

Daniela Ferreira de Almeida

Tuberculose Multirresistente: A descoberta de novos fármacos

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2014

Daniela Ferreira de Almeida

Tuberculose Multirresistente: A descoberta de novos fármacos

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2014

Daniela Ferreira de Almeida

Tuberculose Multirresistente: A descoberta de novos fármacos

Assinatura da aluna

“Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.”

Resumo

A tuberculose multirresistente, caracterizada pela resistência à isoniazida e à rifampicina, tem sido um desafio para os programas de controlo, visto que o tratamento é bastante complexo, muito dispendioso e normalmente com um sucesso diminuído.

A nível nacional, a tuberculose multirresistente tem diminuído gradualmente na última década, não deixando de apresentar uma das taxas de mortalidade mais acentuadas da Europa.

A prevenção desta doença é de elevada importância. Para isso as estruturas de saúde têm que estar preparadas para adotar algumas medidas como recursos humanos e laboratórios especializados e também a nível financeiro, pois a tuberculose multirresistente afeta em grande escala os países com dificuldades socioeconómicas elevadas (principalmente o Continente Africano).

Atualmente, existem vários estudos de novos fármacos e novos locais alvo desenvolvendo assim novas moléculas. Os novos fármacos apresentam resultados positivos, pois são testados em locais que ainda não foram explorados por outros fármacos, tendo sempre cuidado para não surgir novas resistências.

Palavras-chave: Tuberculose Multirresistente; *Mycobacterium tuberculosis*; Bacilo de Koch; Isoniazida; Rifampicina

Abstract

Multiresistant tuberculosis, is characterized by resistance to isoniazid and rifampicin, has been a challenge for control programs, since the treatment is very complex, very expensive and usually with a reduced success.

At a national level, multiresistant tuberculosis has gradually declined over the past decade, without forgetting that has one of the highest taxes risks of mortality in Europe.

The prevention of this disease is of great importance. For that, health facilities must be prepared to adopt some measures such as human resources, specialized laboratories and also at financially level, because multiresistant tuberculosis in a large scale affects countries with high socio-economic difficulties (mainly African continent).

Currently, there are several studies of new drugs and new target sites developing new molecules. The new drugs showed positive results, because they are tested in places that have not been explored by other drugs, always taking care for not having new resistances.

Keywords: Multiresistant tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; Bacillus Koch; Isoniazid; Rifampicin

Agradecimentos

À Professora Doutora Cristina Pina e à Professora Doutora Inês Lopes Cardoso, pela orientação, por estar sempre disponível a ajudar, esclarecer qualquer dúvida, pela compreensão, pela simpatia dispensada desde o início, pelo interesse e principalmente pelos conhecimentos adquiridos.

Aos meus Pais, Alice e Rui por me apoiarem incondicionalmente em todos os momentos bons e menos bons. Muito Obrigada pelo amor, alegria, pela amizade, pela ajuda na superação de obstáculos que ao longo da caminhada foram surgindo, mas principalmente por me proporcionarem o sonho que sempre quis realizar e sem eles nada disto seria possível!

À minha Avó, Madrinha, Primo e Tio, agradeço o tempo, incentivo e sorriso que me dedicaram ao longo do meu percurso académico e da minha vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que me oferecem constantemente.

Às minhas amigas, Carolina Stamm, Filipa Fonseca, Mariana Carvalho, Ana Rita Bandeira, Hugo Lourenço, Frederico Moreira e Nuno Pimentel por todo o companheirismo, força, apoio e ajuda, fatores bastante importantes na realização da dissertação e que me permitiram que cada dia fosse encarado com motivação mesmo nas alturas de desânimo.

Ao André, um agradecimento especial pelo apoio e carinho diário, pelas palavras doces e pela transmissão de confiança e força em todos os momentos!

Muito obrigada por fazerem parte da minha vida!

Índice

I.	INTRODUÇÃO.....	1
II.	MORFOLOGIA E FISIOLOGIA DO PULMÃO	3
III.	DADOS EPIDEMIOLOGICOS.....	5
IV.	<i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	9
1.	Caracterização microbiana	9
2.	Espécies de <i>Mycobacterium sp</i>	11
V.	TUBERCULOSE.....	14
1.	Definição da Tuberculose	14
2.	Contágio	14
3.	Infeção	14
4.	Evolução da doença.....	15
5.	Tipos existentes da Tuberculose	16
6.	Vias de transmissão de <i>M. tuberculosis</i>	17
7.	Patogénese	18
VI.	TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE.....	20
1.	Definição.....	20
VII.	PREVENÇÃO	22
1.	DOTS (“Directly Observed Treatment Short-course“).....	23

VIII. FATORES DE RISCO	25
IX. DIAGNÓSTICO	29
1. Observação microscópica	29
2. Cultura	30
3. Sistemas automáticos e semiautomáticos	31
4. Novos métodos de diagnóstico	31
X. TRATAMENTO	33
1. Antibióticos de primeira linha	35
i. Isoniazida	35
ii. Rifampicina.....	36
iii. Pirazinamida.....	37
iv. Etambutol.....	39
2. Antibióticos de segunda linha	39
i. Ácido para-aminossalicílico (PAS).....	40
ii. Etionamida	41
iii. Capreomicina.....	42
iv. Aminoglicosídeos	43
v. Fluoroquinolonas.....	44
XI. NOVOS FÁRMACOS	46
1. Bedaquilina TMC207 (ou R207910)	46

2. Nitroimidazóis.....	46
3. SQ-109	47
4. Oxazolidinonas	47
XII. CONCLUSÃO.....	48
XIII. BIBLIOGRAFIA	49

Índice de Figuras

Figura 1 – Anatomia dos Pulmões (Adaptado de Seeley <i>et al.</i> , 2001).....	3
Figura 2 – Incidência TB estimada por 100 mil pessoas em 2008 (WHO, 2009).....	5
Figura 3 - Incidência de casos novos de TB notificados por 100 mil pessoas: distribuição geográfica e evolução desde há 10 anos. Distritos com alta incidência > 50/100 mil a encarnado, incidência intermédia (> 20 <50/100 mil) a laranja e distritos com baixa incidência (<20/100 mil) a amarelo (Ministério da Saúde, 2010)	6
Figura 4 – Número de casos incidentes de TBMR por ano (multirresistência a fármacos de 1ª linha (vermelho) e a TB-XDR (azuis) (Ministério da Saúde, 2013)	7
Figura 5 – Número de casos prevalente de TBMR em dezembro de 2012 por distrito (Ministério da Saúde, 2013)	7
Figura 6 – <i>Mbt</i> observado por uma microscopia eletrónica (Todar's Online Text Book of Bacteriology, 2012).....	9
Figura 7 – Coloração de Ziehl-Neelsen indicando o <i>Mbt</i> (Huggett <i>et al.</i> , 2003).....	10
Figura 8 – Síntese dos ácidos micólicos (Cantaloube <i>et al.</i> , 2011).....	13
Figura 9 – Infecção pelo <i>Mbt</i> (Adaptado de Knechel, 2009).....	15
Figura 10 - Transmissão de TBMR. Os pontos no ar representam núcleos de gotículas contendo bacilos da TB (adaptado de CDC, 2013)	18
Figura 11 – Visualização do <i>Mbt</i> através da técnica de coloração auramina-rodamina (Zhang <i>et al.</i> , 1998)	30
Figura 12 – Mecanismo de ação da pirazinamida (Adaptado de Lima <i>et al.</i> , 2011).....	38
Figura 13 – Via metabólica do ácido fólico (Mathys <i>et al.</i> , 2009).....	40
Figura 14 – Mecanismo de ação da etionamida (Lemke, 2002).....	42

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação das espécies micobacterianas quanto à sua patogenicidade para o Homem (Adaptado de Ferreira e Sousa, 2000)	12
Tabela 2 – TBMR primária e secundária (adaptado de CDC, 2013).....	21
Tabela 3 - Características de um paciente com a doença e a sua associação com a infecciosidade (Adaptado de CDC, 2013).....	27
Tabela 4 – Transmissão do bacilo de Koch através de fatores ambientais (Adaptado de CDC, 2013).....	27
Tabela 5 - Fatores de exposição que podem afetar a transmissão de <i>Mbt</i> (Adaptado de CDC, 2013).....	28
Tabela 6 – Esquema de tratamento habitual da TB (Adaptado de Duarte <i>et al.</i> , 2010a)	33

Abreviaturas

AMTD – Teste amplificado direto

ATP – adenosina trifosfato

B.A.A.R – Bacilo álcool-ácido resistente

DNA – ácido desoxirribonucleico

DOTS – Tratamento diretamente observado de curta duração

EUA – Estados Unidos da América

FAS-I – Enzimas eucarióticas tipo I

FAS-II – Enzimas procarióticas de condensação tipo II

FDA – Agência americana do medicamento

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IFN- γ – Interferão gama

IL - Interleucina

Mbt – *Mycobacterium tuberculosis*

MIC – Concentração inibitória mínima

NAAT – Técnicas de amplificação do ácido nucleico

NK – células exterminadoras naturais

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAS – Ácido para-aminossalicílico

PCR – Reação da cadeia em polimerase

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

TB - Tuberculose

TBMR – Tuberculose Multirresistente

TB-XDR – Tuberculose extensivamente resistente

tRNA – ácido ribonucleico de transferência

TSA – Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

I. INTRODUÇÃO

A tuberculose multirresistente (TBMR) é denominada por ser uma doença crónica pulmonar, de transmissão por via aérea, e tem como responsável o agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis* ou também chamado como Bacilo de Koch. Alguns bacilos sofrem mutações espontâneas e como consequência adquirem resistências a certos medicamentos (Ormerod, 2005).

Esta doença é caracterizada pela resistência a dois princípios ativos: a isoniazida e a rifampicina (em simultâneo). Contudo, levará mais tempo a ser curada pois necessita de fármacos de segunda linha, sendo estes mais dispendiosos e com um número elevado de efeitos adversos (Jain e Dixit, 2008).

Pode contrair-se a TBMR através de erros no tratamento proposto, quando os fármacos são mal prescritos ou as tomas não são devidamente cumpridas, fazendo com que os bacilos se tornem resistentes. É uma doença contagiosa que se pode propagar espirrando, tossindo e também falando, visto que são expelidas partículas com o bacilo para o ar envolvente (Hannan *et al.*, 2001).

Os doentes com tuberculose multirresistente adquirem maior insucesso terapêutico. Contudo, quando é realizado um diagnóstico da TBMR precoce e um tratamento adequado, o seu prognóstico e o controlo da doença são melhorados (Van Zeller *et al.*, 2012). Os fatores de risco para a multirresistência abrangem o retratamento, a atividade profissional em unidades de saúde, a toxicodependência, infeção pelo vírus VIH (vírus de imunodeficiência humana), contacto com doentes infetados com a tuberculose multirresistente e também a imigração e reclusão de países com elevados níveis de prevalência de tuberculose (Souza *et al.*, 2006).

Relativamente aos sintomas da TBMR, a expetoração com sangue num período de tempo superior a duas semanas é um dos sinais mais comuns. Pode também ser característicos sinais de febre, cansaço e fraqueza muscular, suores e arrepios noturnos, dificuldades em respirar, dores no peito e também em alguns casos perdas de peso.

Com a resistência a fármacos antibacilares, a TBMR tornou-se um desafio para a saúde pública global, assim como para a sua cura e controlo da epidemia (Loddenkemper *et al.*, 2002). A resistência à terapêutica (efetuada apenas com um fármaco) levou à

descoberta da poliquimioterapia que permanece a base fundamental para o tratamento desta doença.

O tratamento da TBMR é muito complexo, com algum insucesso e mais caro que as outras estirpes mais sensíveis (Aziz *et al.*, 2006). Terá que ser efetuado num centro especializado, onde o doente irá ser proposto a um regime terapêutico bem estruturado e um pouco agressivo, com o recurso a fármacos antibacilares de segunda linha. Esta terapêutica será realizada em regime de internamento do doente para que se possa minimizar os efeitos adversos e para ocorrer a aferição da terapia proposta. Se a doença for localizada pode-se colocar em hipótese a cirurgia (Iseman, 1993).

Esta dissertação tem como objetivo uma pesquisa bibliográfica atual sobre o estudo detalhado da tuberculose multirresistente, a compreensão de como é que a tuberculose multirresistente se dissemina e o porquê de ser um problema para a saúde pública global e a descoberta de novos fármacos para a tuberculose multirresistente e a sua necessidade terapêutica.

II. MORFOLOGIA E FISIOLOGIA DO PULMÃO

Os pulmões são os principais órgãos da respiração e são os maiores do organismo quando se fala em volume. Cada pulmão tem uma forma cônica com a base apoiada no diafragma e o vértice estende-se, superiormente, aproximadamente 2,5 cm acima da clavícula. O pulmão direito é maior que o esquerdo e pesa uma média de 620 gramas enquanto que o esquerdo pesa 560 gramas (Seeley *et al.*, 2001).

O pulmão direito tem três lobos e o esquerdo tem dois (Figura 1). Os lobos são separados por cissuras profundas, vincadas na superfície do pulmão. Cada lobo divide-se em lóbulos separados, uns dos outros, por septos de tecido conjuntivo que não são visíveis à superfície, como as cissuras. Como os maiores vasos e os brônquios não atravessam os septos de tecido conjuntivo, os lóbulos lesados podem ser removidos cirurgicamente, ficando o pulmão restante praticamente intacto. Existem nove lóbulos no pulmão esquerdo e dez no pulmão direito (Seeley *et al.*, 2001).

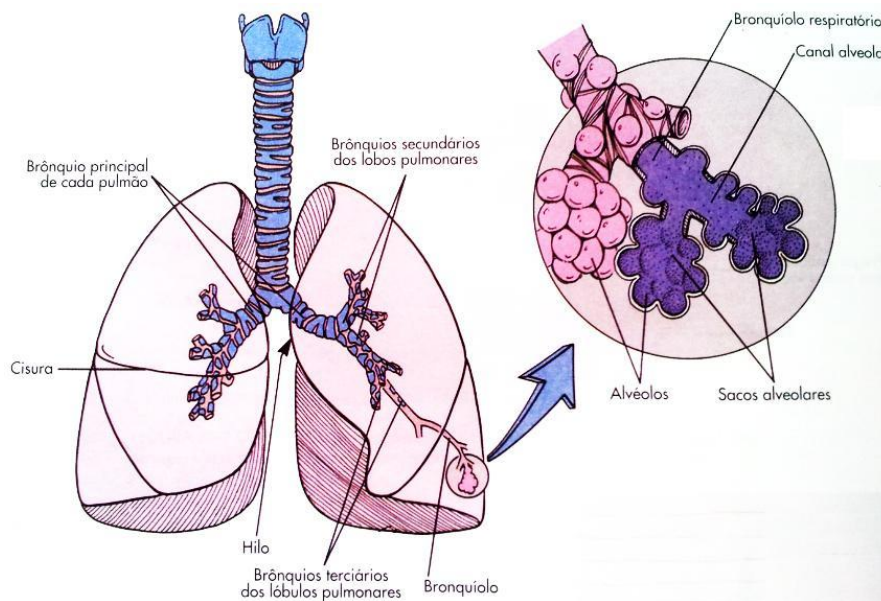


Figura 1 – Anatomia dos Pulmões (Adaptado de Seeley *et al.*, 2001)

Os brônquios principais dividem-se em brônquios secundários (ou lobares), à medida que entram nos pulmões respetivos. O local de entrada dos brônquios, dos vasos e dos nervos em cada pulmão é o hilo, ou a raiz do pulmão. Os brônquios secundários, dois no pulmão esquerdo e três no direito, vão conduzir o ar a cada lobo. Por sua vez, os brônquios secundários dão origem aos brônquios terciários (ou segmentares), que se

estendem até aos lóbulos. A árvore brônquica continua a subdividir-se, dando finalmente origem aos bronquíolos. Estes também se subdividem diversas vezes, dando origem aos bronquíolos terminais, que ainda se subdividem em bronquíolos respiratórios. Cada bronquíolo respiratório divide-se para formar canais alveolares que terminam em cachos de sacos de ar, os alvéolos (sacos ocos). Um saco alveolar é composto por dois ou mais alvéolos que partilham uma abertura comum (Seeley *et al.*, 2001).

