023.
- RUIZ-TAGLE, C.; NAVES, R.; BALCELLS, M. E. Unraveling the role of micrnas in *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease: Advances and pitfalls. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 3, p. 1–17, 2020.
- SAKTIAWATI, A. M. I. *et al.* Diagnosis of tuberculosis through breath test: A systematic review. **EBioMedicine**, v. 46, p. 202–214, 2019.
- SALVATO, R. S. *et al.* Genomic-based surveillance reveals high ongoing transmission of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Southern Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 58, n. 4, p. 106401, 2021.
- SANTOS, F. DE J. *et al.* **Manual técnico de investigação laboratorial de tuberculose**. Rio de Janeiro.
- SAVIOLI, M. T. G.; MORRONE, N.; SANTORO, I. Primary bacillary resistance in multidrug-resistant tuberculosis and predictive factors associated with cure at a referral center in São Paulo, Brazil. **Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 45, n. 2, p. e20180075, 2019.
- SEID, A.; BERHANE, N.; NUREDDIN, S. Frequency of rpoB, katG, and inhA Gene Polymorphisms Associated with Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates among Ethiopian TB Patients: A Systematic Review. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2022, 2022.
- SHAH, N. S. *et al.* Transmission of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in South Africa. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 3, p. 243–253, 2017.
- SHAHI, F. *et al.* Investigation of the Rv3065, Rv2942, Rv1258c, Rv1410c, and Rv2459

efflux pump genes expression among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **Heliyon**, v. 7, n. 7, p. e07566, 2021.

SILVA, D. R. *et al.* Diagnosis of tuberculosis: a consensus statement from the Brazilian Thoracic Association. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 47, n. 2, p. e20210054, 2021.

SINGH, P.; SAKET, V. K.; KACHHI, R. Diagnosis of TB: From conventional to modern molecular protocols. **Frontiers in Bioscience - Elite**, v. 11, n. 1, p. 38–60, 2019.

SINGH, V.; CHIBALE, K. Strategies to Combat Multi-Drug Resistance in Tuberculosis. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, n. 10, p. 2361–2376, 2021.

SINGPANOMCHAI, N. *et al.* Rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis based on allele-specific recombinase polymerase amplification and colorimetric detection. **PLoS ONE**, v. 16, n. 6 June 2021, p. 1–15, 2021.

SIU, G. K. H. *et al.* Direct detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 69, n. 1, p. 51–58, 2011.

SMITTIPAT, N. *et al.* Mutations in *rrs*, *rpsL* and *gidB* in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Thailand. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 4, p. 5–10, 2016.

SOLO, E. S. *et al.* Mutations in *rpoB* and *katG* genes and the *inhA* operon in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Zambia. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 302–307, 2020.

SOUNDARARAJAN, D. C. R. *et al.* Drug-resistant spinal tuberculosis – Current concepts, challenges, and controversies. **Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma**, v. 11, n. 5, p. 863–870, 2020.

SOUSA, G. J. B. *et al.* Spatiotemporal pattern of the incidence of tuberculosis and associated factors. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 25, p. 1–13, 2022.

STRYDOM, N. *et al.* Tuberculosis drugs' distribution and emergence of resistance in patient's lung lesions: A mechanistic model and tool for regimen and dose optimization. **PLoS Medicine**, v. 16, n. 4, p. 1–26, 2019.

SUÁREZ, I. *et al.* übersichtsarbeit Diagnostik und Therapie der Tuberkulose. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 116, n. 43, p. 729–735, 2019.

SUN, H. *et al.* Efflux pump Rv1258c activates novel functions of the oxidative stress and via the VII secretion system ESX-3-mediated iron metabolic pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and Infection**, v. 26, n. 1–2, p. 105239, 2024.

TAFESS, K. *et al.* Genetic mechanisms of co-emergence of INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains during the standard course of antituberculosis therapy. **Microbiology spectrum**, n. January, p. e0213323, 2024.

TAHAN, T. T.; GABARDO, B. M. A.; ROSSONI, A. M. O. Tuberculosis in childhood and adolescence: a view from different perspectives. **Jornal de Pediatria**, v. 96, p. 99–110, 2020.

