

ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA

AMANDA ASSIS BITTENCOURT DE SOUZA DANTAS

**AVALIAÇÃO DO TNF- α COMO UM POTENCIAL
BIOMARCADOR PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE
PULMONAR A PARTIR DA RESPOSTA INDUZIDA PELOS
LIPÍDIOS DO *Mycobacterium tuberculosis***

SALVADOR – BA
2023

AMANDA ASSIS BITTENCOURT DE SOUZA DANTAS

**AVALIAÇÃO DO TNF- COMO UM POTENCIAL BIOMARCADOR
PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR A
PARTIR DA RESPOSTA INDUZIDA PELOS LIPÍDIOS DO
*Mycobacterium tuberculosis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Msc. Camila Pimentel Sobrinho

SALVADOR — BA

2023

AMANDA ASSIS BITTENCOURT DE SOUZA DANTAS

TÍTULO DO ARTIGO: AVALIAÇÃO DO TNF- COMO UM POTENCIAL BIOMARCADOR PARA O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR A PARTIR DA RESPOSTA INDUZIDA PELOS LIPÍDIOS DO *Mycobacterium tuberculosis*

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador – BA, 11 de novembro de 2023.

Prof. Dr. Suzana Ramos Ferrer
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Msc. Camila Pimentel Sobrinho
FIOCRUZ – BAHIA

Msc. Carlos Augusto Oliveira Junior
FIOCRUZ – BAHIA

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, que me deu energia e força para a conclusão deste trabalho mesmo com todas as dificuldades não me deixou na mão.

Aos meus pais pelo incentivo, carinho e dedicação em todos os momentos da minha vida, por sempre me proporcionarem o melhor.

A meu irmão, Aécio, por ser o melhor irmão do mundo e me dar todo apoio.

À minha orientadora Camila e todos os colegas do LASP (FIOCRUZ-BA) pela contribuição e ensinamentos adquiridos.

Ao pessoal do Heom, por toda parceria e ajuda nesses últimos meses, principalmente a Fernanda e Seu Evilasio.

Aos meus amigos que estiveram sempre comigo, aguentando os desabafos, dando conselhos e entendendo todas as vezes que não estive presente devido a minha rotina.

” O Trabalho que fazemos com prazer cura a cansaça que dele mesmo advém”

William Shakespeare

RESUMO

Atualmente, o diagnóstico da tuberculose (TB) depende de exames como a baciloscopia de escarro que apresenta baixa sensibilidade e a cultura do escarro que pode levar até 45 dias para obtenção do resultado. Outro teste disponível é o GeneXpert MTB/RIF® que apresenta alta sensibilidade porque detecta o DNA do *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) no escarro, a liberação do resultado é rápida, no entanto, o seu equipamento tem um alto custo e por isso ele não é ampliado para unidades básicas de saúde. Em virtude das limitações dos atuais testes disponibilizados no mercado para o diagnóstico da TB, o presente estudo explora o potencial dos lipídios da parede celular do Mtb na estimulação da produção de TNF- α para o desenvolvimento de um novo teste de diagnóstico para TB ativa. Neste trabalho, avaliou-se a produção de TNF- α em amostras de sangue total estimuladas com lipídios do Mtb em pacientes com TB pulmonar ativa, indivíduos saudáveis e SR. A quantificação de TNF- α foi realizada no sobrenadante da cultura através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), utilizando o kit comercial BDTM OptEIA Human TNF ELISA Kit. **Resultados:** Os resultados obtidos até aqui mostraram que cultura de sangue total 0,05 mg/mL de extrato de lipídico por 48 horas aparentou ser quatro vezes maior do que nas células dos indivíduos saudáveis e sete vezes mais do que nos sintomáticos respiratórios.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, Lipídios, teste diagnóstico.

**RESUMO EM LÍNGUA ESTRANGEIRA
(ABSTRACT - inglês)**

Currently, the diagnosis of tuberculosis (TB) depends on tests such as sputum smear microscopy, which has low sensitivity, and sputum culture, which can take up to 45 days to obtain the result. Another available test is the GeneXpert MTB/RIF®, which has high sensitivity because it detects *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) DNA in sputum, releasing the result quickly, however, its equipment has a high cost and is therefore not expanded to basic health units. Due to the limitations of current tests available on the market for the diagnosis of TB, the present study explores the potential of Mtb cell wall lipids in stimulating the production of TNF- α for the development of a new diagnostic test for active TB. In this work, we evaluated the production of TNF- α in whole blood samples stimulated with Mtb lipids in patients with active pulmonary TB, healthy individuals and RS. Quantification of TNF- α was performed in the culture supernatant through the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using the commercial kit BDTM OptEIA Human TNF ELISA Kit. Results: The results obtained so far showed that whole blood culture 0.05 mg /mL of lipid extract for 48 hours appeared to be four times higher than in the cells of healthy individuals and seven times higher than in those with respiratory symptoms.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Lipids, diagnostic test.

SUMÁRIO

1. ARTIGO CIENTÍFICO.....	8
2. PROPOSTA DE SUBMISSÃO	20

INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa de relevância global, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), e representa um sério desafio para a saúde pública. No ano de 2021, aproximadamente 10,6 milhões de pessoas em todo o mundo adoeceram, e cerca de 1,6 milhão de óbitos decorrentes da doença foram notificados (WHO,2022). No Brasil, mais de 60 mil novos casos foram registrados em 2021, com uma taxa de incidência de 32 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2022), o que coloca o país entre os 30 com maior incidência de TB no mundo.

O diagnóstico da TB depende de testes com sensibilidade limitada, como a baciloscopia de escarro, e com longos períodos de espera pelos resultados, como a cultura do escarro, que pode levar cerca de 45 dias após a coleta da amostra para fornecer um diagnóstico (PROSCÓPIO et al., 2014). Embora o GeneXpert MTB/RIF® seja uma opção mais recente e sensível para o diagnóstico da TB, detectando o DNA do Mtb no escarro e fornecendo resultados em menos de 24 horas, seu alto custo limita sua aplicação em unidades básicas de saúde. Além disso, ele pode detectar bacilos não viáveis, o que pode levar a equívocos em pacientes com histórico de TB (CHAKRAVORTY et al., 2017).