Os brônquios são revestidos por um epitélio cilíndrico pseudostratificado ciliado. À exceção dos brônquios principais, os restantes são suportados por muitas cartilagens de pequenas dimensões embutidas nas paredes em vez de anéis em forma de “C”. Ao longo da árvore respiratória as cartilagens tornam-se mais escassas e a quantidade de músculo liso vai aumentando (Seeley *et al.*, 2001).

Os bronquíolos são tubos muito pequenos, com 1mm ou menos de diâmetro, revestidos por epitélio simples cilíndrico ciliado. À medida que o diâmetro dos bronquíolos diminui, o epitélio passa a ser cuboide simples ciliado; nos bronquíolos de menos dimensões é epitélio de descamação. Como as paredes dos bronquíolos têm músculo liso e não têm cartilagem podem-se contrair violentamente, ocorrendo durante um ataque de asma (Seeley *et al.*, 2001).

As paredes dos bronquíolos respiratórios, os canais alveolares e os alvéolos são constituídos por epitélio simples de descamação fino, através do qual os gases se difundem. Os canais alveolares têm células de músculo liso dispersas, mas os alvéolos não. O epitélio existente na parede dos alvéolos é suportado pelo tecido conjuntivo elástico envolvente e é constituído por células secretoras, na superfície do epitélio alveolar existem macrófagos (Seeley *et al.*, 2001).

Os pulmões são muito elásticos e, quando insuflados, têm a capacidade de expelir o ar voltando ao seu estado primitivo, desinsuflados. Contudo, mesmo quando não estão insuflados, os pulmões retêm algum ar, que lhes dá uma consistência esponjosa (Seeley *et al.*, 2001).

III. DADOS EPIDEMIOLOGICOS

A tuberculose (TB) é a nível global um problema com bastante gravidade, sendo uma das maiores causas de morte, a seguir ao HIV. A OMS constatou que em 2011 existiram nove milhões de novos casos de tuberculose no mundo, em que 1,4 milhões morreram por tuberculose e destes, 430.000 mortes foram indivíduos com HIV (seropositivos) (Antunes, 2011).

A nível mundial, a tuberculose tem uma incidência bastante elevada principalmente no continente Africano e Asiático, sendo menos prevalente na América do Norte e na Oceânia como se pode verificar na Figura 2 (WHO, 2009).

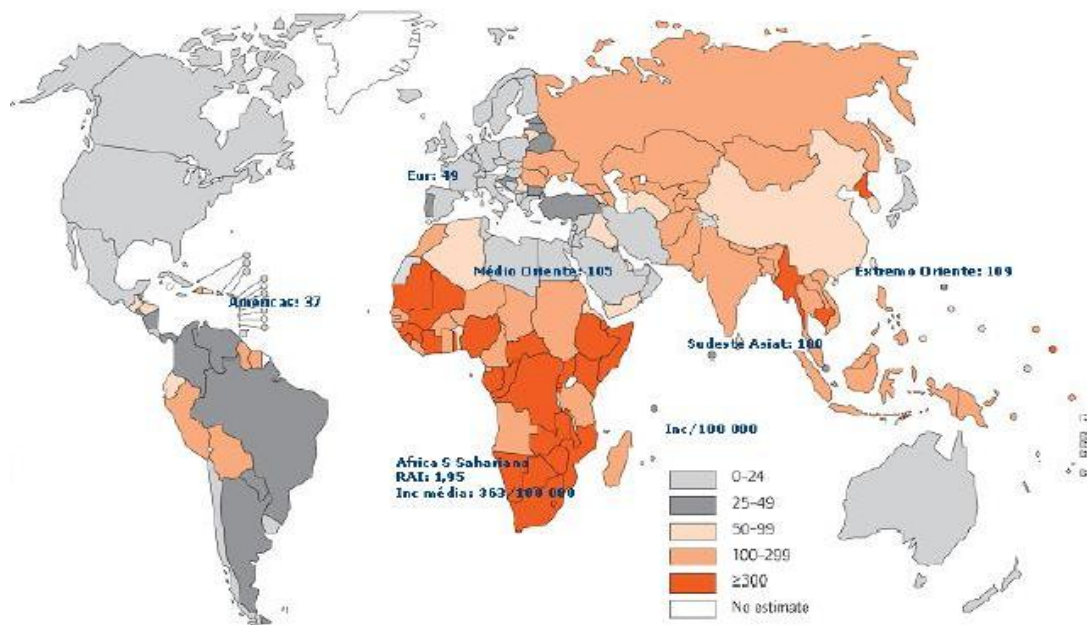


Figura 2 – Incidência TB estimada por 100 mil pessoas em 2008 (WHO, 2009)

A nível nacional, nos últimos anos, tem vindo a verificar-se um desaparecimento das regiões de alta incidência (≥ 50 casos/100 000 habitantes). Porto, Lisboa e Setúbal demonstram uma incidência intermédia de tuberculose (> 20 casos/100 000 e < 50 casos/100 000 habitantes), visível na Figura 3 (Ministério da Saúde, 2010).

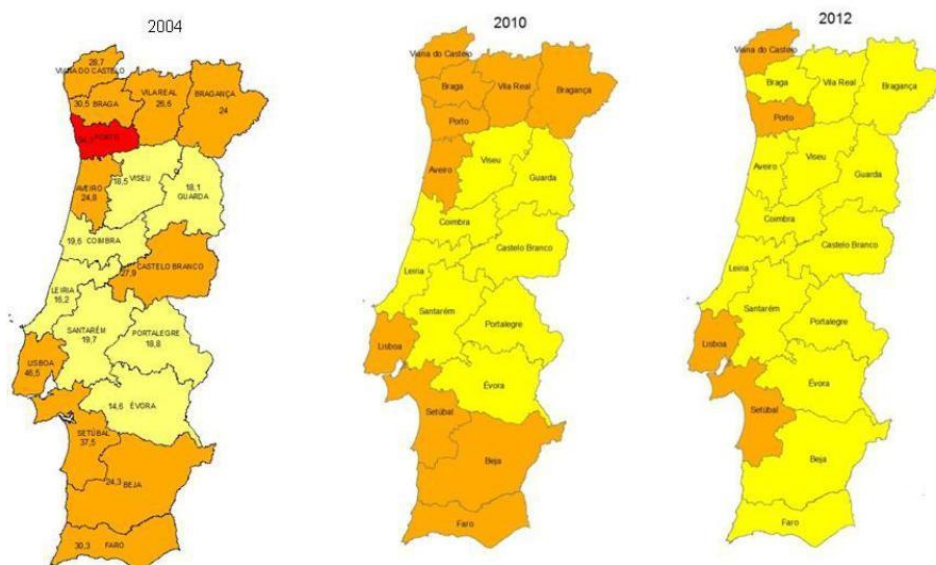


Figura 3 - Incidência de casos novos de TB notificados por 100 mil pessoas: distribuição geográfica e evolução desde há 10 anos. Distritos com alta incidência > 50/100 mil a encarnado, incidência intermédia (> 20 <50/100 mil) a laranja e distritos com baixa incidência (<20/100 mil) a amarelo (Ministério da Saúde, 2010)

Contudo, a nível mundial, o número de casos de TBMR tem vindo a aumentar nos últimos anos. Todos os doentes com cultura positiva devem fazer um teste de suscetibilidade a fármacos de primeira linha e no caso dos pacientes com TBMR devem fazer estes testes a fármacos de segunda linha (Gomes, 2002).

Em 2011, 84,25% dos casos com culturas positivas realizaram testes de suscetibilidade a fármacos de primeira linha. Foi observado resistências à isoniazida em 7,96%, à rifampicina em 2,2%, ao etambutol em 1,66% e à estreptomicina em 11,7% dos casos testados. A TBMR e a tuberculose extremamente resistente (TBXDR) são formas de tuberculose potencialmente intratáveis (Ministério da Saúde, 2013).

Contrariamente, em Portugal, o número de novos casos de TBMR tem vindo a diminuir (Figura 4) visto que em dezembro de 2012, a incidência de TBMR era de 14 casos, 20% dos quais com critérios de TB-XDR, representando 0,56% dos casos de tuberculose em 2012 (traduzindo assim uma diminuição significativa relativamente aos anos anteriores). É notável que a proporção é inferior à média na União Europeia e encontra-se praticamente circunscrita às áreas metropolitanas do Porto e de Lisboa (cerca de 65% são residentes na área de Lisboa e Vale do Tejo) (Ministério da Saúde, 2013).

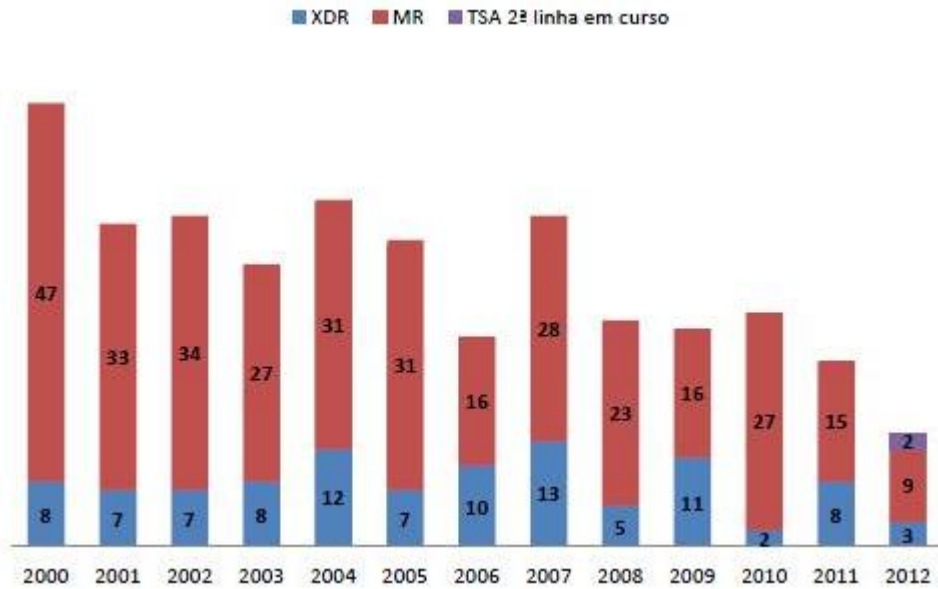


Figura 4 – Número de casos incidentes de TBMR por ano (multirresistência a fármacos de 1ª linha (vermelho) e a TB-XDR (azuis) (Ministério da Saúde, 2013)

A TBMR, presença constante nas grandes áreas de Lisboa e Porto, revela-se endémica, mas no entanto o nível de multirresistência não é elevado, sendo predominante em adultos e crianças (Figura 5).

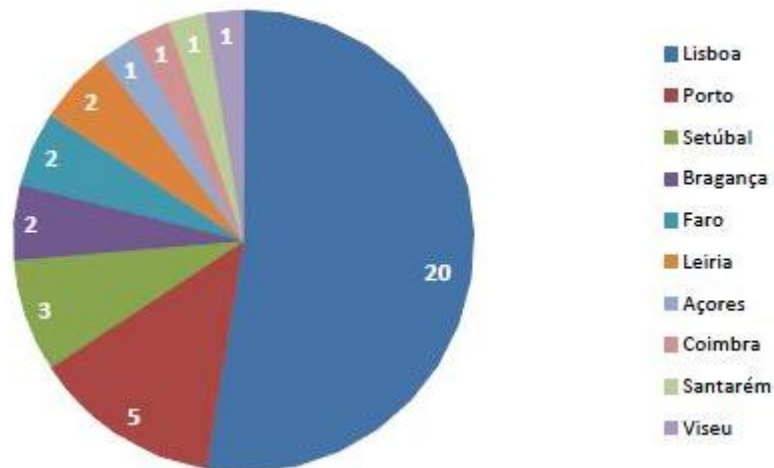


Figura 5 – Número de casos prevalente de TBMR em dezembro de 2012 por distrito (Ministério da Saúde, 2013)

De acordo com os 38 casos de TBMR, de Dezembro do ano 2012, 12 deles ou seja, 31,6% correspondiam a cidadãos estrangeiros, sendo que a distribuição por sexo, mostrava uma maioria de 30 casos (78,9%), correspondentes ao sexo masculino (Ministério da Saúde, 2013).

IV. *Mycobacterium tuberculosis*

1. Caracterização microbiana

O *Mycobacterium tuberculosis* (*Mbt*) é um bacilo (estrutura bacilar ou cocobacilar) reto ou ligeiramente curvo (Figura 6), imóvel, não esporulado, não contém capsula e mede de 1 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura. O bacilo de Koch, descoberto em 1882 pelo alemão Heinrich Robert Koch (1843-1910), apresenta um elevado teor lipídico na parede celular, sendo indicativo de importantes efeitos biológicos (como por exemplo a formação do granuloma) (Ferreira e Sousa, 2000).