TAJBAKHSI, A. *et al.* Investigation of the rpoB mutations causing Rifampin resistance by rapid screening in *Mycobacterium tuberculosis* in north-east of Iran. **Iranian Journal of Pathology**, v. 13, n. 4, p. 429–437, 2018.

TIBERI, S. *et al.* Drug resistant TB – latest developments in epidemiology, diagnostics and management. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 124, p. S20–S25, 2022.

TULU, B.; AMENI, G. Spoligotyping based genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia: A systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

ULLAH, I. *et al.* Detection of rifampicin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* using multiplex allele specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) in Pakistan. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 71, p. 42–46, 2019.

URBANOWSKI, M. E. *et al.* Cavitory Tuberculosis: The Gateway of Disease Transmission. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. e117–e128, 2020.

VADWAI, V.; SHETTY, A.; RODRIGUES, C. Multiplex allele specific PCR for rapid detection of extensively drug resistant tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 92, n. 3, p. 236–242, 2012.

VILCHÈZE, C.; KREMER, L. Acid-fast positive and acid-fast negative *Mycobacterium tuberculosis*: The Koch paradox. **Microbiol Spectrum**, v. 5, n. 2, p. 519–532, 2017.

VILCHÈZE, CATHERINE.; JACOBS JR, W. R. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. **Molecular genetics of Mycobacteria**, p. 431–453, 2014.

WANG, Y. *et al.* The roles of rpsL, rrs, and gidB mutations in predicting streptomycin-resistant drugs used on clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Hebei Province, China. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 12, n. 7, p. 2713–2721, 2019.

WÁNG, Y. X. J. *et al.* Radiological signs associated with pulmonary multi-drug resistant tuberculosis: An analysis of published evidences. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 8, n. 2, p. 161–173, 2018.

WETSCHEREK, M. T. A. *et al.* Active pulmonary tuberculosis: something old, something new, something borrowed, something blue. **Insights into Imaging**, v. 13, n. 1, 2022.

WOODMAN, M.; HAEUSLER, I. L.; GRANDJEAN, L. Tuberculosis genetic epidemiology: A latin american perspective. **Genes**, v. 10, n. 1, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2021**. Who Press. Geneva. 2021a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Catalogue of mutations in *Mycobacterium***

tuberculosis complex and their association with drug resistance. 2021b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2022.** Who Press. Geneva. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2023.** Who Press. Geneva. 2023.

WU, S. *et al.* Defining tuberculosis vulnerability based on an adapted social determinants of health framework: a narrative review. **Global Public Health**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2023.

WU, X. *et al.* Prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance by nucleotide MALDI-TOF-MS. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 121, p. 47–54, 2022.

XU, X. *et al.* Anti-tuberculosis drug development via targeting the cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. December, 2022.

ZAMPARELLI, S. S. *et al.* Clinical impact of COVID-19 on tuberculosis. **Infezioni in Medicina**, v. 30, n. 4, p. 495–500, 2022.

ZAREI, Z. *et al.* Molecular characterization of Isoniazid and Rifampicin target genes in multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from southwest of Iran. **Gene Reports**, v. 6, p. 19–25, 2017.

ZAW, M. T.; EMRAN, N. A.; LIN, Z. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 5, p. 605–610, 2018.

APÊNDICE A – TABELAS COMPARATIVAS ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES E A RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ANTI-TB

Comparação dos dados sociodemográficos e a resistência aos fármacos antituberculose em 24 casos de TB pulmonar, Fortaleza, Ceará-Brasil.

Variáveis	≤ 2 fármacos N (%)	≥ 3 fármacos N (%)	Total N (%)	p
Sexo				
Masculino	5	5	10	0,1432
Feminino	11	3	14	
Total	16	8	24	
Escolaridade (em anos de estudo)				
≤9 anos	15	7	22	0,602
10 a 13	1	1	2	
Total	16	8	24	
Ocupação				
Com renda	3	3	6	0,317
Sem renda	13	5	18	
Total	16	8	24	

Fonte: Elaborado pelo autor. p: teste Quiquadrado, o resultado foi considerado estatisticamente significante quando $p < 0,05$.