Além destes, outro teste disponível é o ensaio de liberação de IFN- γ (IGRA), utilizado como exame complementar no diagnóstico da TB ativa em crianças, no entanto, em locais onde a TB é endêmica, o teste tem indicação apenas para o diagnóstico da infecção latente pelo Mtb (ILTB) (BRASIL, 2019). O diagnóstico pelo IGRA é obtido a partir da quantificação de IFN- γ em sobrenadante de cultura de sangue total, após estimulação *in vitro* com as proteínas ESAT-6 e CFP-10 derivadas do Mtb. Embora eficaz no diagnóstico da ILTB, o IGRA não consegue distinguir entre pacientes com TB ativa e indivíduos com ILTB, o que limita sua utilidade em regiões endêmicas (WHITWORTH et al., 2013; BRASIL, 2019).

Devido às limitações dos testes atuais disponíveis no mercado para o diagnóstico da TB, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem destacado a urgência de desenvolver um novo teste diagnóstico para a TB ativa. De acordo com a OMS, o teste deve atender a

requisitos mínimos de sensibilidade (> 65%, no geral; > 98% em indivíduos com baciloscopia e cultura positiva) e especificidade (mínimo de 87%). A exigência é comparável ao desempenho do ensaio Xpert MTB/RIF. Além disso, é necessário que o novo teste utilize uma amostra de fácil acesso, como o sangue, urina ou swab, forneça resultados rápidos e tenha um baixo custo para implementação nas unidades básicas de saúde (WHO, 2022).

Vários estudos estão investigando biomarcadores diagnósticos por meio da estimulação *in vitro* com o Mtb ou suas proteínas (WANG et al., 2020; LUO et al., 2020; CILLIERS et al., 2021; GUPTA et al., 2021). Avaliações com antígenos lipídicos permanecem pouco explorados. Petrilli e colaboradores (2020) avaliaram o potencial diagnóstico dos lipídios ao mostrar que o extrato lipídico apolar do Mtb não estimula a proliferação de linfócitos TCD8⁺ em indivíduos saudáveis, mas em pacientes com TB ativa, esse mesmo extrato induziu a proliferação de células T CD8⁺ produtoras de TNF- α (PETRILLI et al., 2020). Com base nessa descoberta, o presente estudo explora o potencial dessas moléculas na estimulação da produção de TNF- α para o desenvolvimento de um novo teste de diagnóstico para TB ativa.

MATERIAIS E METODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Gonçalo Moniz (IGM), uma unidade da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no estado da Bahia. O número de aprovação do estudo é CAAE: 38826720.7.0000.0040. Todos os participantes consentiram voluntariamente em participar da pesquisa, manifestando sua concordância por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os termos assinados estão arquivados e sob a responsabilidade do pesquisador principal na instituição onde as análises são realizadas. A participação de todos os indivíduos envolvidos no estudo foi totalmente voluntária e sigilosa. Além disso, todas as etapas do estudo estiveram em conformidade com as normas estabelecidas pelo CEP, de acordo com a resolução 466/12.

Local de estudo

Este estudo foi conduzido no Instituto Gonçalo Moniz (IGM/FIOCRUZ) na Bahia, em colaboração com o Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM), um centro de referência para doenças respiratórias, localizado no bairro Pau Miúdo em Salvador. O hospital faz parte do distrito sanitário da Liberdade, que integra a rede pública de saúde do Estado da Bahia.

População do estudo

Os participantes do estudo foram divididos em três grupos: Grupo 1, composto por pacientes com TB pulmonar do HEOM (n=12), cujo diagnóstico foi confirmado por meio dos sintomas característicos da TB e pelo resultado positivo em pelo menos um dos seguintes testes: pesquisa direta do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) no escarro, cultura microbiológica ou teste Xpert MTB/RIF®. Grupo 2, formado por indivíduos saudáveis do IGM (n=12), que não apresentavam sintomas respiratórios ou doenças agudas nos últimos 14 dias. Grupo 3, composto por pacientes com sintomas respiratórios (SR) (n=12), que apresentavam suspeita de TB, mas cujos resultados nos testes de diagnóstico de TB eram obrigatoriamente negativos. Os critérios de não inclusão no estudo incluíam indivíduos que estavam em uso de corticosteroides sistêmicos, menores de 18 anos ou maiores de 65 anos, pacientes que haviam sido diagnosticados ou tratados para TB pulmonar nos últimos dois anos, pacientes transplantados, em tratamento para câncer, co-infectados com HIV ou que tinham doenças autoimunes. Todos os voluntários com TB e SR que se qualificaram para participar do estudo foram atendidos consecutivamente na unidade de saúde. Os indivíduos do grupo HC eram estudantes, técnicos e/ou pesquisadores do IGM.

Aspectos clínicos e laboratoriais

Após a obtenção do consentimento por meio da assinatura do TCLE, todos os voluntários responderam a um questionário estruturado para coletar informações clínicas e demográficas relevantes. Em seguida, todos os participantes foram submetidos à coleta de sangue por meio de punção venosa, utilizando tubos contendo heparina., as coletas consistiram em 9 mL de sangue total por voluntário, destinados à realização de culturas de

sangue total para testar a concentração de estímulo com o extrato lipídico a 0,05 mg/mL e um período de incubação de 48 horas.