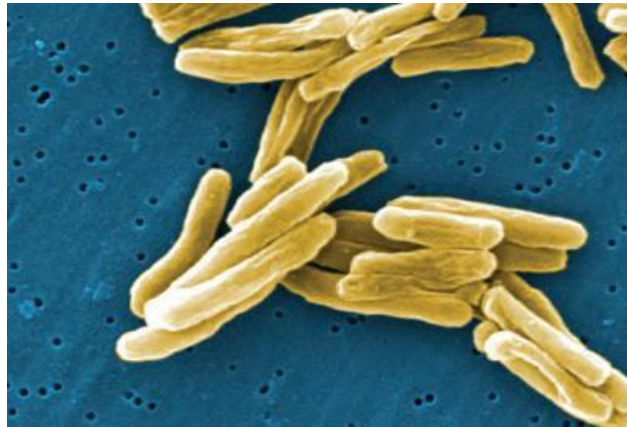


Figura 6 – *Mbt* observado por uma microscopia eletrônica (Todar's Online Text Book of Bacteriology, 2012)

Este bacilo tem uma camada de cera na sua superfície celular (constituída principalmente por ácidos micólicos), formando uma barreira hidrofóbica que torna a célula impermeável à coloração de gram, a diversos agentes químicos e antibióticos hidrófilos, podendo, assim, considerar-se um bactéria álcool-acido resistente. Pode torna-se também útil para o desenvolvimento de vacinas e de novos fármacos para o combate da doença (Jankute *et al.*, 2012).

Quando corada a quente com fucsina indicada de Ziehl ou a frio com auramina, retém os corantes depois de lavagens com soluções de álcool e ácido (utilizadas na coloração de Ziehl-Neelsen), permanecendo de cor vermelha (Figura 7). Por isso, pertencem aos Bacilos Álcool-Acido Resistentes (B.A.A.R.).



Figura 7 – Coloração de Ziehl-Neelsen indicando o *Mbt* (Huggett *et al.*, 2003)

Além destas características, as bactérias do complexo são classificadas como micobactérias não pigmentadas de crescimento lento, formando agrupamentos de ramos alongados e tortuosos mais conhecidos como “cordas”. Quando há uma análise de baciloscopia e se observam estas “cordas”, concluímos que estamos perante a bactéria do complexo *M. tuberculosis* (Campos, 2006a).

M. tuberculosis é uma bactéria aeróbia estrita, o que faz com que tenha que estar exposta a elevados níveis de oxigénio para o seu desenvolvimento e multiplicação. É considerado um parasita intracelular facultativo (de virulência variável) uma vez que se consegue multiplicar no interior das células fagocitárias. Tem um tempo de geração longo, podendo atingir as 20 horas, dependendo do meio de cultura implantado para o seu crescimento. No interior do macrófago, multiplicam-se, geralmente, a cada 25-32 horas. São, de uma maneira em geral, resistentes à ação de agentes físicos, como os raios ultravioleta e o calor (Campos, 2006a).

Estudos sobre o genoma composto por, relativamente quatro mil genes de características únicas indicam maior parte dos fatores de patogenicidade deste bacilo. A capacidade do bacilo de Koch crescer no hospedeiro esta relacionada com certos genes (aproximadamente 170) codificarem proteínas envolvidas na variação antigénica e outros (cerca de 200) codificarem enzimas úteis no metabolismo dos ácidos gordos (podendo estes ser a principal fonte de carbono) (Campos, 2006a).

Os meios de cultura de tecidos são os principais métodos para testar a virulência do bacilo, usando macrófagos, células dendríticas, pneumócitos e até mesmo modelos animais. Estes métodos têm vindo a ser utilizados para identificar genes responsáveis pela patogenicidade da bactéria. Cerca 10% do genoma do bacilo consegue fugir às respostas imunológicas do hospedeiro, ditando assim a agressividade deste. O bacilo tornou-se resistente devido a sua parede, que mantém a virulência e também pela codificação das proteínas lípidos e hidratos de carbono na parede celular (Campos, 2006a).

2. Espécies de *Mycobacterium* sp

Mbt pertence ao género *Mycobacterium* e à família das *Mycobacteriaceae*. Contem sete espécies de micobactérias estreitamente relacionadas (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. Canetti* e *M. mungi*) as quais juntas compreendem o que é conhecido como o complexo de *M. tuberculosis*. A maioria, mas não todas, são encontradas em seres humanos, devido a causarem doenças no Homem (Tabela 1). Nos Estados Unidos, a maioria dos casos de TB são provocadas por *Mbt*. Estes organismos de *Mbt* também são chamados de bacilos da tuberculose ou bacilo de Koch. (Rastogi *et al.*, 2001).

Tabela 1 – Classificação das espécies micobacterianas quanto à sua patogenicidade para o Homem (Adaptado de Ferreira e Sousa, 2000)

Estritamente patogénicas	Potencialmente patogénicas	Raramente patogénicas
<i>M.tuberculosis</i>	<i>M.scrofulaceum</i>	<i>M.gordonae</i>
<i>M.bovis</i>	<i>M.kansasii</i>	<i>M.terrae</i>
<i>M.africanum</i>	<i>M.xenopi</i>	<i>M.rivale</i>
<i>M.lepraes</i>	<i>M.marinum</i>	<i>M.nonchromogenicum</i>
<i>M.ulcerans</i>	<i>M.simiae</i>	<i>M.flavescens</i>
<i>M.haemaphilum</i>	<i>M.szulgai</i>	<i>M.farcinogenes</i>
	<i>M.avium</i>	<i>M.microti</i>
	<i>M.paratuberculosis</i>	<i>M.lepraemurium</i>
	<i>M.asiaticum</i>	<i>M.segmatis</i>
	<i>M.malmoense</i>	<i>M.termoresistibilie</i>
	<i>M.shimoidei</i>	<i>M.fallax</i>
	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.phlei</i>
	<i>M.chelonae</i>	<i>M.vaccae</i>
		<i>M.parafortuitum</i>
		<i>M.aurum</i>
		<i>M.chitae</i>
		<i>M.duvalii</i>
		<i>M.gtivum</i>

3. Os ácidos micólicos

Os ácidos micólicos encontram-se em grande quantidade na parede celular, são de origem lipídica e têm o poder de proteger a micobactéria da desidratação, agentes químicos e antibacterianos (Vander Beken *et al.*, 2011). Para todo o processo acontecer tem que existir uma biossíntese que requer dois tipos de ácidos gordos distintos, precisando de duas enzimas (duas fases no processo): as enzimas eucarióticas tipo I (FAS-I) e as enzimas procarióticas de condensação tipo II (FAS-II) (Figura 8).

As iniciais (FAS-I) promovem a síntese da acil-CoA de cadeia média que será usada como iniciador pelas enzimas FAS-II (mtFabH e β -cetoacil-ACP sintase).

Na fase dois do processo do ciclo, o produto resultante β -cetoacil-ACP é reduzido pela enzima NADPH dependente β -cetoacil redutase. O produto desta reação é desidratado por um conjunto de enzimas HadABC e finalmente reduzida pela enzima InhA (proteína transportadora enoil-acil redutase) (Molle *et al.*, 2010).

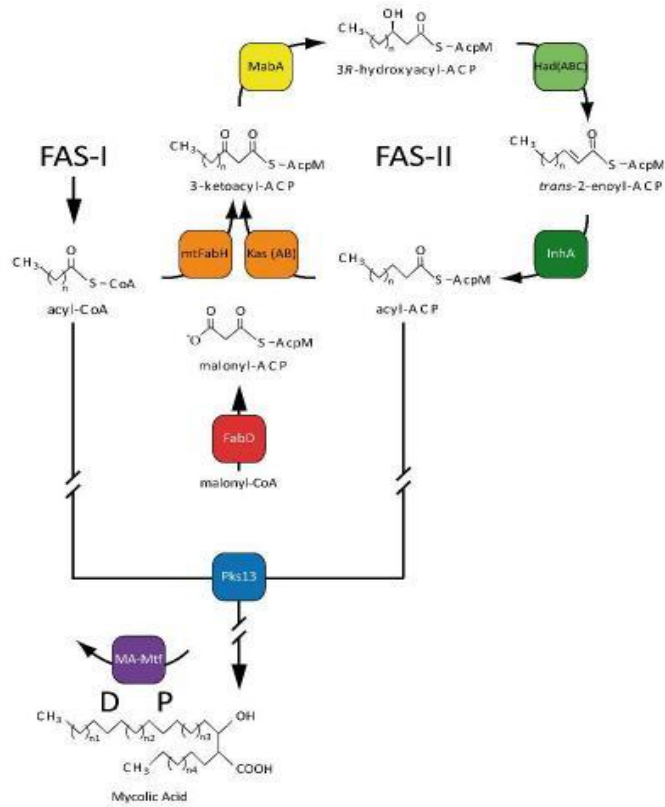


Figura 8 – Síntese dos ácidos micólicos (Cantaloube *et al.*, 2011)

V. TUBERCULOSE

1. Definição da Tuberculose

A TB é uma das doenças mais antigas que atinge o ser humano e é provável que nos tempos da pré-história tenha sido uma das maiores causas de morte da população. Esta doença é causada por uma bactéria chamada *Mbt* e normalmente afeta os pulmões e outros órgãos envolventes (um terço dos casos). Se for tratada adequadamente, a tuberculose causada por espécies suscetíveis a fármacos é curável em praticamente todos os casos. Se não for tratada, a doença pode ser fatal dentro de 5 anos em 50-60% dos casos. A transmissão geralmente ocorre através da disseminação aérea de gotículas produzidas por pacientes com TB pulmonar infecciosa (Kasper *et al.*, 2008).

2. Contágio

A TB é dispersada quando as pessoas com tuberculose tosse ou espirram e são expelidos aerossóis no ar. Quando existe contacto diário com pessoas portadoras da doença poderá haver um elevado risco de contágio, mas esta infeção só poderá ocorrer se a pessoa portadora tiver tuberculose infecciosa ativa (se estiver latente não há risco de contágio) (Dalcolmo *et al.*, 2007).

A probabilidade de transmissão é determinada pela quantidade expelida e pelo grau de infeção, delimitando também forma, duração e virulência do bacilo.

O isolamento da pessoa com a doença ativa e com um tratamento antituberculoso eficiente pode interromper a cadeia de transmissão rapidamente (Hannan *et al.*, 2001).

3. Infeção

A infeção pelo *Mbt* é iniciada quando o bacilo de Koch chega aos alvéolos pulmonares, podendo espalhar-se pelos nódulos linfáticos. Ao atingir estes nódulos vão entrar em contacto com a corrente sanguínea e passar para os tecidos mais distantes onde há desenvolvimento da doença (parte superior dos pulmões, rins, cérebro e ossos) (Figura 9) (Knechel, 2009).

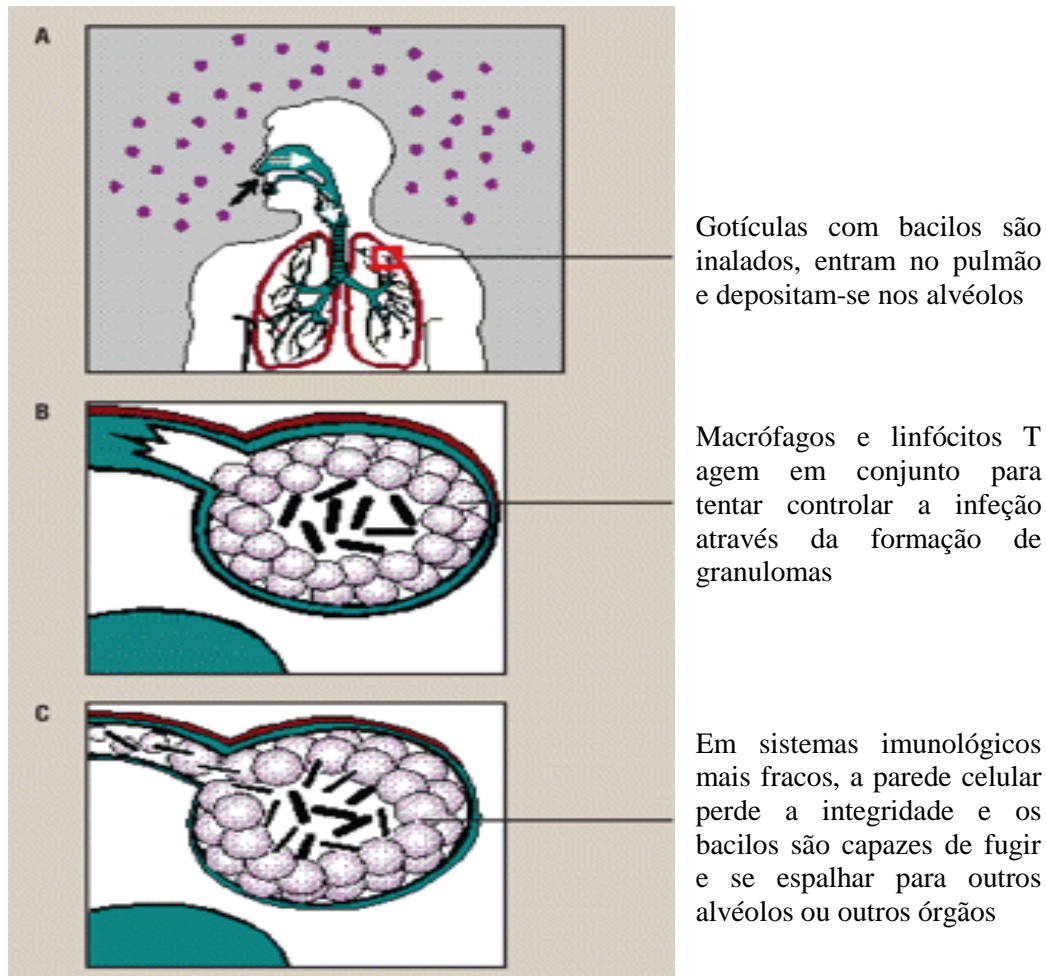


Figura 9 – Infecção pelo *Mbt* (Adaptado de Knechel, 2009)

O ser humano consegue destruir a maioria dos bacilos através de uma resposta imunológica, formando assim um granuloma. Os nódulos da TB são caracterizados por serem lesões de pequenas dimensões com cor acinzentada e é considerado um tecido morto onde está alojada a bactéria da tuberculose (Knechel, 2009).

O sistema imunológico, normalmente, é capaz de conter a multiplicação do bacilo, evitando a sua dispersão em 90% dos casos.

4. Evolução da doença

Em certas pessoas, o bacilo de Koch consegue escapar a várias defesas do sistema imunológico e multiplica-se rapidamente, resultando na progressão de uma simples infecção para a doença propriamente dita. Este caso acontece logo após a infecção (TB

primária em 1 a 5% dos casos) ou passado alguns anos de infecção (reativação da doença tuberculosa, ou bacilo dormente em 5 a 9 % dos casos) (Levy, 2012).

Cerca de 5% das pessoas que se encontram infetadas vão desenvolver a doença nos dois primeiros anos e os outros 5% desenvolvem mais tarde. As pessoas com sistema imunológico normalizado mas que se encontram infetadas podem desenvolver, na mesma, a doença durante a vida (cerca de 10%) (Levy, 2012).