Comparação dos dados relativos à comorbidades, hábitos sociais e à resistência aos fármacos antituberculose em 24 casos de TB pulmonar, Fortaleza, Ceará-Brasil.

Variáveis	≤ 2 fármacos N (%)	≥ 3 fármacos N (%)	Total N (%)	p
Diabetes				
Sim	4	3	7	0,725
Não	4	2	6	
Total	8	5	13	
Etilismo				
Sim	5	4	9	0,949
Não	4	3	7	
Total	9	7	16	
Tabagismo				
Sim	6	3	9	0,519
Não	3	3	6	
Total	9	6	15	
Drogas ilícitas				
Sim	1	1	2	0,658
Não	6	3	9	
Total	7	4	11	

Fonte: Elaborado pelo autor. O resultado é considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

Análise das características clínicas comparando com a resistência aos fármacos antituberculose dos 24 participantes diagnosticados com TB pulmonar DR, Fortaleza, Ceará-Brasil.

Variáveis	≤ 2 fármacos N (%)	≥ 3 fármacos N (%)	Total N (%)	p
História de tratamento anterior				
Sim	6	4	10	0,5581
Não	10	4	14	
Total	16	8	24	
Contato intradomiciliar				
Sim	7	5	12	0,3864
Não	9	3	12	
Total	16	8	24	
Padrão da radiografia do tórax				
Unilateral	4	3	7	0,5536
Bilateral	3	1	4	
Total	7	4	11	
Presença de cavitação no raio-X				
Pequenas	3	1	4	0,7638
Grandes	6	3	9	
Total	9	4	13	
Baciloscopia				
Negativo ou 1 cruz	11	4	15	0,2631
≥ Duas cruces	4	4	8	
Total	15	8	23	

Fonte: Elaborado pelo autor. O resultado é considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

APÊNDICE B – PRODUÇÕES CIENTÍFICAS



Certificamos que o trabalho com o título:

ANÁLISE DAS MUTAÇÕES RELACIONADAS A RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS DE 1ª E 2ª LINHA NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR.

cujos autores SÃO: **Thiago Pinto Brasil, Caroliny Soares Silva, Thales Alves Campelo, Soraya de Oliveira Sancho, Cristiane Cunha Frota**, foi APRESENTADO na modalidade E-pôster, no **58º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (MEDTROP 2023)**, realizado no período de **10 a 13 de setembro de 2023**, no Centro de Convenções de Salvador na cidade de Salvador, Bahia.

Salvador/BA, 13 de setembro de 2023.

Para verificar a autenticidade deste certificado, basta acessar o link validacertificados.iveventos.com.br e usar o código: 14f479017e

CERTIFICADO



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Presidente do MEDTROP 2023



Dr. Julio Croda
Presidente da SBMT

Realização



SBMT
SOCIEDADE BRASILEIRA
DE MEDICINA TROPICAL

Reuniões Satélites:





Systematic Review

Molecular Role of HIV-1 Human Receptors (CCL5–CCR5 Axis) in neuroAIDS: A Systematic Review

Marcos Jessé Abrahão Silva ^{1,†}, Rebecca Lobato Marinho ^{2,†}, Yan Corrêa Rodrigues ^{2,*}, Thiago Pinto Brasil ³, Pablo Antony Silva Dos Santos ², Caroliny Soares Silva ², Daniele Melo Sardinha ², Karla Valéria Batista Lima ⁴ and Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima ⁴

¹ Postgraduate Program in Parasite Biology in the Amazon (PPGBPA), Evandro Chagas Institute (IEC), Ananindeua 67030-000, PA, Brazil; jesseabrahao10@gmail.com

² Institute of Biological and Health Sciences (ICB), University of Pará State (UEPA), Belém 66087-670, PA, Brazil; rebeccamarinho28@gmail.com (R.L.M.); antonypablo@gmail.com (P.A.S.D.S.); karolinysoares2303@gmail.com (C.S.S.); danielle-vianna20@hotmail.com (D.M.S.);

³ Faculty of Medicine, Federal University of Ceará (UFCE), Fortaleza 60441-750, CE, Brazil; theutlys@gmail.com

⁴ Bacteriology and Mycology Section (SABMI), Evandro Chagas Institute (IEC),

Ananindeua 67030-000, PA, Brazil; karlalima@iec.gov.br (K.V.B.L.); luanalima@iec.gov.br (L.N.G.C.L.)