Crescimento bacteriano e extração de lipídios

O extrato lipídico apolar foi obtido da cepa de Mtb (Erdmann) cultivada em meio Middlebrook 7H9 (Difco, MD) contendo 10% do complexo albumina-dextrose (ADC) (Beckton-Dickinson, MD), e incubada a 37°C e 5% de CO₂ até atingir a fase estacionária. As culturas planctônicas de Mtb foram utilizadas para a extração dos lipídios apolares (PETRILLI et al., 2020). Após a fase estacionária, 5 mL de metanol contendo 0,3% de NaCl (100:10) e 2,5 mL de éter de petróleo foram adicionados a 30 mL das culturas em tubos cônicos do tipo Falcon (50 mL) e incubados por 30 minutos com agitação leve (117 RPM). Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação para separar os lipídios. A camada superior de éter de petróleo, que continha os lipídios apolares, foi transferida para frascos de vidro de 20 mL, os quais foram mantidos abertos dentro do fluxo laminar até a completa evaporação do solvente. Após a pesagem dos frascos, o extrato lipídico foi ressuspensão em hexano e isopropanol na proporção de 1:1. Os frascos foram armazenados no freezer a -80°C até serem utilizados nas culturas de sangue total.

Cultura de sangue total com os lipídios do Mtb

As amostras foram utilizadas para realização de cultura de sangue total semelhante à estratégia do teste QuantiFERON® TB. No entanto, o estímulo utilizado foi o extrato lipídico da parede celular do Mtb como antígeno. Os tubos contendo o antígeno foram preparados previamente à cultura de sangue total, com a colocação do extrato lipídico (E.L) ressuspensos em hexano:isopropanol (1:1) à 0,05 mg/mL, sendo mantidos abertos até a completa evaporação do solvente. Outros tubos controle foram preparados, contendo apenas o solvente (hexano:isopropanol), com o mesmo volume usado na preparação dos tubos com extrato lipídico. O lipopolissacarídeo (LPS) da *Escherichia coli* O111:B4 foi utilizado usado nos experimentos como controle positivo (CP). Como controles negativos, foram utilizados um tubo sem antígeno e sem hexano:isopropanol (1:1) (CN) e outro tubo "contendo" apenas o

hexano:isopropanol evaporado (CNh:i). O sangue total foi diluído na proporção de 1:1 em meio RPMI-1640 (Gibco®- Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), 1% de antibiótico-antimicótico 100x (Gibco®- Thermo Fisher Scientific) e 1% de HEPES (10mM) (Gibco). Os tubos contendo sangue total e lipídios, bem como os seus controles, foram incubados a 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas. Após o período de incubação, os sobrenadantes das culturas foram utilizados para quantificar o TNF- α por meio do ensaio de imun absorção enzimática (ELISA), utilizando o kit comercial BDTM OptEIA Human TNF ELISA Kit

Análise estatística

Os dados obtidos foram organizados e analisados por meio do programa *GraphPad Prism* v. 8.0.1 (GraphPad Inc., San Diego, CA). O teste Shapiro Wilk e o Mann-Whitney foram utilizados, a fim de comprovar estatística com os resultados. O teste Shapiro Wilk para avaliação da distribuição dos dados e o teste Mann-Whitney para comparação das medianas entre os grupos do estudo. O nível de significância foi estabelecido para valores de $p < 0,05$. Como é esperado que a produção de TNF- α seja maior nos indivíduos com TB comparado aos indivíduos saudáveis, o gráfico referente as culturas de sangue total com estímulo do extrato lipídico foram representadas pelas diferenças líquidas em relação aos CNs, conforme fórmula a seguir: $\Delta\text{TNF-}\alpha = C_{\text{TNF-}\alpha} - \text{CN}$. Onde, $C_{\text{TNF-}\alpha}$ é a concentração de TNF- α da amostra e CN é a concentração de TNF- α do controle negativo.

RESULTADOS

Características demográficas da população do estudo

Trinta e seis participantes foram incluídos no estudo. Doze indivíduos com TB pulmonar, 12 voluntários saudáveis e 12 como SR. A distribuição dos voluntários avaliados no estudo com base no sexo e na idade está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Características demográficas dos voluntários recrutados para o estudo.

Características gerais	TB pulmonar (n=12)	Indivíduo sadio (n=12)	SR (n=12)
Gênero, n (%)			
Masculino	11 (92,31%)	4 (33,33%)	7 (46,67%)
Feminino	1 (7,69%)	8 (66,67%)	8 (53,33%)
Idade, anos (média ± DP)			
Total	41,33 +- 12,17	28,33 +- 8,7	43,6 +- 11,82
Masculino	41,18+- 12,71	29 +- 5,83	40,14 +- 11,41
Feminino	43+- 0	28 +- 9,81	46,63 +- 11,34

TB: tuberculose; DP: Desvio Padrão; n: número de voluntários recrutados.

Características clínicas e laboratoriais da população do estudo

As características laboratoriais dos voluntários avaliados com TB pulmonar ativa foram representadas na Tabela 2. O resultado positivo do teste rápido molecular Xpert MTB/RIF, baciloscopia de escarro ou cultura bacteriológica juntamente com a presença de sintomas respiratórios foi o critério utilizado para o recrutamento dos indivíduos com TB pulmonar. Dos 12 indivíduos com TB pulmonar, todos foram positivo no GeneXpert MTB/RIF, 11 (91,65 %) apresentaram resultado positivo e 1 (8,35%) negativo na baciloscopia

de escarro, respectivamente. 9 (75 %) dos voluntários com TB pulmonar tiveram resultado positivo na cultura bacteriológica.

Tabela 2. Características laboratoriais dos voluntários recrutados com TB pulmonar.

Características laboratoriais	TB pulmonar (n=12)
Xpert MTB/RIF, n (%)	
Não detectado	0 (0)
Detectado	12 (100)
Baciloscopia, n (%)	
Negativo	1 (8,35)
1+	2 (16,66)
2+	2 (16,66)
3+	7 (58,33)
NR	0 (0)
Cultura bacteriológica, n (%)	
Negativo	3 (25)
1+	0
2+	1 (8,33)
3+	3 (25)
NR	5 (41,66)

TB: tuberculose; DP: Desvio Padrão; n: número de voluntários recrutados.