Há determinadas patologias, como o caso do HIV e de outras doenças que deprimem o sistema imunológico, fazendo com que haja um risco aumentado de evolução da TB (existindo uma maior probabilidade de desenvolver complicações). Estas situações de risco podem incluir: o uso excessivo de fármacos injetáveis; infecção recente de TB nos últimos 2 anos; Raio-x do tórax que sugira a existência de TB (lesões fibróticas e nódulos); *diabetes mellitus*, terapia de longa duração com corticosteroides e outras terapias imunossupressoras; cancro na cabeça ou pescoço, doenças sanguíneas ou reticuloendoteliais (leucemia e doença de Hodgkin), doença renal em estado avançado, gastrectomia, síndrome de má absorção crónica, ou reduzido peso corporal (10% ou mais de peso abaixo do ideal) (Levy, 2012).

5. Tipos existentes da Tuberculose

A TB é uma doença que se alastra por diversos órgãos onde se aloja e infecta. Existem dois tipos de TB:

- Tuberculose pulmonar (pode ser classificada como primária ou pós-primário (tipo adulto, secundário). Esta distinção tem sido estimulada por evidências moleculares de áreas endémicas de TB, indicando que uma grande percentagem dos casos de TB resultam de infecção recente (ou infecção primária ou reinfeção) e não de reativação) (Blumberg e Leonard, 2006);
- Tuberculose extrapulmonar (praticamente todos os órgãos podem ser afetados. Sendo os indivíduos infetados com HIV os mais atingidos, tornando-se mais comum nos dias de hoje do que no passado. As formas extrapulmonares da tuberculose incluem o comprometimento pleural, ganglionar, geniturinário, ósteo-articular, do sistema nervoso central, trato gastrointestinal e aparelho

visual. Entre as menos comuns, estão a laríngea, das partes moles e cutânea) (Blumberg e Leonard, 2006).

Dentro da TB pulmonar pode haver distinção de novos tipos de TB tendo estes resistências associadas:

- Tuberculose multirresistente (TBMR) (corresponde à tuberculose que é resistente a pelo menos dois dos antituberculosos, a isoniazida e a rifampicina. Estes fármacos são de primeira linha e são usados para tratar os pacientes com tuberculose ativa) (Kapadiya *et al.*, 2009);
- Tuberculose extensivamente resistente (TB-XDR) (é um tipo relativamente raro de tuberculose resistente a medicamentos. É resistente à isoniazida, à rifampicina, a qualquer fluoroquinolonas e, pelo menos, um dos três medicamentos injetáveis de segunda linha (ou seja, amicacina, canamicina, ou capreomicina). Resiste a antibacilares de primeira linha e de segunda linha, os pacientes ficam com as opções de tratamento que são mais tóxicos, mais caros, e muito menos eficaz.) (Kapadiya *et al.*, 2009).
-

6. Vias de transmissão de *M. tuberculosis*

Mbt é transportado em partículas suspensas no ar, chamados de núcleos de gotículas, de 1-5 microns de diâmetro.

As gotículas infecciosas são produzidas quando as pessoas que têm a doença TB pulmonar ou laríngea, tosem, espirram, gritam, ou cantam. Dependendo do ambiente, estas pequenas partículas podem manter-se suspensas no ar durante várias horas. *Mbt* não é transmitida pela superfície de contacto mas sim através do ar. A transmissão ocorre quando a pessoa inala gotículas contendo *Mbt*. Estas atravessam a boca ou passagens nasais, do trato respiratório superior e brônquios até atingir os alvéolos (Figura 10). (Ferreira e Sousa, 2000).

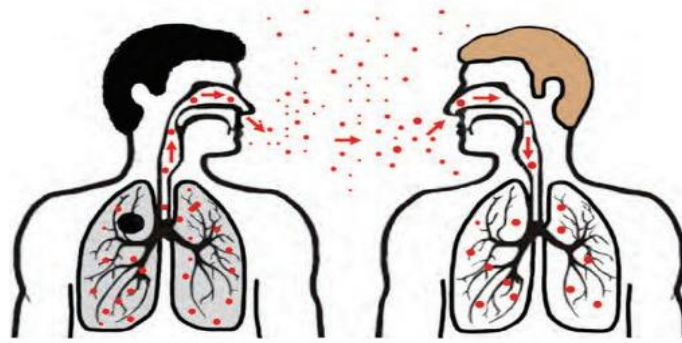


Figura 10 - Transmissão de TBMR. Os pontos no ar representam núcleos de gotículas contendo bacilos da TB (adaptado de CDC, 2013)

7. Patogénese

Os vários tipos de TB podem ser divididos por proliferação ou primária, onde os indivíduos nunca tiveram contacto com o bacilo, tendo assim a primeira exposição ou então em secundária que se desenvolve a partir de uma infeção exógena (infeção nova) ou então uma infeção endógena (quando há reativação do bacilo latente) (Bombarda *et al.*, 2001).

Depois de ocorrer a inalação da bactéria, os macrófagos alveolares e as células dendríticas (pertencentes ao sistema imunitário) vão captura-la através da fagocitose.

Como o *Mycobacterium sp* tem uma parede celular constituída por ácidos micólicos os quais lhe conferem proteção, e tendo uma capacidade inibitória da ligação fagolisossoma, vai conseguir sustentar-se dentro do macrófago alveolar e transformá-lo no seu reservatório. Sendo o macrófago infetado, liberta citocinas inflamatórias, conseguindo incorporar neutrófilos, monócitos e células dendríticas. Estas células dendríticas vão-se encaminhar para o nóculo linfático ativando, assim, as células T (Russell, 2007).

As citocinas IL-12 e IL-18, vão induzir a atividade das células NK, libertando IFN- γ , ativando os macrófagos a produzir TNF- α e substâncias microbicidas. Com a sinalização criada e o acumular destas células do sistema imunológico, vai ocorrer a formação do granuloma.

Os macrófagos presentes no granuloma vão diferenciar-se em células epiteliais. Nesta situação as bactérias vão ficar cercadas por linfócitos, fibroblastos e proteínas. Com o aumento da infecção os macrófagos necróticos juntam-se no granuloma, causando uma cavidade pulmonar (necrose caseosa, típica da TB).

Quando há a abertura destas cavidades, ocorre uma libertação dos bacilos ativos, causadores da infecção do indivíduo. Se os bacilos permanecerem no granuloma trata-se de uma infecção latente, ficando estes em estado de dormência, algumas vezes durante vários anos (característico do *Mbt* e do *Mycobacterium leprae*) (de Chastellier, 2009).

O *Mbt* é muito sensível aos ácidos, logo, se estiver perante um meio acidificado (pH baixo) o seu crescimento será comprometido. Este poderá ser um dos fatores fundamentais para alguns fármacos como por exemplo a pirazinamida que só demonstra a sua eficácia quando é convertido a ácido fraco, o ácido pirazinóico. (Zhang *et al.*, 2003).

VI. TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE

1. Definição

A TB é uma doença curável em 90% dos casos, mas tem que ser tratada com os princípios básicos que consistem na associação medicamentosa adequada, no tempo correto e com as doses suficientes. Esta associação medicamentosa é a junção de quatro fármacos – rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol durante dois meses (fase intensiva), posteriormente utiliza-se rifampicina mais isoniazida durante 4 meses. Estes esquemas terapêuticos sofrem ameaça quando ocorre uma resistência aos fármacos de primeira linha, pois vai acarretar mais custos a nível do sistema nacional de saúde e também um incômodo para o doente, pois o tratamento aumenta para 24 meses, tendo menores taxa de cura, mais efeitos adversos, maior ocorrência de hospitalização, prognósticos mais desfavoráveis e possíveis intervenções cirúrgicas (Rocha *et al.*, 2008).

A TBMR é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como sendo a tuberculose resistente à rifampicina e isoniazida (WHO, 2006).

2. Tipos de tuberculose resistentes aos medicamentos

A tuberculose resistente a medicamentos pode desenvolver de duas formas diferentes, chamados de resistência primária e secundária (Tabela 2). A resistência primária ocorre em pessoas que estão infetadas inicialmente com bactérias resistentes. A resistência secundária, ou resistência adquirida, desenvolve-se durante o tratamento da TB, ou devido a um tratamento inadequado do paciente, não levando a terapêutica prescrita de forma adequada, ou por causa de outras doenças como a insuficiente absorção de fármacos ou interações fármaco-fármaco que levam a baixos níveis séricos (CDC, 2013).

As circunstâncias em que uma pessoa poderá estar exposta a um risco aumentado de infecção com tuberculose resistente a medicamentos incluem os seguintes fatores (CDC, 2013):

- A exposição a uma pessoa infetada com tuberculose resistente a medicamentos;

- A exposição a uma pessoa com a doença que teve tratamento prévio para TB (falha do tratamento ou recidiva) e cuja suscetibilidade e os resultados não são conhecidos;
- A exposição a uma pessoa com TB a partir de uma área geográfica em que há uma alta prevalência de resistência aos medicamentos, ou viajar para uma dessas áreas;
- A exposição a uma pessoa que continua a ter baciloscopia positiva e culturas após 2 meses de quimioterapia combinada.
-

Tabela 2 – TBMR primária e secundária (adaptado de CDC, 2013)

TBMR primária	TBMR Secundária
Causada por transmissão pessoa-a-pessoa de bactérias resistentes aos medicamentos	Desenvolve-se durante o tratamento da tuberculose
<p>A exposição a uma pessoa que:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Esteja infetada por tuberculose resistente a medicamentos • Esteve em tratamento prévio teve por TB (falha do tratamento ou recidiva e cuja suscetibilidade teste resultados não são conhecidos) • A partir de uma área em que há uma alta prevalência de resistência aos fármacos • Continua a ter culturas positivas e após 2 meses de quimioterapia de combinação • Viaje em áreas geográficas com alta prevalência de tuberculose resistente a medicamentos 	<p>Desenvolve a doença porque o paciente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Não foi tratado com o regime de tratamento adequado • Não seguiu o regime terapêutico prescrito • Tomou os medicamentos de forma incorreta • Tomou os medicamentos de forma irregular • Por má absorção • Pelas interações medicamentosas que causam baixos níveis séricos

VII. PREVENÇÃO

Inúmeros estudos revelam que a origem e amplificação da TBMR têm vários fatores envolvidos (WHO, 2006):

- Tratamento incompleto ou inadequado, por má adesão e/ou deficiente organização dos serviços médicos;
- Atraso no diagnóstico da multirresistência, acarretando uma infecciosidade prolongada e conseqüentemente a transmissão de estirpes resistentes na comunidade.
- “Efeito de amplificação”, ou seja, os doentes portadores de TBMR submetidos à terapêutica antibacilar de 1ª linha, podem adquirir um maior nível de resistências, em resultado de exposição inadvertida a monoterapia.
- A co-infecção pelo HIV pode encurtar o período de evolução que medeia entre a infecção e a eclosão da doença, implicando um acréscimo do risco de infecção na comunidade.

De maneira a prevenir o fenômeno de amplificação da resistência e transmissão de espécies multirresistentes é necessária uma detecção precoce e detalhada das suas multirresistências. Se existir um atraso no diagnóstico da doença ou no início do tratamento, pode ocorrer lesões orgânicas e assim existir um aumento das taxas de resistência, sendo dois pontos importantes no prognóstico do tratamento da TBMR (Ormerod, 2005).

As resistências aos antibióticos têm evoluído devido às terapêuticas utilizadas erradamente ou até mesmo às interrupções do tratamento, realidade induzida pelo Homem. Enquanto se espera pelo teste de sensibilidade aos antibacilares (TSA), é necessário introduzir um esquema padronizado para um novo tratamento. Existem erros clínicos que estão associados e podem ser relacionados com (Gomes, 2008):

- Deficiente implementação de um dispositivo que garanta a adesão ao tratamento;
- Incapacidade em detetar a não adesão ao tratamento ou de tomar medidas corretivas;
- Não conhecimento de resistência pré-existente;

- Prescrição de esquemas terapêuticos inadequados;
- Junção de um único fármaco a um regime terapêutico ineficaz;
- Má percepção de situações clínicas que podem conduzir a uma redução dos níveis séricos dos antibióticos (má absorção, interações medicamentosas, infecção VIH e outras morbilidades);
- Prolongamento injustificado do tratamento.

Para ser realizado um despiste atempado em casos de multirresistência, foi necessário conhecer situações clínicas que prejudicam a TBMR quando associados (Gomes, 2008):

- A existência de tratamentos antituberculosos anteriores;
- Falência da conversão cultural após 3 meses de tratamento ou a persistência de positividade bacteriológica após 2 ou mais tratamentos (caso crónico);
- Ser contacto de caso índice de TBMR (em especial se for VIH ou criança);
- Ser residente em área de alta prevalência de TBMR;
- Ser imigrante de região com elevada prevalência de TBMR;
- Viver em contexto epidemiológico restrito sugestivo de transmissão facilitada (prisões, abrigos, hospitais e outras instituições).

Contudo, deve realizar-se sistematicamente TSA iniciando uma terapêutica eficaz, pois o enquadramento clínico utilizado pode não fazer uma identificação precoce e decisiva da TBMR (Aziz *et al.*, 2006).

1. DOTS (“Directly Observed Treatment Short-course“)

A aplicação da estratégia DOTS passou a ser recomendada em todo o mundo, para a cura dos pacientes, para evitar o desenvolvimento e propagação da TBMR e para reduzir a transmissão desta. A sua aplicação pode salvar milhões de vidas. Esta estratégia que significa tratamento diretamente observado de curta duração ou do inglês

“Directly Observed Treatment Short-course“ baseia-se em cinco parâmetros fundamentais:

- Detecção de casos através de exames bacteriológicos e sua confirmação;
- Compromisso financeiro e ético;
- Padronização dos tratamentos de curta duração e introdução da estratégia;
- Fornecimento de medição;
- Sistema padronizado de dados para avaliação do comportamento dos pacientes.

A estratégia DOTS permite combater eficazmente a TBMR, cuidando a infecção e impedindo o aparecimento de novas resistências e a sua propagação. Apesar de ser uma estratégia de grande sucesso em maior parte dos casos, só alguns doentes têm acesso, sendo atribuído a doentes com falta de vontade política, deficientes infraestruturas assistenciais, instabilidade do fornecimento de medicamentos e má gestão, escassez de recursos e com um nível socioeconómico muito baixo. Estes fatores impedem que muitos doentes não tenham acesso ao tratamento (WHO, 2009).

VIII. FATORES DE RISCO

A TBMR tem como principal fator de risco o tratamento inapropriado e também a não adesão ao tratamento por parte do paciente. Outros dos fatores mais importantes são abuso de fármacos, alcoolismo, sem-abrigo, pobreza e falta de indicadores do tratamento correto (Loddenkemper *et al.*, 2002).

Posteriormente foi considerado risco para o paciente uma recaída ou então um tratamento anterior mal efetuado, a origem de regiões de alta incidência da tuberculose, histórias prisionais e pacientes com doenças imunodepressoras como os *diabetes mellitus* e o HIV (Loddenkemper *et al.*, 2002).

Um estudo publicado em 2003 acrescenta, para além dos fatores indicados anteriormente, a pobreza extrema, a falha no atendimento, intolerância à medicação ou a falta dela, alcoolismo e lesões radiológicas bilaterais pulmonares (Barroso *et al.*, 2003).