* Correspondence: yan.13@hotmail.com

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Chronic HIV-1 infection can cause neurological illness, also known as HIV-associated neurocognitive disorders (HAND). The elevated level of pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as C–C Chemokine Ligand 5 (CCL5/RANTES), is one of the ways of causing HIV-1-mediated neuroinflammation. C–C Chemokine Receptor 5 (CCR5) is the main coreceptor for viral entry into host cells and for mediating induction of CCL5/RANTES. CCR5 and CCL5 are part of a correlated axis of immune pathways used for effective protection against the HIV-1 virus. The purpose of this paper was to review the literary knowledge about the immunopathological relationship between this immune complex and neuroAIDS. A systematic review of the literature was conducted based on the selection and search of articles, available in English, Spanish, or Portuguese in the time frame of 1990–2022, of primary and secondary types in the PUBMED, Science Direct, SciELO, and LILACS databases through descriptors (MeSH) together with “AND”: “CCR5”; “CCL5”; “neurological manifestations”; or “HIV”. The methodological quality of the articles was assessed using the JBI Checklists and the PRISMA 2020 writing guidelines were followed. A total of 36 articles were included in the final composition of the review. The main cells of the CNS affected by neuroAIDS are: neurons; microglia; astrocytes; and oligodendrocytes. Molecular devices and their associations with cellular injuries have been described from the entry of the virus into the host’s CNS cell to the generation of mental disorders. Furthermore, divergent results were found about the levels of CCL5/RANTES secretion and the generation of immunopathogenesis, while all condensed research for CCR5 indicated that elevation of this receptor causes more neurodegenerative manifestations. Therefore, new therapeutic and interventional strategies can be conditioned on the immunological direction proposed in this review for the disease.

Keywords: HIV; neurological manifestations; CCR5; CCL5; immunity



Citation: Silva, M.J.A.; Marinho, R.L.; Rodrigues, Y.C.; Brasil, T.P.; Dos Santos, P.A.S.; Silva, C.S.; Sardinha, D.M.; Lima, K.V.B.; Lima, L.N.G.C. Molecular Role of HIV-1 Human Receptors (CCL5–CCR5 Axis) in neuroAIDS: A Systematic Review. *Microorganisms* **2024**, *12*, 782. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040782>

Academic Editor: Stefano Aquaro

Received: 20 February 2024

Revised: 1 March 2024

Accepted: 14 March 2024

Published: 12 April 2024



ANEXOS

ANEXO A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE ESCLARECIMENTO E CONSENTIMENTO LIVRE PARA ENTREVISTA DOS PARTICIPANTES

Estudo da “Dinâmica da transmissão da TB multirresistente e sensível e avaliação da susceptibilidade ao *Mycobacterium tuberculosis* em serviço de referência no Estado do Ceará.”

Hospital de Messejana Dr. Carlos Alberto Studart (HM) Hospital Geral Dr. Cesar Cals (HGCC)
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará

Registro

Laboratório:/.....

Termo de Esclarecimento

Você está sendo convidado a participar do estudo “Dinâmica da transmissão da tuberculose multirresistente e sensível e avaliação da susceptibilidade ao *Mycobacterium tuberculosis* em serviço de referência no Estado do Ceará.”. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. Os objetivos deste estudo são: estudar a transmissão da tuberculose sensível e resistente, relacionando com fatores genéticos do indivíduo e do ambiente. Caso você participe, será necessária coleta *de 5 ml de sangue, resposta de perguntas relacionadas a tuberculose e coleta de escarro*. Você poderá ter o desconforto quando receber a picada para colher o sangue do seu antebraço. Este sangue coletado somente será utilizado neste projeto de pesquisa.