As características clínicas dos voluntários avaliados foram representadas na Tabela 3. Todos os pacientes com TB pulmonar apresentaram tosse persistente (100%), 10 (80%) perda de peso 8 (66,66 %), febre vespertina, calafrios/suor noturno e dor torácica (66,66). Esses são considerados os principais sintomas característicos da TB (BRASIL, 2020).

Tabela 3. Características clínicas dos voluntários do estudo.

Características clínicas	TB pulmonar (n=12)	SR (n=12)
Tosse persistente, n (%)		

Sim	12 (100)	12 (100)
Não	0 (0)	0 (0)
Calafrios/suor noturno, n (%)		
Sim	8 (66,66)	5 (41,66)
Não	4 (33,33)	7 (58,33)
Febre, n (%)		
Sim	8(66,66)	5 (41,66)
Não	4 (33,33)	7 (58,33)
Dor torácica, n (%)		
Sim	8 (66,66)	6 (50)
Não	4 (33,33)	6 (50)
Falta de ar (dispneia), n (%)		
Sim	6 (50)	3 (25)
Não	6 (50)	9 (75)
Hemoptise, n (%)		
Não	10 (80)	8 (66,66)
Perda de peso, n (%)		
Sim	10 (80)	0 (0)
Não	2 (20)	12 (100)
Diabetes, n (%)		
Sim	0 (0)	0 (0)
Não	12 (100)	12 (100)
Fumante, n (%)		
Sim	2 (16,67)	0 (0)
Passivo	1 (8,33)	1 (8,33)
Não	9 (75)	11(91,66)
Vacina BCG, n (%)		
Sim	8 (66,66)	10 (83,33)
Não	2 (16,66)	0 (0)
Não sabe	2 (16,66)	2 (16,66)
Cicatriz da BCG, n (%)		
Sim	6(50)	11 (91,66)
Não	6 (50)	1 (8,33)

Cultura de sangue total com lipídios do Mtb

As células de sangue total dos 36 indivíduos (n = 12, por grupo) foram estimuladas com 0,05 mg/mL de lipídios por 48h (Figura 1). A média da produção de TNF- α no grupo TB aparentou ser quatro vezes maior do que nas células dos indivíduos sadios (p = 0,2913) e sete vezes mais do que nos sintomáticos respiratórios (p = 0,1135), mas essas diferenças, não foram estatisticamente significativas. O LPS não foi capaz de estimular a produção de TNF- α nos sintomáticos respiratórios e não houve alteração nos níveis de TNF- α nos tubos CNh:i.

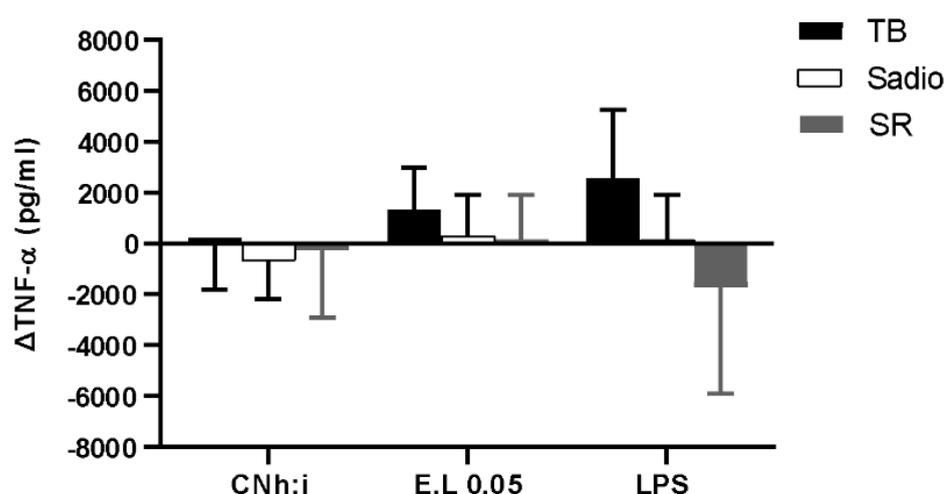


Figura 1 - Δ TNF- α após 48 h de cultura de sangue total com o extrato lipídico na concentração de 0,05. Estímulo com o extrato lipídico à 0,05 mg/mL em 48h; n = 12, por grupo. O Δ TNF refere-se à produção absoluta de TNF- α em cada uma das condições (CNh:i, E.L e LPS) menos a produção de TNF- α em cultura sem estímulo.

Análises da Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foram realizadas para avaliar a capacidade discriminatória do TNF- α e avaliação da sensibilidade e especificidade. A liberação de TNF- α apresentou um AUC de 0.63 (0.4031-0.8608), com sensibilidade de 50% e especificidade de 75%, em discriminar indivíduos com TB pulmonar e sadios (Figura 1A). Entre os indivíduos com TB pulmonar e SR, o TNF- α obteve um AUC de 0.69 (0.4715-0.9174), com sensibilidade de 58,3% e especificidade de 83.3% (Figura 1B).