Na maior parte das situações, a não adesão à terapêutica está relacionada com o tratamento inadequado ou a intolerância à medicação. A pobreza é variável, podendo ser identificada como baixo nível socioeconómico, habitação precária, ausência de trabalho fixo, desemprego ou viver sozinho, estas condições são associadas ao abandono do tratamento da tuberculose. A falta de medicação ocorre nos serviços de saúde, logo, quando se nota esta falta encaminha-se o paciente para outra unidade de saúde para não acontecer o abandono do tratamento ou então ser feito de forma irregular (Barroso *et al.*, 2003).

Outros fatores associados à TBMR (Granich *et al.*, 2005):

- Expetoração positiva para Bacilo Álcool-Ácido Resistente (B.A.A.R.)
- Etnia Asiática e Africana
- Permanência inferior a 5 anos nos EUA quando é feito o diagnóstico
- Diagnóstico anterior de tuberculose

A resistência a medicamentos antituberculosos baseia-se principalmente na história de tratamento antibacilar anteriormente realizado; nascimento em países estrangeiros com

alta incidência de TBMR; contacto com um caso conhecido de tuberculose resistente a antibacilares; doentes infetados com VIH e principalmente a idade mais afetada está compreendida entre os 25 e 44 anos de sexo masculino (National collaborating centre for chronic conditions, 2006).

Recomenda-se assim, que a resposta ao tratamento seja estritamente monitorizada nos pacientes de elevado risco de resistência e caso não hajam melhorias ou se as culturas permanecerem positivas durante quatro meses (depois do tratamento) deve-se suspeitar de resistência ao tratamento utilizado e rever este para ser melhorado (National collaborating centre for chronic conditions, 2006).

Fatores que determinam a probabilidade de transmissão do *Mbt* (CDC, 2013):

- Suscetibilidade → Estado imunitário do individuo exposto
- Infeciosidade → Está diretamente relacionado com o número de bacilos da tuberculose que a pessoa expele para o ar. As pessoas que expulsam muitos bacilos da tuberculose estão com o risco de tuberculose muito mais elevado do que pessoas que expelem poucos ou nenhuns.
- Meio ambiente → Os fatores ambientais que afetam a concentração de organismos de *Mbt*
- Exposição → Proximidade, frequência e duração da exposição ao bacilo de Koch

Existem vários fatores determinantes para a transmissão do *Mbt*. As tabelas seguintes indicam esses fatores, começando com as características dos pacientes associadas à infeciosidade (Tabela 3).

Tabela 3 - Características de um paciente com a doença e a sua associação com a infecciosidade
(Adaptado de CDC, 2013)

Fator	Descrição
Clinica	<ul style="list-style-type: none"> → Presença de tosse, especialmente com duração de 3 semanas ou mais; → Doença do trato respiratório, especialmente com envolvimento da laringe (altamente infecciosa); → Incapacidade de cobrir a boca e o nariz ao tossir; - Tratamento impróprio ou inadequado (fármacos, duração)
Procedimento	→ Submetidos a procedimentos de indução de tosse ou aerossol de geração (por exemplo broncoscopia, administração de medicamentos em aerossol)
Radiográficos e laboratoriais	<ul style="list-style-type: none"> → Cavitação na radiografia do tórax; → Cultura positiva para <i>Mbt</i>;

Depois da infecciosidade também existem fatores ambientais que aumentam a probabilidade do bacilo ser transmitido.

Tabela 4 – Transmissão do bacilo de Koch através de fatores ambientais (Adaptado de CDC, 2013)

Fator	Descrição
Concentração de partículas infecciosas	→ Número de núcleos de gotículas no ar aumenta a probabilidade transmissão
Espaço	→ Exposição em espaços pequenos e fechados
Ventilação	→ Ventilação local ou geral inadequada que resulta em diluição insuficiente ou remoção de partículas infecciosas
Circulação de ar	→ Recirculação de ar contendo gotículas infecciosas
Manuseio de amostras	→ Manipulação inadequada de procedimentos que vão gerar partículas infecciosas
Pressão de ar	→ Pressão de ar positiva no quarto paciente infeccioso que causa bacilos de koch que irão fluir para outras áreas.

Por último, existe a exposição ao bacilo que é um dos principais fatores de risco

Tabela 5 - Fatores de exposição que podem afetar a transmissão de *Mbt* (Adaptado de CDC, 2013)

Fator	Descrição
Duração da exposição a uma pessoa com tuberculose infecciosa	→ Quanto maior o tempo de exposição, maior o risco de transmissão
Frequência de exposição a pessoa infectada	→ O mais frequente a exposição, maior o risco de transmissão
Proximidade física para pessoa infecciosa	→ Quanto maior for a proximidade, maior o risco de transmissão

IX. DIAGNÓSTICO

O desenvolvimento das técnicas em microbiologia tem aumentado ao longo dos anos, e novas técnicas de diagnóstico são melhoradas e descobertas outras com o objetivo do diagnóstico ser mais precoce e assim fazer uma terapêutica mais adequada a cada situação de tuberculose descoberta (Jou *et al.*, 1997).

Os métodos deverão ser de fácil realização, com infraestruturas e equipamentos básicos de modo a que pessoas com níveis socioeconómicos baixos possam realiza-los. Quanto mais rápido e fáceis forem os diagnósticos mais rápido será o tratamento. Este bacilo é facilmente detetado com amostras de expetoração, lavagens bronco-alveolares ou então aspirações brônquicas (Singh e Kant, 2002).

O diagnóstico é realizado a partir de uma observação microscópica, uma cultura, sistemas automáticos e semiautomáticos ou com tecnologias de identificação inovadoras.

1. Observação microscópica

É realizado um exame microscópico direto onde possa ser visível os B.A.A.R.. É o método menos dispendioso, mais rápido e de melhor realização. São realizadas técnicas de Auramina-Rodamina e de Ziehl-Neelsen. Apesar de ser uma técnica de fácil realização e de resultados rápidos apresenta uma baixa sensibilidade, tendo este teste que ter 104 bacilos/ml para haver obtenção de um exame positivo, assim, só apenas 50 a 70% dos doentes com lesão pulmonar são positivos à baciloscopia (Ferreira e Ávila, 2001).

A coloração de Auromina-Rodamina é uma técnica de fluorescência que consiste na coloração de auramina, visualizando os B.A.A.R quando expostos a microscopia de fluorescência (Figura 11) (Zhang *et al.*, 1998).

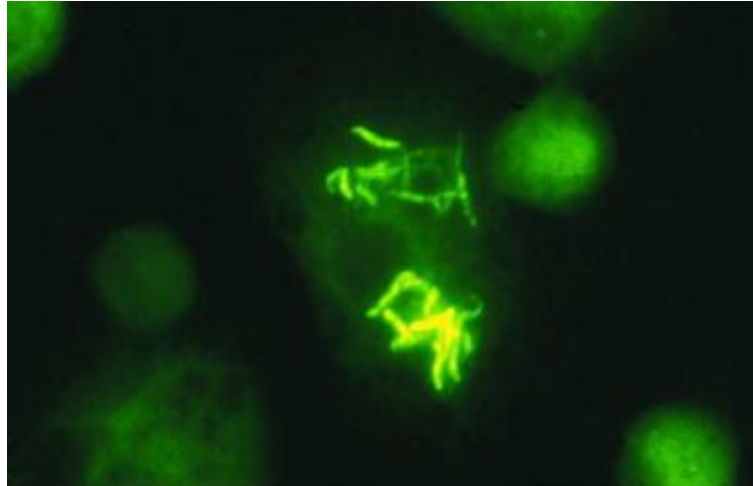


Figura 11 – Visualização do *Mbt* através da técnica de coloração auramina-rodamina (Zhang *et al.*, 1998)

Na coloração de Ziehl-Neelsen, o procedimento com a coloração pela fucsina a quente, faz com que as micobactérias não descorem por uma mistura de álcool e ácido clorídrico. Isto acontece, devido à presença de grandes quantidade de ácidos micólicos na parede celular provocando hidrofobicidade, dificultando a remoção do corante pelo solvente. O método consiste na adição de fucsina ao esfregaço a quente e de seguida a adição de uma mistura de ácido clorídrico (3%) e álcool (97%). Após a lavagem com água, coloca-se azul-metileno no esfregaço. As bactérias B.A.A.R. adquirem a cor da fucsina (cor vermelha) e as outras não retêm o corante ficando com a cor do azul-metileno, funcionando como contraste (Ferreira e Ávila, 2001).

2. Cultura

A cultura de *Mbt* permite distinguir o bacilo de Koch de outras micobactérias sendo um método essencial. Com a presença de 10 bacilos/ml de amostra é possível obter um exame com resultado positivo, sendo mais sensível que por observação microscópica. A identificação das espécies isoladas é realizada através do isolamento em cultura pura e posterior identificação. Os meios de cultura têm que ser ricos em nutrientes e frescos devido a serem bactérias exigentes em termos de crescimento. Apesar de ser um método mais sensível, tem uma grande desvantagem, pois necessita de 40 dias para obter um resultado (quatro semanas de incubação a 37°C com 5-10% de CO₂ e aproximadamente

mais quatro semanas para realização e identificação do antibiograma) (Singh e Kant, 2002).

Os meios de cultura utilizados neste método são meios sólidos sendo o meio de Löwestein-Jensen o mais utilizado, fornecendo uma amostra quantitativa através da contagem de colônias existentes, tornando melhor a monitorização do tratamento. Os meios de cultura líquidos mais utilizados são os de Middlebrook pois são bastante enriquecidos, dando uma maior sensibilidade (Micobacterias y “tuberculosis”).

3. Sistemas automáticos e semiautomáticos

Sistemas automáticos e semiautomáticos tornaram-me muito importantes para uma rápida leitura do crescimento das micobactérias em meio líquido, fazendo com que houvesse uma melhoria na micobacteriologia. Com estes sistemas há uma deteção mais rápida, utilizando vários métodos (Bento *et al.*, 2011):

- BACTEC 460TB que deteta CO₂ radiomarcado libertado no meio pela replicação bacteriana (radiométricos) (Rodrigues *et al.*, 2007).
- MGIT (tubo indicador de crescimento bacteriano), que é uma alternativa à cultura tradicional, é um sistema de fluorescência baseado no consumo de oxigénio pelo BK durante a sua replicação, cujo resultado pode ser conhecido dentro de 20 dias (fluorométricos).
- Recentemente foi conjugado o BACTEC ao MGIT formando o BACTEC MGIT 960, que permite a identificação do BK em 12,7 dias em média.
- MB/BacT é baseado na deteção colorimétrica de CO₂ produzido pelo crescimento da micobactéria (colorimétricos) (Diaz-Infantes *et al.*, 2000).

4. Novos métodos de diagnóstico

Estudos realizados em doentes com TB pulmonar negativa ao exame direto, com ou sem tosse produtiva, revelou que o uso combinado com o teste broncoalveolar e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) aumentam a segurança do diagnóstico. Para pesquisar os bacilos de Koch em “material” não pulmonar (exsudado linfático, urina,

líquido pleural ou líquido cefalorraquidiano) a especificidade do PCR atinge 100% e a sensibilidade ronda os 93-94%, superiores aos dos métodos convencionais (exame direto e cultura), para além de ser mais rápido, também permite a identificação da espécie. Este método identifica uma sequência de ácido desoxiribonucleico (DNA) específica do *M. tuberculosis*. O PCR em tempo real é baseado também na hibridização dos ácidos nucleicos amplificados com sondas fluorescentes, e têm como alvo regiões específicas de interesse do DNA. A fluorescência aumenta na razão direta da quantidade do produto amplificado. A sua sensibilidade e a sua especificidade são próximas de 100% e os resultados são conhecidos em 1,5 a 2 horas após extração do DNA (Ling *et al.*, 2008)

Indiscutivelmente, o desenvolvimento de técnicas de amplificação do ácido nucleico (NAAT) representa uma melhoria significativa no diagnóstico da TB. Atualmente, há dois métodos comerciais disponíveis aprovados para a pesquisa direta do bacilo de Koch: AMTD (teste amplificado direto) e o AmpliCor. O AMTD utiliza uma sonda de DNA e o segundo uma reação colorimétrica. São técnicas de elevada sensibilidade e especificidade em material positivo, mas de valores diminutos quando utilizados em testes negativos e em materiais extrapulmonares (Campos, 2006b).

Uma outra técnica é o BDProbe Tec MTB, é um sistema semiautomatizado para deteção rápida de *M. tuberculosis* em material respiratório, baseado na replicação enzimática de sequência alvo de DNA. O produto amplificado é detetado por um medidor de luminosidade e embora a sua sensibilidade e a sua especificidade sejam próximas a 100%, e o tempo seja próximo de 2 horas, as taxas de falsos-positivos são significativas e dependentes da experiência do pessoal que faz o teste (Campos, 2006b).

Para identificar estirpes de *M. tuberculosis* resistentes à terapêutica, desenvolvem-se métodos para serem adequados à terapêutica. Estas técnicas baseiam-se no PCR e na NAAT, identificando sequências responsáveis pela resistência. Um dos exemplos é o PCR quantitativo automatizado (Xpert MTB/RIF) que permite testar a resistência à rifampicina, através da identificação de mutações numa região que contém 81 pares de bases (pb) na zona central do gene *rpoB* (Theron *et al.*, 2012, Van Rie *et al.*, 2010).

X. TRATAMENTO

As ações bactericidas de prevenção e resistência de vários fármacos devem ser realizadas num longo período de tempo e de modo a não existir recaídas ou falhas no tratamento.

Com o decorrer dos anos foram encontrados fármacos para combater a TB. Surge então a estreptomocina que foi o primeiro fármaco a combater a doença. Seguidamente, como este fármaco teve vários meses de utilização, surgiu resistência ao tratamento, foi descoberta a isoniazida que forma o primeiro esquema terapêutico, conjugando este antituberculoso com a rifampicina (Duarte *et al.*, 2010b).

O tratamento requer a utilização de diversos fármacos e com uma duração bastante elevada. Quando a isoniazida é administrada 12, 6 ou 3 meses existe uma redução da doença em 75%, 65% ou 21% respetivamente (Duarte *et al.*, 2010a).

Nos doentes tuberculosos é utilizado um tratamento de seis meses, onde os primeiros dois meses é feito com associação de isoniazida, rifampicina e a pirazinamida e os outros quatro meses é utilizada só a associação entre a rifampicina e a isoniazida.

Tabela 6 – Esquema de tratamento habitual da TB (Adaptado de Duarte *et al.*, 2010a)

Fases do Tratamento	Fármacos utilizados
Primeira fase (2meses)	<ul style="list-style-type: none"> • Rifampicina • Isoniazida • Pirazinamida
Segunda fase (4meses)	<ul style="list-style-type: none"> • Rifampicina • Isoniazida

A rifampicina e a isoniazida são os principais fármacos utilizados na terapêutica. A pirazinamida foi incluída no início da terapêutica (dois meses) pois permite baixar a duração do tratamento para seis meses (inicialmente era um tratamento de 18 a 24 meses) e o tratamento continuou com o sucesso inicial (aproximadamente 95%) (Hawkins *et al.*, 1988).