Serão realizados exames de tipagem genética a partir da cultura da bactéria, teste de sensibilidade às drogas anti-tuberculose e estudo do polimorfismo de genes de citocinas da resposta imune.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer tipo de pagamento, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias à realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento no estudo, pois você será identificado com um número (registro do laboratório). Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os

investigadores são: Dr^a *Cristiane Cunha Frota* que pode ser encontrada no endereço *Divisão de Microbiologia Médica, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado, S/N. Rodolfo Teófilo, Fortaleza. Telefone (085) 3366-8303, Dr^a Elizabeth Clara Barroso, médica pneumologista do Hospital de Messejana, telefone (085) 3274-1599 e Dr^a Roberta dos Santos Silva Luiz, médica infectologista do Hospital Universitário Walter Cantídio-UFC, telefone (085)3366-8000. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Messejana; telefone (085) 3101-4162.*

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li e/ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Dinâmica da transmissão da tuberculose multirresistente e sensível e avaliação da susceptibilidade ao *Mycobacterium tuberculosis* em serviço de referência no Estado do Ceará”.

Eu,....., li e/ou ouvi o esclarecimento acima e ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e entendo que sou livre para interromper meu consentimento a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

.....Assinatura do paciente

Data ____/____/____

..... Assinatura do representante legal

Data ____/____/____

.....Assinatura da testemunha*

Data ____/____/____

*para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----Assinatura do responsável
pelo estudo.

Data____/____/____

Termo de Esclarecimento

Você está sendo convidado a participar do estudo de *Mycobacterium tuberculosis* Multidrogra (MDR) e Extensivamente Resistente (TB-XDR) em pacientes com história de tratamento anterior em serviço de referência no Estado do Ceará”. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é: Determinar e compreender as variáveis da frequência de TB XDR e TB MDR relacionadas ao ambiente domiciliar e da comunidade, frente às características genéticas do hospedeiro e do bacilo, visando melhorar as metodologias empregadas no controle e prevenção da TB resistente. Caso você participe, será necessário a coleta de escarro e respostas de perguntas relacionadas a TB. Serão realizados exames de tipagem genética a partir da cultura da bactéria e teste de sensibilidade às drogas anti-tuberculoese.

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer tipo de pagamento, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias à realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento no estudo, pois você será identificado com um número (registro do laboratório). Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os investigadores são: Dr^a *Cristiane Cunha Frota* que pode ser encontrada no endereço *Divisão de Microbiologia Médica, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado, S/N. Rodolfo Teófilo, Fortaleza. Telefone (085) 3366-8303*. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Messejana; telefone (085) 3101-4162.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li e/ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “*Mycobacterium tuberculosis* Multidrogra (MDR) e Extensivamente Resistente (TB-XDR) em pacientes com história de tratamento anterior em serviço de referência no Estado do Ceará.”.

Eu,....., li e/ou ouvi o esclarecimento acima e ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e entendo que sou livre para interromper meu consentimento a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

----- Assinatura do paciente

Data ____/____/____

----- Assinatura do representante legal

Data ____/____/____

----- Assinatura da testemunha

ANEXO B. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – via Plataforma Brasil

FOLHA DE ROSTO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP
FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
(versão outubro/99)

Para preencher o documento, use as indicações da página 2.