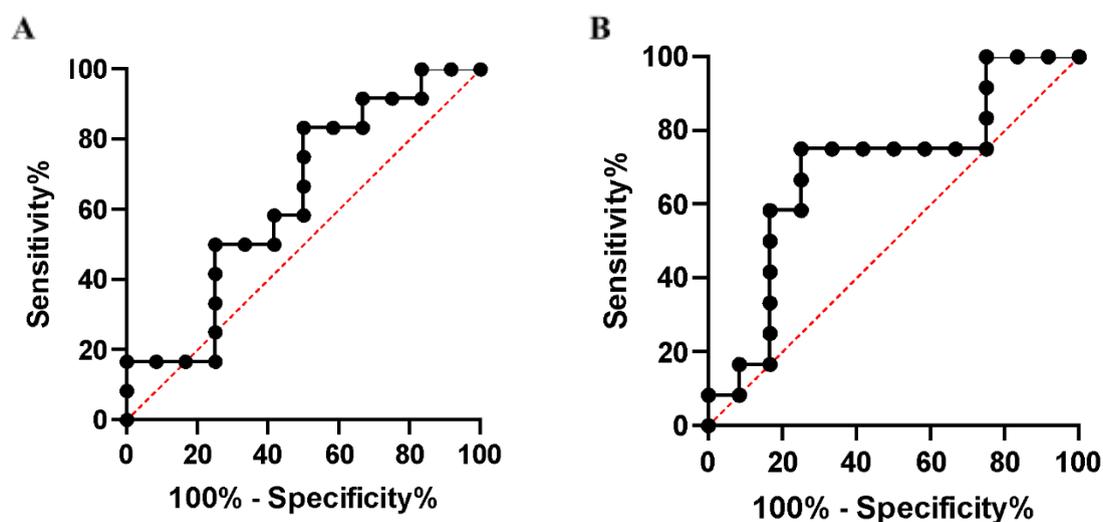


Figura 2. Curva ROC para avaliar a capacidade do TNF- α em distinguir indivíduos com TB pulmonar de indivíduos saudáveis e SR. (A) Curva ROC entre indivíduos com TB pulmonar ($n = 12$) e saudáveis ($n = 12$), AUC de 0.63. (B) Curva ROC entre indivíduos com TB ($n = 12$) e SR ($n = 12$), AUC de 0.69. ROC = Receiver Operating Characteristic. AUC = Área sob a curva.

DISCUSSÃO

O TNF- α desempenha um papel de destaque na resposta do sistema imunológico à infecção por *Mtb* na TB ativa, é reconhecido como um dos mediadores na resposta inflamatória. Ele é amplamente reconhecido como uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel essencial na imunidade inata (CLARK, 2007). Devido a essas características, é uma citocina que já foi bem explorada como potencial biomarcador no diagnóstico da TB ativa e indivíduos saudáveis, no estudo de Wang et al. em 2013 foi capaz de diferenciar TB ativa de ILTB com sensibilidade de 72% e especificidade de 90,91%. Estes

resultados sugerem que o TNF- α específico para Mtb pode ser uma ferramenta útil para o diagnóstico da doença tuberculosa ativa.

Os estudos que têm quantificado o TNF- α como potencial biomarcador de TB pulmonar tem sido focados na resposta imune mediada pelo estímulo de proteínas do Mtb *in vitro* ou utilizando o Mtb como antígeno, mas avaliações com antígenos lipídicos permanecem pouco explorados. E uma característica singular do Mtb, é a composição rica em lipídios de seu envelope. Cerca de 40% do peso seco da parede celular do Mtb é composto por lipídios. É notável que uma parte substancial da capacidade de decodificação do genoma bacteriano seja dedicada à biossíntese e degradação lipídica (QUEIROZ, 2017). Essa característica única do Mtb e a resposta imune associada podem ser exploradas como elementos principais no diagnóstico da tuberculose, dado que, essas moléculas são antígenos importantes que interagem com componentes do hospedeiro durante a infecção e estimula a resposta imune (KARAKOUSIS et al., 2004). O diferencial do trabalho é a utilização do extrato lipídico apolar da parede celular do Mtb como antígeno na estimulação *in vitro* do sangue total em indivíduos com TB pulmonar e os grupos controles.

Nesse estudo houve um aumento da produção de TNF- α específico pelos lipídios, em pacientes com TB ativa, que aparentou ser quatro vezes maior do que nas células dos indivíduos sadios ($p = 0,2913$) e sete vezes mais do que nos sintomáticos respiratórios ($p = 0,1135$).

Por mais que o uso do extrato lipídico seja um diferencial do nosso grupo de estudo, também é uma limitação, considerando que, não tem como garantir que ele irá ter sempre a mesma composição, a bactéria pode estar em estados metabólicos diferentes, e assim, a reprodutibilidade pode ser afetada. Então, torna-se, necessários, em trabalhos posteriores, identificar qual a espécie ou as espécies que estão causando essa resposta para garantir a homogeneidade dos resultados e aperfeiçoar o teste. O extrato lipídico é uma representação mais complexa dos lipídios presentes na bactéria.

Além disso, é necessária uma análise de parâmetros diagnósticos, na qual não realizamos uma avaliação abrangente de elementos essenciais, como acurácia, razão de verossimilhança, *odds ratio*, índice kappa e valores preditivos, que não fizemos o teste devido à ausência da diferença significativa. A ausência de uma análise completa de tais parâmetros diagnósticos cruciais representa uma limitação do estudo, uma vez que a inclusão deles teria

enriquecido nossa avaliação do desempenho do teste diagnóstico. Portanto, para que o teste diagnóstico possa ser implementado no mercado, é essencial que estudos futuros preencham essa lacuna, fornecendo uma compreensão mais completa e robusta dos resultados.

CONCLUSÃO

A partir desses resultados foi possível perceber um potencial diagnóstico para a dosagem de TNF- α após 48 horas de cultura com o extrato lipídico à 0,05 mg/mL, onde os níveis de TNF- α produzidos pelas células de pacientes com TB indicou cerca de quatro vezes maior do que nas células dos indivíduos saudáveis e sete vezes mais do que nos sintomáticos respiratórios. Apesar dessas diferenças não terem sido estatisticamente significante, o estudo revela um potencial papel do TNF- α específico pelos lipídios no diagnóstico da TB pulmonar, dado que somente as células dos pacientes com TB responderam ao estímulo com essas moléculas.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Boletim Epidemiológico – Tuberculose, 2020.
- BRASIL. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil, segunda edição, 2020.
- CHAKRAVORTY, S., et al. The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving Detection of Mycobacterium tuberculosis and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. *mBio*. 2017;8(4).
- CILLIERS, K., et al. Mycobacterium tuberculosis-stimulated whole blood culture to detect host biosignatures for tuberculosis treatment response. *Tuberculosis*. Elsevier. 2021;128.
- GUPTA, S., et al. Point-of-care detection of tuberculosis using magnetoresistive biosensing chip. *Tuberculosis*. Elsevier. 2021;127.
- LUO, Y., et al. Combination of mean spot sizes of ESAT-6 spot-forming cells and modified tuberculosis-specific antigen/phytohemagglutinin ratio of T-SPOT.TB assay in distinguishing between active tuberculosis and latent tuberculosis infection. *Journal of infection*. 2020;81:81-89.
- PETRILLI, J.D., et al. Differential host pro-inflammatory response to mycobacterial cell wall lipids regulated by the mce1 operon. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:1848.
- PROSCÓPIO, J.M. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 7ª edição. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014.
- QUEIROZ, A; RILEY L.W. Bacterial immunostat: Mycobacterium tuberculosis lipids and their role in the host immune response. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(1):9-18.