A terapêutica é classificada em dois grandes grupos (Arbex *et al.*,2010a):

- Antibióticos de primeira linha que são constituídos pela isoniazida, rifampicina, pirazinamida, estreptomicina e etambutol;
- Antibióticos de segunda linha constituídos por PAS, etionamida, capreomicina, aminoglicosídeos, e fluoroquinolonas.

O tratamento tem muitas vezes uma grande dificuldade que é o aparecimento de espécies resistentes à terapêutica utilizada, pois poderá ter sido realizada uma terapêutica inadequada. Estas resistências poderão ser de três tipos:

- Monorresistente quando há resistência a um só antibiótico de primeira linha;
- Multirresistente quando há resistência a dois antibióticos de primeira linha (essencialmente a isoniazida e rifampicina);
- Extensivamente resistente onde as estirpes são resistentes à rifampicina, à isoniazida, a qualquer fluoroquinolonas e a alguns antibióticos de segunda linha (capreomicina, canamicina ou amicacina)

Na última década, os casos de resistência aos antibióticos de primeira linha tiveram um aumento significativo, representando assim uma grande ameaça para a saúde pública.

Um dos primeiros antibióticos a ser utilizado na terapêutica foi a estreptomicina, pois tinha uma taxa de sucesso bastante elevada e com um tempo de tratamento relativamente curto. Apesar de ser um tratamento eficaz, alguns casos começaram a obter resistências à estreptomicina e a ter recaídas, concluindo assim que a monoterapia não era eficaz para o tratamento e que provocou resistências nos primeiros casos (Howard *et al.*, 2003).

Existem estirpes de TB que nunca tiveram expostas a antibióticos antituberculosos, apesar disso verificou-se que algumas populações já tinham uma resistência espontânea aos antibióticos (Curry, 2008):

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

- $3,8 \times 10^{-6}$ são resistentes à estreptomicina.

Estudos realizados comprovaram que a lesão da cavidade pulmonar consegue alojar cerca de 1×10^6 a 1×10^9 bacilos, assim, a utilização de um só antibiótico no tratamento faz com que os bacilos aumentem a sua resistência, juntamente com erros médicos associados na prescrição do tratamento de monoterapia e ao incumprimento da terapêutica por parte dos doentes (duração do tratamento e posologia) (Howard *et al.*, 2003, Loddenkemper *et al.*, 2002).

Através da monoterapia, só os bacilos suscetíveis vão ser combatidos, ficando os resistentes originando novos efeitos adversos e um insucesso da terapêutica. (Curry, 2008).

A tuberculose multirresistente aparece devido a falhas no controlo, falta de recursos financeiros ou identificação tardia de estirpes, mas principalmente à resistência de estirpes à rifampicina e à isoniazida.

1. Antibióticos de primeira linha

i. Isoniazida

A isoniazida é um dos mais importantes fármacos no tratamento da tuberculose e começou a ser utilizada desde 1952. Tem estrutura simples, constituída de um anel piridina e um grupo hidrazida, e sua concentração inibitória mínima (MIC) para o *Mbt* varia de 0,02-0,20 $\mu\text{g/mL}$ (Arbex *et al.*, 2010a).

Tem função bactericida sobre os bacilos de multiplicação rápida, mas tem ação restrita sobre os bacilos de crescimento lento (geralmente intracelulares) e aqueles de multiplicação intermitente (geralmente extracelulares).

No que diz respeito ao seu mecanismo de ação é um pró-fármaco que precisa de ser ativado pela enzima peroxidase/catálase (KatG) do *Mbt*, produzindo radicais reativos de oxigénio (superóxido, peróxido de hidrogénio e peroxinitrato) e radicais orgânicos que vão inibir a formação de ácido micólico da parede celular, causando dano ao DNA e conseqüentemente a morte do bacilo. O mecanismo mais comum de resistência à

isoniazida consiste em mutações na KatG, que diminui a sua atividade, impedindo a conversão do pró-fármaco em metabolito ativo (Sousa, 2006; Zhang e Yew, 2009).

Existem diversos tipos de mutações na KatG, mas em particular ocorre uma mutação em Ser315Thr que está presente em 40% das espécies resistentes à isoniazida. A mutação que ocorre faz com que a enzima não tenha capacidade para ativar a isoniazida, contudo a catalase/peroxidase ainda consegue obter 50% da sua atividade. Logo, quando há alterações nesta enzima (catalase/peroxidase) vai ocorrer um elevado nível de resistência à isoniazida, permanecendo livre as espécies reativas, pois vai ocorrer uma proteção contra o stresse oxidativo (Rouse *et al.*, 1996; Zhang e Yew, 2009).

A isoniazida tem o poder de inibir também outra enzima envolvida na síntese dos ácidos micólicos, a enzima β -cetoacil-ACP sintase codificada pelo gene *Kasa*. Esta enzima tem como função a elongação das cadeias dos ácidos micólicos fazendo parte da sua síntese. Podem ocorrer mutações na região promotoras dos genes que codificam estas enzimas, fazendo com que estas não tenham resposta (Swanson *et al.*, 2009).

ii. Rifampicina

A rifampicina é o fármaco mais importante no tratamento da tuberculose. É utilizada desde 1966 como antibiótico e a MIC para o *Mbt* é de 0,05-0,50 $\mu\text{g/mL}$. É um fármaco bactericida que atua no bacilo em crescimento e metabolicamente ativo e na fase estacionária, com metabolismo reduzido, tendo também o poder de atuar no *Mbt* em estado de dormência (menor atividade metabólica). Estas características e sua associação com a pirazinamida permitem o encurtamento no tratamento da TB para seis meses (Arbex *et al.*, 2010a).

A rifampicina inibe a transcrição génica da micobactéria por bloqueio do RNA polimerase, o que impede a síntese do RNA mensageiro (RNAm) e de proteína pelo bacilo, produzindo morte celular. A resistência à rifampicina ocorre devido à mutação do gene *rpoB*, que codifica a cadeia beta da RNA polimerase. 96%, aproximadamente, das estirpes que são resistentes à rifampicina contêm uma mutação na região dos 81 par de bases. Esta região pode ser determinante para a deteção rápida à rifampicina e/ou TBMR, pois é denominada por ser a região determinante de resistência à rifampicina (Cohen *et al.*, 2009; Somoskovi *et al.*, 2001; Sousa, 2006).

É uma molécula lipofílica, permitindo que o fármaco atravesse a parede celular e atinja elevadas concentrações intracitoplasmáticas nos fagócitos.

A resistência mais frequente a esta molécula é em associação à isoniazida (a monorresistência é muito rara). Esta associação serve para a identificação da TBMR, sendo utilizada como marcador substituto (Afanas'ev *et al.*, 2007; Somoskovi *et al.*, 2001).

iii. Pirazinamida

A pirazinamida é um derivado do ácido nicotínico, com estrutura molecular similar à da isoniazida, mas sem resistência cruzada com a mesma. O fármaco foi sintetizado em 1936 e é utilizada como tuberculostático desde 1952 (Arbex *et al.*, 2010a).

A MIC para o *Mbt* varia de 6,25-50,0 µg/mL em pH = 5,5. É bem absorvida após a administração oral e distribui-se amplamente em todo o organismo. Atinge a concentração máxima plasmática em duas horas. É uma molécula com atividade bactericida e tem uma maior ação esterilizante contra microorganismos intracelulares do que os microorganismos extracelulares, principalmente em meio ácido no interior dos macrófagos e em áreas de inflamação aguda (Arbex *et al.*, 2010a).

Na lesão pulmonar, os bacilos fagocitados pelos macrófagos apresentam o seu crescimento inibido pelo ambiente ácido do interior dos fagolisossomas. O crescimento também se encontra inibido nas zonas inflamatórias da parede cavitária pelo pH ácido. Esses bacilos, denominados persistentes e em fase de multiplicação esporádica, são os responsáveis pela recaída bacteriológica da tuberculose. A pirazinamida é o medicamento mais eficaz para eliminar essa população.

É um pró-fármaco, que como a isoniazida, também necessita ser convertida por enzimas bacterianas (nicotinamidase/pirazinamidase) codificadas pelo gene *pncA* na forma ativa, o ácido pirazinóico (Sousa, 2006).

O mecanismo de ação da pirazinamida (Figura 12) ainda não está bem esclarecido. Supõe-se que a pirazinamida entre no bacilo de forma passiva passando o citoplasma neutro e seja convertida em ácido pirazinóico neutro pela pirazinamidase, que não possui atividade antibacteriana. A molécula é excretada através de um sistema de efluxo

para o exterior da célula, convertendo o ácido pirozinóico na sua forma protonada. O acúmulo de ácido pirazinoico diminui o pH intracelular, inativando algumas enzimas, como por exemplo a produção de ácidos gordos e, em consequência, prejudicando a biossíntese do ácido micólico. A resistência à pirazinamida decorre de mutações no gene *pncA*, que codifica a enzima nicotinamidase/pirazinamidase e impede a conversão da pirazinamida para a forma ativa (Arbex *et al.*, 2010a).

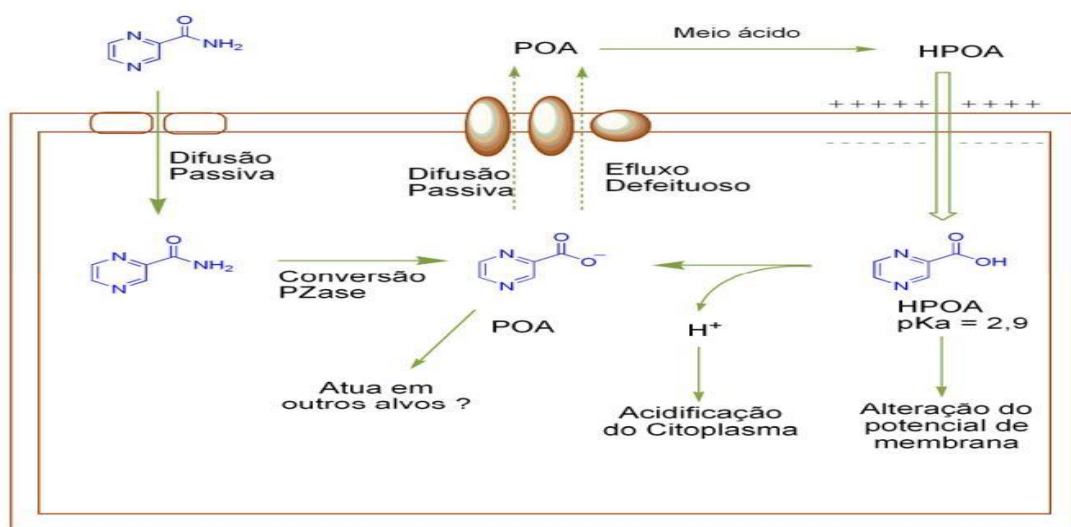


Figura 12 – Mecanismo de ação da pirazinamida (Adaptado de Lima *et al.*, 2011)

Vários estudos ao longo dos tempos têm demonstrado perda da atividade da enzima pirazinamidase devido há associação com a resistência à pirazinamida. A resistência a pirazinamida deve-se principalmente a mutações no gene *pncA*. (Zhang e Mitchison, 2003).

As mutações a nível desta molécula estão relacionadas com a substituição de aminoácidos, podendo ocorrer inserções e deleções de nucleótidos, dispersando-se ao longo do gene *pncA*.

Com a ocorrência de tantas mutações a nível do gene *pncA*, pode afirmar-se que ele não é essencial à vida da micobactéria. Podem surgir vários tipos de mutações e surgindo esta possibilidade, a pirozinamidase é dispensável, não interferindo com a virulência da micobactéria (Zhang e Mitchison, 2003).

iv. Etambutol

O etambutol é uma molécula que foi sintetizada em 1961 e começou a ser utilizado no tratamento da tuberculose desde 1966.

Atua sobre os bacilos intra e extracelulares, principalmente nos de multiplicação rápida. O MIC para o *Mbt* é de 1-5 µg/mL. Tem uma ação bacteriostática nas doses usuais, sendo ativo apenas contra bactérias em crescimento (Arbex *et al.*, 2010a).

O etambutol interfere na biossíntese de arabinogalactano, principal polissacarídeo da parede celular do BK. Conseqüentemente vai inibir a enzima arabinosil transferase codificada pelo gene *embB*, responsável pela polimerização de arabinose para arabinogalactano. A resistência ao etambutol *in vitro* desenvolve-se de maneira lenta e provavelmente acontece por mutação do gene *embB* (Hazbon *et al.*, 2005; Sousa, 2006).

Estudos realizados vieram comprovar que esta molécula contém três genes no operão, gene *embA*, gene *embB* e o gene *embC*, formando o gene *embCAB*.

O operão *embCAB* está diretamente envolvido com a resistência ao etambutol. As mutações presentes no codão 306 do gene *embB* surgem em cerca de 30 a 65% dos casos de estirpes resistentes e como tal, este gene tem sido utilizado para comprovar e identificar estirpes resistentes ao etambutol. Contudo, um estudo realizado indicou que uma mutação no gene *embB306* não é suficiente para ocorrer produção de estirpes com MIC elevado, tendo que existir diversas etapas para provocar mutações de forma a obter elevados níveis de resistência. Esta mutação tem conseqüências graves pois pode afetar a suscetibilidade de antibióticos como a isoniazida e a rifampicina contribuindo para a formação de estirpes multirresistentes (TBMR) (Safi *et al.*, 2008).

2. Antibióticos de segunda linha

Depois de analisados os antibióticos de primeira linha, percebe-se que são antibióticos com diversas mutações nos seus genes e que quando são utilizados durante um longo período de tempo criam estirpes resistentes. Para contornar estas resistências são utilizados os antibióticos de segunda linha. Assim, a tuberculose multirresistente é aquela que apresenta resistência à isoniazida e à rifampicina ou à rifampicina, isoniazida e outro antibiótico de primeira linha (Arbex *et al.*, 2010b).

i. Ácido para-aminossalicílico (PAS)

O PAS é utilizado como tuberculostático desde 1946. A partir de 1955 e por quase 15 anos, o ácido para-aminossalicílico foi considerado como fármaco de primeira linha num esquema que associava isoniazida e estreptomicina. Foi descontinuado pouco tempo depois devido aos diversos efeitos adversos e à introdução da rifampicina e pirazinamida no tratamento. Com o aparecimento de diversos casos de TBMR, o PAS foi novamente introduzido na terapêutica no ano de 1992. É utilizado como ácido ou como sal de sódio. É bacteriostático e a MIC para o *Mbt* é de 1 µg/mL. Esta molécula atua preferencialmente nos bacilos extracelulares (Arbex *et al.*, 2010b).