1. Projeto de Pesquisa: Dinâmica da transmissão da tuberculose multirresistente e sensível e avaliação da susceptibilidade ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em serviço de referência no Estado do Ceará.			
2. Área do Conhecimento (Ver relação no verso) Ciências Biológicas		3. Código: 2.12	4. Nível: (Só áreas do conhecimento 4)
5. Área(s) Temática(s) Especial(is) (Ver fluxograma no verso) Genética Humana		6. Código(s): I.1	7. Fase: (Só área temática 3) I () II () III () IV ()
8. Unitermos: (3 opções) Tuberculose, multirresistência, transmissão			
SUJEITOS DA PESQUISA			
9. Número de sujeitos no Centro: Total: ~ 300		10. Grupos Especiais: <18 anos () Portador de Deficiência Mental () Embrião /Feto () Relação de Dependência (Estudantes, Militares, Presidiários, etc.) () Outros () Não se aplica (X)	
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
11. Nome: Cristiane Cunha Frota			
12. Identidade: 1551852-88	13. CPF: 391429573-20	19. Endereço (Rua, n.º): Rua 30 de Junho, 35 casa 14. Edson Queiroz	
14. Nacionalidade: Brasileira	15. Profissão: Farmacêutica-Bioquímica	20. CEP: 60834-260	21. Cidade: Fortaleza
16. Maior Titulação: PhD	17. Cargo: Professora Adjunta II	23. Fone: 85 3273-2962	24. Fax: 85 3366-8316
18. Instituição a que pertence: Universidade Federal do Ceará		25. Email: ccfrota@fortalnet.com.br	
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Data: ____ / ____ / ____ Assinatura _____			
INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO			
26. Nome: Hospital de Messejana		29. Endereço (Rua, n.º): Av. Frei Cirilo, 3480. Messejana	
27. Unidade/Orgão: Ambulatório de Tisiologia		30. CEP: 60864-190	31. Cidade: Fortaleza
28. Participação Estrangeira: Sim () Não (X)		33. Fone: (85) 3274-1599	34. Fax:
35. Projeto Multicêntrico: Sim (X) Não () Nacional (X) Internacional () (Anexar a lista de todos os Centros Participantes no Brasil)			
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução Nome: _____ Cargo _____ Data: ____ / ____ / ____ Assinatura _____			
PATROCINADOR Não se aplica ()			
36. Nome: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico		39. Endereço: SEPN 509, Bloco A, Ed. Nazir	
37. Responsável: Sofia Daher		40. CEP: 70750-901	41. Cidade: Brasília
38. Cargo/Função: Coordenadora Geral do Programa de Pesquisa em Saúde		43. Fone: (61) 2108-9761	44. Fax: (61) 2108-9875
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP			

45. Data de Entrada:	46. Registro no CEP:	47. Conclusão: Aprovado (x)	48. Não Aprovado ()
04 / 07 / 2005	238 / 05	Data: ____ / ____ / ____	Data: ____ / ____ / ____
49. Relatório(s) do Pesquisador responsável previsto(s) para:			
Encaminho a CONEP: 50. Os dados acima para registro (x) 51. O projeto para apreciação () 52. Data: ____ / ____ / ____		Data: ____ / ____ / ____ 53. Coordenador/Nome _____ Assinatura	Data: ____ / ____ / ____ Anexar o parecer consubstanciado
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA – CONEP			
54. Nº Expediente:	56. Data Recebimento:	57. Registro na CONEP: 238 / 05	
55. Processo:			
58. Observações:			

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MULTIDROGA E EXTENSIVAMENTE RESISTENTE EM UNIDADE DE REFERENCIA

Pesquisador: THALES ALVES CAMPELO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 62835016.1.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.956.894

Justificativa de Ausência	tolc_.pdf	07/10/2016 11:01:25	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	Carta_de_apreciacao.jpg	31/10/2016 15:37:53	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_concordancia.jpg	31/10/2016 15:19:02	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Orçamento	Orçamento.pdf	30/10/2016 14:43:30	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	21/10/2016 16:04:38	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	Questionario.pdf	18/10/2016 10:48:06	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	Termo_de_Fiel_Depositario.pdf	16/10/2016 10:04:30	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	Termo_de_Anuencia_Ambulatorio_de_Tisiologia.pdf	16/10/2016 09:58:45	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	confirmacao_do_cadastro_na_pesquisa_clinica.pdf	16/10/2016 09:54:31	THALES ALVES CAMPELO	Aceito
Outros	termo_de_anuencia_laboratorio_de_analise_clinicas.pdf	16/10/2016 09:40:46	THALES ALVES CAMPELO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 09 de Março de 2017

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)