- WANG, F., et al. Combination of Xpert MTB/RIF and TBAg/PHA ratio for prompt diagnosis of active tuberculosis: a two-center prospective cohort study. *Frontiers in Medicine*. 2020;7.
- WHITWORTH, H.S., et al. IGRAs--the gateway to T cell-based TB diagnosis. *Methods*. 2013;61(1):52-62.
- WHO: World Health Organization. Global tuberculosis report 2021. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO: World Health Organization; High-priority target product profiles for new tuberculosis diagnostics: report of a consensus meeting. Geneva. 2014
- KIM, J. Y, et al. Combined IFN- γ and TNF- α release assay for differentiating active tuberculosis from latent tuberculosis infection. *Journal of Infection*, 77(4), 314–320.
- PETRUCCIOLI, E., et al. IFN γ /TNF α specific-cells and effector memory phenotype associate with active tuberculosis. *J Infect*. 2013;66(6):475-486.
- WANG, F., et al. Mycobacterium tuberculosis-specific TNF- α is a potential biomarker for the rapid diagnosis of active tuberculosis disease in Chinese population. *PLoS ONE*. 2013;8(11)
- CLARK, I. A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 18, n. 3-4, p. 335–343, 2007.
- BOLAJOKO, E Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, inducible nitric oxide synthase, and 3-nitrotyrosine in drug-resistant and drug-sensitive pulmonary tuberculosis patients, Ibadan, Nigeria. *Int J Mycobacteriol*. 2020;9(2):185-189.

- MEZOUAR, S. et al. Tumor necrosis factor-alpha antagonist interferes with the formation of granulomatous multinucleated giant cells: New insights into Mycobacterium tuberculosis infection. *Front Immunol.* 2019;10(AUG).
- HARARI. A et al. TNF- α + Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. *Nature Medicine*, 17(3), 372–377.
- ACHARYA, M et al. CD38+CD27-TNF- α +on Mtb-specific CD4+T Cells Is a Robust Biomarker for Tuberculosis Diagnosis. *Clinical Infectious Diseases*, 73(5), 793–801.

MOOTOO, A et al. TNF- na tuberculose: uma citocina com personalidade dividida. Departamento de Medicina Celular e Molecular, St. George's Hospital Medical School, Universidade de Londres, Reino Unido, 2009

1. Proposta de submissão

1.1 Revista: REVISTA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E BIOLÓGICAS

1.2 Regras para Submissão:

Diretrizes para Autores

1. NORMAS EDITORIAIS

1.1 Os trabalhos científicos submetidos à publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, e versarão sobre temas das áreas médica, biológica e correlatas, enquadrados na seguinte classificação:

Editorial – cuja autoria deve ser decidida pelo editor científico, podendo ser redigido por terceiros em atendimento à solicitação do Conselho Editorial.

Artigos originais – resultados novos e consolidados de pesquisa experimental ou teórica, apresentados de maneira abrangente e discutidos em suas aplicações, compreendendo de 15 a 25 páginas.

Artigos de divulgação – resultados novos de pesquisa experimental ou teórica em forma de nota prévia, apresentando e discutindo experimentos, observações e resultados, compreendendo de 15 a 25 páginas.

Artigos de revisão – textos que reúnam os principais fatos e idéias em determinado domínio de pesquisa, estabelecendo relações entre eles e evidenciando estrutura e conceitual própria do domínio, abrangendo de 8 a 12 páginas.

Casos clínicos – descrição de casos clínicos com revisão da literatura e discussão, apresentados em 8 a 15 páginas.

Resenhas – Análises críticas de livros, monografias e periódicos recém-publicados, contendo de uma a 4 páginas.

Conferências e relatos de experiências inovadoras – apresentação, contendo de 8 a 15 páginas, sobre temas específicos do periódico ou relacionados aos interesses científicos do mesmo.

Carta ao editor – comunicação de acontecimentos e pesquisas científicas de relevância.

1.2 Os trabalhos enviados para publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico. A **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**

reserva-se todos os direitos autorais dos trabalhos publicados, inclusive de tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução como transcrição, com a devida citação de fonte.

1.3 A Revista reserva-se ainda o direito de submeter todos os originais à apreciação da Comissão de Publicação, do Conselho Editorial e da Comissão de Ética, que dispõem de plena autoridade para decidir sobre a conveniência de sua aceitação, podendo, inclusive, reapresentá-los aos autores, com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias no texto e/ou para que os adaptem às normas da Revista. Nesse caso, o trabalho será reavaliado pelos assessores e pelo Conselho Editorial. Os trabalhos não aceitos serão devolvidos aos autores. Os nomes dos relatores permanecerão em sigilo, omitindo-se, também, perante os relatores, os nomes dos autores.

1.4 Todos os trabalhos que envolvam estudos com seres humanos, incluindo-se órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução n.º 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e seus complementos e ter sido aprovados por um Comitê de Ética e Pesquisa a serem consignados pela Comissão de Ética da Revista. Nos relatos sobre experimentos com animais, deve-se indicar se foram seguidas as recomendações de alguma instituição sobre o cuidado e a utilização de animais de laboratório. O Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa-CEP deve ser encaminhado como INSTRUMENTO DE PESQUISA no momento da submissão assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por um participante da pesquisa.