O PAS tem semelhanças estruturais com as sulfonamidas. As sulfonamidas são análogas estruturais do ácido para-aminobenzóico (o substrato da dihidropteroato (codificado por FP1 / FP2)) e, por consequente, funciona como inibidor competitivo da enzima. A enzima FolP1 e seu homólogo FolP2 catalisam a condensação do ácido para-aminobenzóico e 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfato a 7,8-dihidropteroato, que é convertido em di-hidrofolato e reduzida para gerar o cofator tetrahidrofolato (THF) pela enzima di-hidrofolato redutase (codificado por *dfrA*) na via metabólica do ácido fólico (Figura 13) (Mathys *et al.*, 2009).

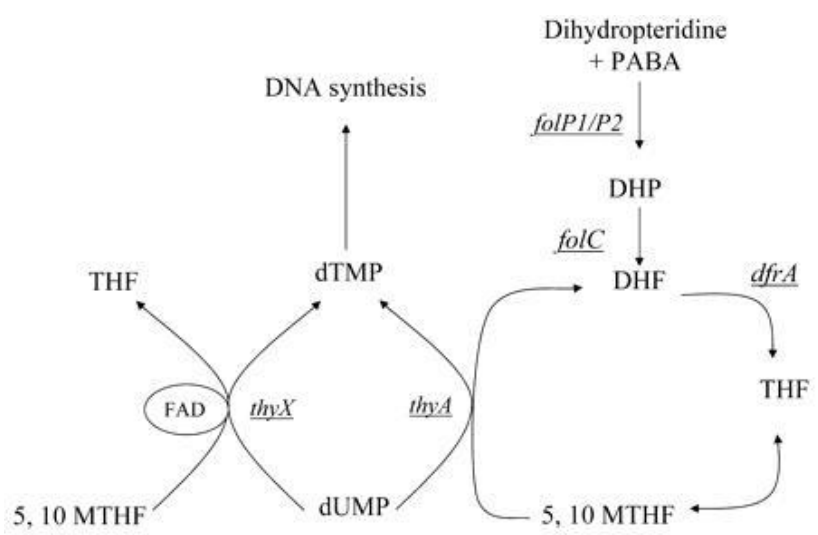


Figura 13 – Via metabólica do ácido fólico (Mathys *et al.*, 2009)

Este antibiótico só se encontra ativo na presença da enzima ThyA sendo assim considerado um pró-fármaco.

O aparecimento de resistências a este antibiótico apareceu devido a alterações de genes, nomeadamente nos genes *thyA*, *dfrA*, *folC*, *folP1*, e o *folP2*, que codificavam enzimas essenciais na via metabólica do ácido fólico. Com a alteração tridimensional das enzimas, não vai haver ligação do PAS a estas, ocorrendo as mutações (Mathys *et al.*, 2009).

Um estudo revelou que a maioria dos casos de resistência ao PAS está associada a mutações do gene *thyA* que codifica a enzima timidilato-sintase A, sendo esta enzima muito importante para a biossíntese de timina pela via metabólica do ácido fólico (Rengarajan *et al.*, 2004).

ii. Etionamida

A etionamida é utilizada no tratamento da tuberculose desde 1956 como antibiótico de segunda linha. Atua nos bacilos intra e extracelulares. A MIC para o *Mbt* é 0,6-2,5 µg/mL. Nas doses usuais, é um fármaco bacteriostático (Arbex *et al.*, 2010b).

É um pró-fármaco inativo com estrutura análoga à isoniazida, porém sem resistência cruzada com a mesma, e necessita ser ativada pela enzima bacteriana EthA, uma monoxigenase contendo FAD.

Estudos revelam a existência de dois genes para a ativação da molécula, o gene *EthA* e o gene *EthR*. A resistência à etionamida é devido a alterações genéticas na EthA, estirpes resistentes à isoniazida por alterações do gene *katG* (enzima catalase/peroxidase) permanecem sensíveis à etionamida, indicando que as enzimas responsáveis pela ativação da isoniazida e da etionamida são diferentes. A expressão do gene *EthR* resulta da formação da enzima repressora que tem como função regular o gene *EthA*. Um aumento da expressão do gene EthR leva à resistência da etionamida, por outro lado, se ocorrer uma inibição da expressão vai originar um nível de sensibilidade maior à etionamida (Dover *et al.*, 2004; Morlock *et al.*, 2003).

Quando a isoniazida é ativada produz um radical acilo isonicotínico que vai reagir com NADH formando um inibidor competitivo da InhA. Apesar de os mecanismos de inibição diferirem, o resultado é o mesmo: inibição da síntese proteica, impedindo a biossíntese do ácido micólico com o comprometimento da membrana celular bacteriana.

Num estudo realizado foi verificado que a enzima EthA é bi-funcional capaz de transformar a etionamida em S-óxido (ETH-SO) e hidróxido (ETH-OH), sendo estes libertados para o meio extracelular (Vannelli *et al.*, 2002).

O ETH-SO é tóxico para as micobactérias e sua MIC varia de acordo com os níveis de EthA na célula bacteriana. Neste mesmo estudo verificou-se que a enzima EthA tem capacidade em transformar, *in vitro*, o ETH-SO noutro metabolito que possui igual toxicidade (ETH) (Figura 14) (Vannelli *et al.*, 2002).

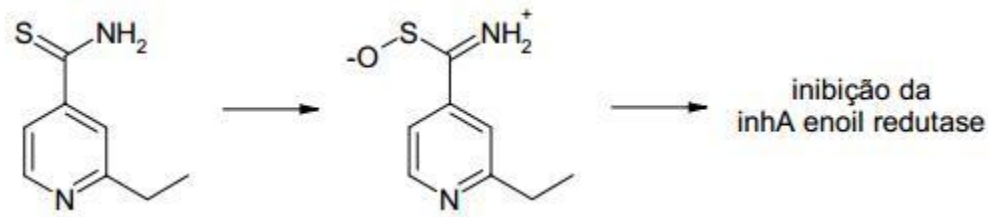


Figura 14 – Mecanismo de ação da etionamida (Lemke, 2002)

As mutações na enzima EthA fazem com que haja resistência à etionamida. Outras mutações que poderão ocorrer leva à resistência cruzada com a isoniazida, principalmente mutações na enzima InhA ou na região promotora aumentando a expressão do gene *inhA*, levando a uma maior quantidade da enzima no interior da célula (Lemke, 2002)

iii. Capreomicina

A capreomicina é um antibiótico polipeptídico obtido através do *Streptomyces capreolus* e utilizado como tuberculostático desde 1959. A MIC para o *Mbt* é de 10 µg/mL (Arbex *et al.*, 2010b).

A capreomicina possui estrutura química diferente dos aminoglicosídeos, mas existe uma grande semelhança com relação à atividade antibacteriana e aos efeitos adversos. Não expõe reação cruzada com estreptomicina, mas pode apresentar reação cruzada com algumas estirpes resistentes a amicacina e canamicina (Arbex *et al.*, 2010b).

O mecanismo de ação é pouco conhecido. Pensa-se que atua de igual modo aos aminoglicosídeos. *In vitro*, vai inibir a síntese de fenilalanina interferindo com a tradução mas não com a ligação do RNA mensageiro ao ribossoma.

As resistências que poderão aparecer são ao nível de mutações que ocorrem no gene *thyA*. Este gene vai codificar a enzima rRNA metiltransferase essencial à metilação da ribose em rRNA. Outra resistência que pode ocorrer será a resistência cruzada entre a capreomicina e os aminoglicosídeos quando à mutação no gene *rrs* que confere resistência à capreomicina (Maus *et al.*, 2005).

iv. Aminoglicosídeos

No grupo dos aminoglicosídeos está inserido a estreptomicina, a canamicina e a amicacina.

A estreptomicina foi isolada em 1944 e foi o primeiro fármaco eficaz empregado no tratamento da TB. A canamicina foi sintetizada em 1957, e a amicacina é um composto semissintético derivado da canamicina, sendo utilizada desde 1972 (Arbex *et al.*, 2010b).

Os aminoglicosídeos têm ação intracelular irrelevante, atuando sobre o bacilo extracelular. A MIC da estreptomicina, canamicina e amicacina para o bacilo da tuberculose é de, respetivamente, 4-8 µg/mL, 1-8 µg/mL e 0,5-1,0 µg/mL (Arbex *et al.*, 2010b).

São fármacos bactericidas, e a sua ação e concentração é mínima, ou seja, tem efeito bactericida mesmo com a concentração sérica abaixo da MIC. Não tem sido descrita a resistência cruzada entre amicacina e canamicina, nem entre esses dois fármacos e estreptomicina (Arbex *et al.*, 2010b).

Os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica ao ligar-se de maneira irreversível à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, interferindo na integridade da membrana celular, diretamente com a sua tradução. A resistência surge por mutações no gene *rrs*, que codifica o 16S RNA ribossomal, e no gene *rpsL*, que codifica o gene da proteína ribossomal S12.

Estudos revelaram um mecanismo de resistência à canamicina. Consiste em mutações pontuais na região promotora do gene *eis*, sendo este responsável por manter o meio intracelular da micobactéria vivo. As mutações ocorrentes na região promotora vão provocar um aumento de expressão do gene *eis* e aumentar os níveis da enzima que inativa a canamicina. Estirpes com esta mutação são suscetíveis à amicacina. A resistência cruzada entre estes dois fármacos é inexistente pois a amicacina possui um grupo amida L-hidroxiaminobuteriol de substituição na posição N1 do anel desoxistreptamina, que dificulta a acetilação pela enzima Eis (Zaubrecher *et al.*, 2009).

v. Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas têm sido utilizadas como fármacos de reserva no tratamento da tuberculose desde 1985. Entretanto, estudos recentes com as fluoroquinolonas de terceira e quarta geração (levofloxacin, moxifloxacin e gatifloxacin) demonstram um grande potencial e uma grande alternativa para as estirpes de *Mbt* resistentes a antibióticos de primeira linha. Após a administração, distribuem-se amplamente pelo organismo, atingindo o interior das células, incluindo os macrófagos (apresentam elevada lipossolubilidade), explicando, assim, a grande atividade sobre as micobactérias intracelulares (Arbex *et al.*, 2010b).

As fluoroquinolonas são bactericidas e apresentam fármacos com diversos graus de atividade contra o *Mbt*. As mais efetivas são moxifloxacin e gatifloxacin, seguindo-se a levofloxacin, ofloxacin e ciprofloxacina. Estes antibióticos não apresentam resistências cruzadas com outros tipos de antibióticos.

O seu mecanismo de ação consiste em inibir a atividade da DNA girase ou da topoisomerase II bacteriana, que regula a topologia do DNA e é essencial à sobrevivência da bactéria. Contem duas subunidades importantes para o funcionamento da enzima. A subunidade A que contem um centro ativo para o desdobramento, rutura e junção do DNA e a subunidade B que promove a hidrólise do ATP, sendo estas subunidades codificadas pelos genes *gurA* e *gyrB*, respetivamente (Von Groll *et al.*, 2009).

A resistência bacteriana ocorre rapidamente quando o fármaco é utilizado como monoterapia ou quando acrescentado a terapêuticas falhadas. Três mecanismos principais explicam a resistência (Ginsburg *et al.*, 2003).

- a) Mutação na enzima DNA girase, que deixa de ter a ação do antibiótico;
- b) Alteração na membrana celular da bactéria, tornando-se impermeável às fluoroquinolonas, havendo uma diminuição da difusão do fármaco para o interior da célula;
- c) Existência de um mecanismo de efluxo que retira o fármaco do interior da célula bacteriana.

XI. NOVOS FÁRMACOS

Devido a existirem diversas mutações que provocam resistências aos antibióticos, tem que se estruturar novas estratégias de tratamento para conseguir combater com maior eficácia o *Mbt*. Novas moléculas foram estudadas ao longo da última década, manipulando fármacos existentes de maneira a aumentar a eficácia e diminuir a toxicidade no tratamento.

1. Bedaquilina TMC207 (ou R207910)

Este fármaco foi aprovado em 2012 pela agência americana do medicamento (FDA) e destina-se ao tratamento da TBMR em associação a outros fármacos antituberculosos, pois o esquema recomendado (amicacina-etionamida-moxifloxacino-pirazinamida) demonstrou-se muito mais eficaz do que a não associação, havendo conversão da cultura em todos os casos aliviados em dois meses. Tem como mecanismo de ação a inibição da enzima ATP sintase diminuindo, assim, a probabilidade de transmissão da infecção. Desta forma, vai diminuir o tempo de conversão de um exame cultural positivo para um exame negativo, sendo a amostra a expectoração (Rubinstein e Keynan, 2013; WHO, 2013).

2. Nitroimidazóis

Dentro deste grupo de fármacos insere-se o PA-824 e o OPC-67683 ou delamanida. O Pa-824 precisa de ser ativo pela enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (FDGI) ou pela sua coenzima F_{420} . Tem como mecanismo de ação a inibição dos lípidos da parede celular, apesar de não haver resistência cruzada com outros fármacos, existem mutações nos genes *fbiA*, *fbiB* e *fbiC* (genes responsáveis pela síntese da coenzima F_{420}) que vão conferir resistência ao PA-824. Este fármaco tem demonstrado elevada eficácia em infecções no estado latente. (van den Boogaard *et al.*, 2009, Ma *et al.*, 2010). Relativamente ao OPC-67683 ou delamanida, esta inibe a síntese de ácidos micólicos e apresenta melhor atividade esterilizante que a isoniazida. É um fármaco muito potente *in vitro* contra o *Mbt* e estirpes resistentes, havendo uma maior eficácia no tratamento

associado a antibióticos de primeira linha, inclusive com uma redução do tempo de tratamento em dois meses (Cezar *et al.*, 2009).

Os fármacos deste grupo não apresentam interações significativas no citocromo P450, podendo ser administrados numa toma única diária por via oral.

3. SQ-109

É um fármaco derivado do etambutol, mas este composto tem diferenças a níveis do mecanismo de ação e em termos de tolerância, uma vez que este é mais bem tolerado do que etambutol tendo a possibilidade de o substituir. O SQ-109 liga-se a um transportador transmembranar que impede a ligação do ácido micólico como arabinagalactano da parede celular, fazendo com que não haja interferências na síntese dos ácidos micólicos (Tahlan *et al.*, 2012).

4. Oxazolidinonas

A linezolida é o principal fármaco deste grupo. Tem a capacidade de inibir a síntese proteica através de uma ligação à subunidade 50S ribossomal, concretamente, ao centro peptidiltransferase, bloqueando a ligação da tRNA ao ribossoma. Este fármaco é associado a outros fármacos para o tratamento da TBMR e da TBXDR. Consequentemente, tem bastantes efeitos adversos principalmente neurotoxicidade e mielosupressão. É notória a eficácia deste fármaco, mas têm sido descritos casos de resistência. Estes casos devem-se a mutações no gene *rplC* que codifica proteínas ribossomais (Beckert *et al.*, 2012, Ma *et al.*, 2010).

Existe também o PNU-100480, que é um análogo da linezolida. Este fármaco tem uma grande atividade contra a TBMR do que a linezolida, pois expõe um MIC 3,2 vezes inferior (Alffenaar *et al.*, 2011).

O AZD-5847 também está presente neste grupo e é dos que apresenta menor toxicidade para a eficácia demonstrada (Grosset *et al.*, 2012).

XII. CONCLUSÃO

Apesar da diminuição em Portugal, a Tuberculose Multirresistente apresenta uma taxa de mortalidade elevada, mas menor do que a Tuberculose que continua, com o passar dos anos, a aumentar a nível mundial.

O diagnóstico ideal para a identificação de *Mycobacterium tuberculosis* é aquele que se realiza diretamente na amostra, reduzindo assim o tempo dos exames culturais. Novas técnicas têm sido estudadas de modo a que o diagnóstico da tuberculose multirresistente seja mais rápido, sensível, e específico. No entanto os custos poderão ser elevados, o que não permite que os países com poder socioeconómico baixo os adquiram (onde a prevalência da doença é bastante elevada).

A Tuberculose Multirresistente tornou-se uma das ameaças maiores de tuberculose devido a tratamentos e adesões falhadas. Os fármacos utilizados são normalmente menos eficazes (devido as resistências), mais dispendiosos e mais tóxicos. O seu tratamento apresenta um tempo de duração maior, um custo mais elevado, que faz com que não haja adesão ao tratamento por parte do paciente. Com este problema visível, o tratamento desta doença apresenta poucas alternativas uma vez que quase todos os fármacos novos estudados e aprovados exibem casos resistências.

A indústria farmacêutica tem estudado novos fármacos (Bedaquilina por exemplo) promissores capazes de combater estirpes multirresistente do *Mbt* e novos locais alvo desenvolvendo assim novas moléculas. Os novos fármacos têm apresentado resultados bastante positivos, pois são testados em locais que ainda não foram explorados por outros fármacos.

Por último, também é importante combater os obstáculos socioeconómicos dos diferentes países para que se possa diminuir o risco da doença, garantido que todas as populações tenham acesso às terapias propostas.

XIII. BIBLIOGRAFIA

Afanas'ev, M. V. *et al.* (2007). Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazidresistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation. *J Antimicrob Chemother*, 59, pp. 1057-1064.

Alffenaar, J. W. *et al.* (2011). Susceptibility of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates to a potentially less toxic derivate of linezolid, PNU-100480. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, pp. 1287-1289.

Antunes, A. F. (2011). Ponto da Situação Epidemiológica e de Desempenho. *Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose*, pp. 5-7.

Arbex, M. A. *et al.* (2010a). Fármacos antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 1: fármacos de primeira linha. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 36, pp. 626-640.

Arbex, M. A. *et al.* (2010b). Fármacos antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 2: fármacos de segunda linha. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 36, pp. 641-656.

Aziz, M. A. *et al.* (2006). Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis. *Lancet*, 368, pp. 2142-2154.

Barroso, E. C., Mota, R. e Morais, M. (2003). Factores associados aos tratamentos inadequados em grupo de portadores de tuberculose multirresistente. *Jornal pneumologia*, 29(6), pp. 350-357.

Beckert, P. *et al.* (2012). rplC T460C identified as a dominant mutation in linezolidresistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, pp. 2743-2745.

Bento, J. *et al.* (2011). Métodos diagnósticos em tuberculose. *Acta Médica Portuguesa*, 24, pp. 145-154.

Blumberg, H. M. e Leonard, M. K. (2006). Tuberculosis. *ACP Medicine*, pp.1-22.

Bombarda, S. *et al.* (2001). Imagem em tuberculose pulmonar. *Jornal de Pneumologia*, 27, pp. 329-340.

Campos, S. H. (2006a). Tuberculosis: etiopathogenesis and clinical presentations. *Pulmão RJ*, 15(2), pp. 92-99.

Campos, S. H. (2006b). Diagnóstico da Tuberculose. *Pulmão RJ*, 15(2), pp. 92-99.

Cantaloube, S. *et al.* (2011). The Mycobacterium Tuberculosis FAS-II Dehydratases and Methyltransferases Define the Specificity of the Mycolic Acid Elongation Complexes. *PLoS ONE*.

CDC. (2013). Introduction to the Core Curriculum on Tuberculosis. Division of Tuberculosis Elimination, 6^oed., pp. 21-39.

Cezar, M.C., Guerra, R.L. e Conde, M.B. (2009). Novos fármacos no tratamento da tuberculose. *Pulmão RJ*, 18(1), pp. 23-26.

Cohen, K. *et al.* (2009). Effect of rifampicin-based antitubercular therapy and the cytochrome P450 2B6 516G>T polymorphism on efavirenz concentration in adults in South Africa. *International Medical Press*, 14, pp. 687-695.

Curry, F. J. (2008). *Drug-Resistant Tuberculosis: A Survival Guide for Clinicians, Second Edition*, pp. 2-122

Dalcolmo, P. M., Andrade, N. K. M. e Picon, D. P. (2007). Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. *Rev Saúde Pública*, 41, pp. 34-42.

De Chastellier, C. (2009). The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages. *Immunobiology*, 214, pp. 526-542.

Diaz-Infantes, M. S., *et al.* (2000). Evaluation of the MB/BacT mycobacterium detection system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 38, pp. 1988-1989.

Dover, L. G. *et al.* (2004). Crystal structure of the TetR/CamR family repressor Mycobacterium tuberculosis EthR implicated in ethionamide resistance. *J Mol Biol*, 340, pp. 1095-1105.

Duarte, R. *et al.* (2010a). Abordagem terapêutica da tuberculose e resolução de alguns problemas associados à medicação. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 16, pp. 559-572.

Duarte, R. *et al.* (2010b). Tratamento da tuberculose de infecção latente: As recomendações actuais. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 16, pp. 809-814.

Ferreira, A. e Ávila, S. (2001). *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Ferreira, W e Sousa, J (2000). *Microbiologia, Volume 2*, Lisboa, Lidel, edições técnicas,Lda.

Ginsburg, A.S., Grosset, J.H. e Bishai, W.R. (2003). Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect Dis*. 3(7), pp. 432-442.

Gomes, A. A. (2002). Manual técnico para o controle da tuberculose: cadernos de atenção básica, Brasília, Secretaria série A. Normas e Manuais Técnicos 6. ed. rev. e atual., 6, pp. 4-64.

Gomes, C. (2008). As 15 recomendações para a gestão da tuberculose multirresistente. *Direção Geral de Saúde*, pp. 4-20.

Granich, R. *et al.* (2005). Multidrug resistance among persons with tuberculosis in california. *JAMA*, 293(22), pp. 2732-2739.

Grosset, J. H. *et al.* (2012). New drugs for the treatment of tuberculosis: hope and reality. *Int J Tuberc Lung Dis*, 16, pp. 1005-1014.

Hannan, M. M. *et al.* (2001). Investigation and control of a large outbreak of multi-drug resistant tuberculosis at a central Lisbon hospital. *Journal of Hospital Infection*, 47, 91-97.

Hawkins, B. R., *et al.* (1988). HLA typing in the Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council study of factors associated with the breakdown to active tuberculosis of inactive pulmonary lesions. *Am Rev Respir Dis*, 138, pp. 1616-1621.

Hazbon, M. H. *et al.* (2005). Role of embB codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, pp. 3794-3802.

Howard, D. H. *et al.* (2003). The global impact of drug resistance. *Clin Infect Dis*, 36, pp. 4-10.

Huggett, J. F. *et al.* (2003). Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35, pp. 1407-1412.

Iseman, M. D. (1993). Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 329, pp. 784-791.

Jain, A. e Dixit, P. (2008). Multidrug resistant to extensively drug resistant tuberculosis: What is next? *Journal of Biosciences*, 33, pp. 605-616.

Jankute, M. *et al.* (2012). Arabinogalactan and lipoarabinomannan biosynthesis: structure, biogenesis and their potential as drug targets. *Future Microbiol*, 7, pp. 129-147

Jou, N. T. *et al.* (1997). Single-tube, nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 35, pp. 1161-1165.

Kapadiya, B., Raval, N. B. e Patel, V. (2009). MDR and XDR Tuberculosis. *Gujarat Medical Journal*, 64(2), pp. 19-24

Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L. e Loscalzo, J. (2008). *Harrison's principles of internal medicine*. 18th ed., New York, McGraw-Hill Medical Publishing Division, 1, pp. 1340-1354.

Knechel, A. N. (2009). Tuberculosis: Pathophysiology, Clinical Features, and Diagnosis. *Critical Care Nurse*, 29, pp. 34-43

Lemke, T. L. (2002). Antimycobacterial agents in: Williams, D.A. e Lemke, T.L., eds. *Foye's principles of medicinal chemistry*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, pp. 904-923.

Levy, S. (2012). The evolution of tuberculosis. *BioScience*, 62, pp. 625-625.

Lima, C. H. S., Bispo, M. L. F. e de Souza, M. V. N. (2011). Pyrazinamide: An Essential Drug in the Tuberculosis Treatment. *Rev. Virtual Quim.* 3(3), pp. 159-180.

Ling, D. I. *et al.* (2008). Commercial Nucleic-Acid Amplification Tests for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Respiratory Specimens: Meta-Analysis and Meta-Regression. *PLoS ONE*.

Loddenkemper, R., Sagebiel, D. e Brendel, A. (2002). Strategies against multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J suppl*, 20, 67-75.

Ma, Z. *et al.* (2010). Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *Lancet*, 375, pp. 2100-2109.

Mathys, V. *et al.* (2009). Molecular genetics of para-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates and spontaneous mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, pp. 2100-2109.

Maus, C. E. *et al.* (2005). Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, pp. 571-577.

Micobacterias y “tuberculosis”. [Em linha]. Disponível em <http://www.fcq.uach.mx/phocadownload/Academico/Material_de_Estudio/micobacterias/diagnostico/diagnostico.html>. [Consultado em 20/07/2014].

Ministério da Saúde. (2010). Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose-Ponto da Situação Epidemiológica e de desempenho. Direção Geral de Saúde, pp. 4-18.

Ministério da Saúde. (2013). Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose Ponto da Situação Epidemiológica e de Desempenho (dados provisórios). Direção Geral de Saúde, pp. 3-13.

Molle, V. *et al.* (2010). Phosphorylation of *InhA* inhibits mycolic acid biosynthesis and growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 78, pp. 1591- 1605.

Morlock, G. P. *et al.* (2003). *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, pp. 3799-3805.

National collaborating centre for chronic conditions. (2006). Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. *Royal college of physicians*, London.

Ormerod, P.L. (2005). Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): epidemiology, prevention and treatment. *British Medical Bulletin*, pp.17-24.

Rastogi, N. *et al.* (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech*, 20, pp. 21-54.

Rengarajan, J. *et al.* (2004). The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Mol Microbiol*, 53, pp. 275-282.

Rocha, J.L. *et al.* (2008). Tuberculose multirresistente. *Pulmão RJ*, 17(1), pp. 27-32.

Rodrigues, C.S. *et al.* (2007). Use of bactec 460 TB system in the diagnosis of tuberculosis. *Indian Journal of Microbiology*, 25(1), pp. 32-36.

Rouse, D. A. *et al.* (1996). Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol Microbiol*, 22, pp. 583-592.

Rubinstein, E. e Keynan, Y. (2013). Quinolones for mycobacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*, 42, pp. 2-4.

Russell, D. G. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol*, 5, pp. 39-47.

Safi, H. *et al.* (2008). Transfer of embB codon 306 mutations into clinical Mycobacterium tuberculosis strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, pp. 2027-2034.

Seeley, R., Stephens, T., Tate, P. (2001). Aparelho respiratório. *In: Lusociência-Edições Técnicas E Científicas, L. (Ed.) Anatomia & Fisiologia. 6ª edição ed.*, pp. 791-793.

Singh, P. e Kant, L. (2002). What is new in the Diagnosis of Tuberculosis? Part I: Techniques for diagnosis of Tuberculosis. *Indian Council of Medical Research*, 32, pp. 1-8.

Somoskovi, A. *et al.* (2001). The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. *Respir Res*, 2, pp. 164-168.

Sousa, J. (2006). Manual de Antibióticos Antibacterianos. Porto. Edições Universidade Fernando Pessoa. 2º Ed., pp 639-660.

Souza, M. B. D., Antunes, C. M. D. F. e Garcia, G. F. (2006). Perfil de sensibilidade e fatores de risco associados à resistência do Mycobacterium tuberculosis, em centro de referência de doenças infecto-contagiosas de Minas Gerais. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 32, pp. 430-437.

Swanson, S. *et al.* (2009). KasA, Another Brick in the Mycobacterial Cell Wall. *Structure*, 17, pp. 914-915.

Tahlan, K. *et al.* (2012). SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, pp. 1797-1809.

Theron, G. *et al.* (2012). The use of an automated quantitative polymerase chain reaction (Xpert MTB/RIF) to predict the sputum smear status of tuberculosis patients. *Clin Infect Dis*, 54, pp. 384-388.

Todar's Online Text Book of Bacteriology. (2012). [Em linha]. Disponível em <<http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>>. [Consultado em 6/08/2014].

Van Den Boogaard, J. *et al.* (2009). New drugs against tuberculosis: problems, progress, and evaluation of agents in clinical development. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, pp. 849-862.

Van Rie, A. *et al.* (2010). Xpert((R)) MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? *Expert Rev Mol Diagn*, 10, pp. 937-946.

Van Zeller, M., *et al.* (2012). Multidrug resistant tuberculosis diagnosed by synovial fluid analysis. *Rev Port Pneumol*, 18, pp. 247-250.

Vander Beken, S. *et al.* (2011). Molecular structure of the Mycobacterium tuberculosis virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern. *Eur J Immunol*, 41, pp. 450-460.

Vannelli, T. A. *et al.* (2002). The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. *J Biol Chem*, 277, pp. 12824-12829.

Von Groll, A. *et al.* (2009). Fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis and mutations in gyrA and gyrB. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, pp. 4498-4500.

World Health Organization. (2006). Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis, Geneva, 361.

World Health Organization. (2009). Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. Geneva, 426.

World Health Organization (2013). The use of bedaquiline in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Geneva, pp. 3-12.

Zaunbrecher, M. A. *et al.* (2009). Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, pp. 20004-20009.

Zhang, M. *et al.* (1998). Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. *Infect Immun*, 66, pp. 794-799.

Zhang, Y. e Mitchison, D. (2003). The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*, 7, pp. 6-21.

Zhang, Y. e Yew, W. W. (2009). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 13, pp. 1320-1330.

Zhang, Y. *et al.* (2003). Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to weak acids. *J Antimicrob Chemother*, 52, pp. 56-60.