1.5 Os textos dos trabalhos ficam sob inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião da Comissão de Publicação e do Conselho Editorial.

1.6 A Revista poderá introduzir alterações nos originais visando a manter a padronização e a qualidade da publicação, respeitados o estilo e a opinião dos autores. As provas tipográficas não serão enviadas aos autores, mas estes receberão dois exemplares do número da Revista em que o trabalho for publicado.

1.7 Fotos coloridas serão custeadas pelos autores interessados na sua publicação. Não existe taxa para o processo de submissão e publicação.

1.8 A assinatura da declaração de responsabilidade é obrigatória. Sugere-se o seguinte texto a ser incorporado aos anexos como INSTRUMENTO DE PESQUISA:

“Certifico(amos) que o artigo enviado à **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** é um trabalho original, sendo que o seu conteúdo não foi ou não está sendo considerado para publicação em outra revista, seja no formato impresso ou eletrônico”.

Data e assinatura

Os co-autores, devem assinar juntamente com o autor principal a supracitada declaração, que também se configurará como a concordância com a publicação do trabalho enviado, se este vier a ser aceito pela Revista.

1.9 Submissão de artigos *online*

Os artigos devem ser submetidos eletronicamente por meio do site da Revista de Ciências Médicas e Biológicas disponível em <https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/about/submissions> ou <http://www.cienciasmedicasbiologicas.ufba.br>. Outras formas de submissão não serão aceitas. O cadastro no processo de submissão não deve ultrapassar de 6 entre autor e co-autores inscritos.

2 APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS

Os originais destinados à **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** deverão ser apresentados de acordo com as normas a seguir, baseadas, principalmente, na Norma de Vancouver:

2.1 Os textos poderão ser redigidos em português, inglês, francês e/ou espanhol e digitados na fonte Times New Roman, corpo 12, com espaço de 1,5 cm, margem de 3 cm de cada lado. Se o texto for em outro idioma (inglês, espanhol ou francês), após o comunicado de preliminar

indicação para publicação, o mesmo deverá ser reavaliado/reescrito por um tradutor credenciado e indicado pela Revista para a autorização da versão definitiva.

2.2 As ilustrações (gráficos, desenhos, quadros, etc.) deverão ser limitadas ao mínimo indispensável, construídas preferencialmente em programa apropriado, como Excell, Harvard, Graphics ou outro, fornecidas em formato digital

As fotografias deverão ser fornecidas em papel ou em slides ou cromo. A indicação do tipo de ilustração (Figura, Quadro, etc.) deve estar localizada na parte superior da mesma, seguida da numeração correspondente em algarismos arábicos (Figura 1-, Quadro 5-) e do respectivo título precedido de travessão; a legenda explicativa deve ser clara e concisa, em corpo 10. No caso de ilustrações extraídas de outros trabalhos, será necessário indicar a fonte.

2.3 As tabelas estatísticas também serão numeradas consecutivamente em algarismos arábicos, mas apresentarão a respectiva identificação — p.ex., Tabela 1 - Título; Tabela 2 - Título, etc. — na parte superior, observando-se para a sua montagem as **Normas de apresentação tabular** do IBGE (1993).

2.4 Deverão ser indicados, no texto, os locais aproximados em que as ilustrações e as tabelas serão intercaladas.

2.5 As notas de rodapé serão indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

2.6 Recomenda-se anotar no texto: os nomes compostos e dos elementos, em vez de suas fórmulas ou símbolos; os períodos de tempo por extenso, em vez de em números; binômios da nomenclatura zoológica e botânica por extenso e em itálico, em vez de abreviaturas; os símbolos matemáticos e físicos conforme as regras internacionalmente aceitas; e os símbolos métricos de acordo com a legislação brasileira vigente.

2.7 No preparo do texto original, deverá ser observada, na medida do possível, a estrutura indicada em **2.7.1** a **2.7.2**, **na mesma ordem** em que seus elementos se apresentam a seguir.

2.7.1 Elementos pré-textuais

a) **Cabeçalho**, em que devem figurar:

- o título do artigo e o subtítulo (quando houver) concisos, contendo somente as informações necessárias para a sua identificação. Quando os artigos forem em português, deve-se colocar o título e o subtítulo em português e inglês; quando os artigos forem em inglês, francês ou espanhol, na língua em que estiverem redigidos e em português;
- o(s) nome(s) do(s) autor(es) acompanhado(s) da sua titulação mais importante e vínculo empregatício (se houver), a qual será a ser inserida em nota de rodapé juntamente com o endereço profissional completo, inclusive telefone e *e-mail* do autor ou co-autoria, principal do trabalho.

b) **Resumo (português) e Abstract (Inglês)**– Apresentação concisa e estruturada dos pontos relevantes do texto, de modo a permitir avaliar o interesse do artigo, prescindindo-se de sua leitura na íntegra. Para a sua redação e estilo, deve-se observar o que consta na NBR - **6028/2021**, e não exceder as 250 palavras recomendadas. Se o texto for em outra língua (espanhol ou francês) observa-se o mesmo procedimento. Sendo o artigo, preliminarmente, indicado para publicação, o resumo em idioma estrangeiro deverá ser reescrito por um tradutor credenciado e indicado pela Revista para fazer a versão definitiva do mesmo.

c) **Palavras-chave e Keywords** – palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo do texto (no máximo 5), separadas por ponto e vírgula e finalizada por ponto, que constem no Descritores em Ciências de Saúde (DeCS), no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br/> ou MeSH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>).

2.7.2 Texto

a) **Introdução** – Deve apresentar com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma linha ou área. Extensas revisões de literatura devem ser evitadas e, quando possível, substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, em que certos aspectos e revisões já tenham sido apresentados. Os trabalhos e resumos originários de dissertações ou teses devem sofrer modificações, de modo a se apresentarem adequadamente como um texto em nova formatação e atendendo às demais exigências da Revista em relação a ilustrações, fotos, tabelas, etc.

b) Materiais e métodos – A descrição dos métodos usados deve ser suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho, não sendo extensa. Técnicas já publicadas, a menos que tenham sido modificadas, devem ser apenas citadas (obrigatoriamente).

c) Resultados – Devem ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal, acompanhados de tabelas e/ou material ilustrativo adequado, quando necessário. Dados estatísticos devem ser submetidos a análises apropriadas.

d) Discussão – Deve se restringir ao significado dos dados obtidos, resultados alcançados, relação com o conhecimento já existente, evitando-se hipóteses não fundamentadas nos resultados.

e) Conclusão – Devem estar baseadas no próprio texto.

2.7.3 Elementos pós-textuais

a) Referências – Devem ser elaboradas de acordo com o Padrão Vancouver (International Committee of Medical Journal Editors -ICMJE). As referências devem ser organizadas **em ordem numérico crescente** (algarismos arábicos), utilizando duas maneiras para as citações no texto o **sistema numérico sobrescrito** ^{3,4,7-10} **ou alfanumérico um autor** Gatewood ³¹ (2012), **dois autores** Cotti, Santos ¹² (2016), **três autores** Azer, Safi, Almeida ²³ (2011) e **mais que quatro autores** Silva et al. ¹⁵ (2013). As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados devem estar de acordo com as bases e/ou Portal de revista BVS, Medline ou LILACS. A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Serão incluídas na lista final todas as referências de textos que contribuíram efetivamente para a realização do trabalho, as quais, no entanto, de 20, exceto artigos de revisão já os originais não devem ultrapassar o número máximo de 35. Quanto aos trabalhos citados no texto, todos serão obrigatoriamente incluídos na lista de Referências. Informações verbais, trabalhos em andamento ou não publicados não devem ser incluídos na lista de Referências; quando suas citações forem imprescindíveis, os elementos disponíveis serão mencionados no rodapé da página em que ocorra a citação.

Obs.: Os autores estrangeiros deverão indicar os **elementos essenciais** das referências, a saber:

Sobrenomes com grau de parentesco

Santos R Neto

Sobrenomes com prefixo

Di Credo R

Sobrenomes Hispânicos

Alvarez Alduan NA

- Para **artigos de periódicos**: autor(es), título do artigo (e subtítulo, se houver), título do periódico, data do fascículo (exs.: 2001 jan; 2005 July- Sept etc.), volume, número do fascículo, quando o fascículo citado for um Suplemento, paginação inicial e final do artigo, DOI.

Ex 1: Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL, Anjos SF, Santos F, Silva RD. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. N Engl J Med. 2002 July 25;347(4):284-7. doi: 10.1007/s11904-013-0170-

- para **livros**: autor(es), título (e subtítulo, se houver), edição (quando não for a primeira), local, editora e ano de publicação. Paginação.

Ex. 1

Santos DR. Gestão da inovação tecnológica. 2. ed. Barueri: Manole; 2008. 206 p.

- para **trabalhos acadêmicos**: autor(es) e título do trabalho, seguidos do tipo da publicação. cidade de publicação, instituição, ano de publicação. página.

Polzin AC. Material didático para capacitação de fonoaudiólogos no tratamento das alterações de fala na disfunção velofaríngea [master's thesis]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2017. 155 p.

-
- para **trabalho apresentados em eventos**: autor(es) e título do trabalho, seguidos da expressão *In: numeração do evento* e nome do evento (se houver), local e responsabilidade da publicação, ano.
- Oyadomari AT, Pomini KT, Rosso MP, Buchaim RL. Efeitos da terapia por laser de baixa potência no processo de reparo de defeitos ósseos preenchidos pelo osso bovino Bio-Oss® associados ao novo selante heterólogo de fibrina. In: Resumo do 25th Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo; 2017 Oct 24-25; Bauru, Brazil. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2017.

Polzin AC. Material didático para capacitação de fonoaudiólogos no tratamento das alterações de fala na disfunção velofaríngea [master's thesis]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2017. 155 p.

b) Agradecimentos (quando houver).

c) Data de entrega dos originais à redação da Revista.

1.1 Artigos originais

Artigos originais – resultados novos e consolidados de pesquisa experimental ou teórica, apresentados de maneira abrangente e discutidos em suas aplicações, compreendendo de 15 a 25 páginas.

1.2 Artigos de revisão

Artigos de revisão – textos que reúnam os principais fatos e idéias em determinado domínio de pesquisa, estabelecendo relações entre eles e evidenciando estrutura e conceitual própria do domínio, abrangendo de 8 a 12 páginas.

1.3 Caso Clínico

1.4 **Casos clínicos** – descrição de casos clínicos com revisão da literatura e discussão, apresentados em 8 a 15 páginas.

1.5 Carta ao Editor

Carta ao editor – comunicação de acontecimentos e pesquisas científicas de relevância.

1.6 Resenhas

Resenhas – Análises críticas de livros, monografias e periódicos recém-publicados, contendo de uma a 4 páginas.

1.7 Resumos

Publicação apenas para os Resumos publicados em Eventos.

1.8 Declaração de Direito Autoral

A **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** reserva-se todos os direitos autorais dos trabalhos publicados, inclusive de tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução como transcrição, com a devida citação de fonte.

1.9 Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ANEXO

Anexo A – título do anexo A

Material solicitado pela revista científica selecionada que não faz parte do artigo. Isto pode incluir carta de aprovação do comitê de ética, *Cover Letter*, documento(s) complementar(es) e/ou comprobatório(s) do texto, entre outros.

São identificados por letras maiúsculas consecutivas, travessão e pelos respectivos títulos.

Exemplo:

ANEXO A – Abreviatura dos meses

ANEXO B – Relação das normas da ABNT sobre documentação