

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Odontologia**  
**Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia**

**Rubens Signoretti Oliveira Silva**

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DO BACILO *MYCOBACTERIUM***  
***TUBERCULOSIS* EM AMOSTRAS SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE**  
**ORAL**

**Belo Horizonte**  
**2023**

Rubens Signoretti Oliveira Silva

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DO BACILO *MYCOBACTERIUM*  
TUBERCULOSIS EM AMOSTRAS SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE  
ORAL**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Estomatologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Vanessa de Fátima Bernardes

**Coorientador:** Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

**Coorientadora:** Profa. Dra. Marina Gonçalves Diniz

Belo Horizonte  
2023

## Ficha Catalográfica

S586i Silva, Rubens Signoretti Oliveira.  
2023 Investigação da presença do bacilo Mycobacterium  
T tuberculosis em amostras sugestivas de tuberculose oral /  
Rubens Signoretti Oliveira Silva. -- 2023.

81 f. : il.

Orientadora: Vanessa de Fátima Bernardes.

Coorientador: Ricardo Santiago Gomez.

Coorientadora: Marina Gonçalves Diniz.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Tuberculose bucal. 2. Mycobacterium tuberculosis. 3. Técnicas e procedimentos diagnósticos. 4. Imuno-histoquímica. 5. Reação em cadeia da polimerase. I. Bernardes, Vanessa de Fátima. II. Gomez, Ricardo Santiago. III. Diniz, Marina Gonçalves. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. V. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

### FOLHA DE APROVAÇÃO

## INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DO BACILO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EM AMOSTRAS SUGESTIVAS DE TUBERCULOSE ORAL

**RUBENS SIGNORETTI OLIVEIRA SILVA**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração ESTOMATOLOGIA.

Aprovada em 19 de setembro de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Vanessa de Fátima Bernardes - Orientadora  
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Profa. Marina Gonçalves Diniz  
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Prof. Ricardo Santiago Gomez  
Faculdade de Odontologia da UFMG

Prof. Mário José Romañach Gonzalez Sobrinho  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Profa. Patrícia Carlos Caldeira  
Faculdade de Odontologia da UFMG

Belo Horizonte, 19 de setembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Mario José Romañach Gonzalez Sobrinho, Usuário Externo**, em 19/09/2023, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Carlos Caldeira, Professora do Magistério Superior**, em 19/09/2023, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa de Fatima Bernardes, Professora do Magistério Superior**, em 19/09/2023, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Santiago Gomez, Coordenador(a)**, em 19/09/2023, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Marina Goncalves Diniz, Professora do Magistério Superior**, em 19/09/2023, às 16:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2621980** e o código CRC **0D47A564**.

---

Este trabalho é dedicado primeiramente a Deus, a minha família e a todas as pessoas envolvidas por todo esforço para conclusão deste.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças e discernimento para conclusão de toda minha trajetória até aqui.

Aos meus pais, Paulo e Stefânia, que são a base de todo meu caráter e conhecimento, pelo amor, carinho e apoio.

Aos meus irmãos, Bruno e Leandro por todos os conselhos e ajuda para trilharmos os caminhos de bastante sabedoria. Também ao meu sobrinho Arthur, que chegou recentemente para alegrar e inspirar toda a família.

Em especial, um grande agradecimento à minha orientadora Vanessa Bernardes, por ser um exemplo de pessoa, professora e profissional, por todo conhecimento, pela maneira de conduzir cada etapa deste trabalho com calma, delicadeza e sabedoria. Por acompanhar cada erro e cada acerto realizado durante o percurso com bastante discernimento e gentileza.

Aos meus coorientadores Ricardo Gomez, principalmente por ser uma pessoa incrível, um professor excepcional e um exemplo de profissional e Marina Diniz, por ser uma pessoa admirável, pela empolgação para ensinar, e por toda paciência em cada momento que precisei. Sou muito grato aos meus orientadores, que fizeram com que meu caminho em todo mestrado fosse extremamente enriquecedor com todo apoio, conselhos e exemplos.

À professora Silvana Spíndola, estendendo-se à Lida e às técnicas Josiane e Mércia, por ter sido extremamente solícita em ajudar e oferecer os serviços do laboratório para que engrandecesse este trabalho garantindo um diferencial.

Ao professor Renato Santana por colaborar de uma maneira precisa, clara e solícita, onde foi de extrema importância e ajuda.

À aluna de iniciação científica Thais de Lima, que participou ativamente de grande parte do trabalho, me auxiliando e ajudando em muitas etapas e dividindo muitos momentos desafiadores e contentes juntos.

Aos meus amigos de mestrado Fernanda, Felipe, Gabriela, Lucas e Raquel por toda etapa juntos e apoio uns aos outros. Em especial à Natália, Nayara, Paula, Leni e Gustavo, onde passamos muitos momentos felizes e desafiadores juntos.

A todos integrantes do laboratório de Biologia Integrativa (ICB-UFMG) e Biologia Molecular (FAO-UFMG) onde dividimos dúvidas, ajudas e conquistas com

uns aos outros. Aos professores e pós-graduandos da Estomatologia e Patologia por serem acolhedores e amigáveis.

Aos técnicos do laboratório de patologia da FAO-UFMG, Daniella, Domênico e Mara, que são essenciais para o funcionamento e fluxo do laboratório de Patologia, não obstante foram essenciais para conclusão deste trabalho.

Ao Marcelo Buzelin, em nome do laboratório de Histotecnologia, pela assistência técnica.

A todos integrantes do colegiado de pós-graduação da FAO-UFMG por serem solícitos e resolutivos.

Ao Programa de atendimento odontológico ambulatorial e hospitalar a indivíduos com comprometimento sistêmico e perda de substância em região de cabeça e pescoço, em especial às professoras Tarcília, Francisca e Amanda, que me deram oportunidade de ter um diferencial na minha trajetória pela Odontologia Hospitalar e a Prótese Bucomaxilofacial.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) financiadora de minha bolsa de mestrado, que foi de extrema importância para que conseguisse cumprir todo esse caminho.

Por fim, sou muito grato por concluir mais essa etapa da minha carreira profissional e pessoal!

“Investigar é criar novos conhecimentos.”

Neil Armstrong

## RESUMO

A Tuberculose (TB) é um considerável problema de saúde pública mundial. Em 2021, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou-se que, no mundo, cerca de 10,6 milhões de pessoas desenvolveram TB e 1,4 milhão morreu devido à doença. Com isso, tornou-se a principal causa de morte por infecção em todo o mundo e uma das dez principais causas de morte em geral. A TB tem o pulmão como o principal sítio de acometimento, sendo denominada de TB Pulmonar (TBP). Porém pode ser diagnosticada em muitos órgãos do corpo de maneira Extrapulmonar (TBEP), sendo o linfonodo o local mais comum. Porém, o envolvimento pleural, neurológico, sinovial, pericárdico, abdominal, geniturinário e oral tem sido descrito, o que mostra a potencial capacidade de disseminação do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). A detecção do Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR), geralmente ocorre pela observação das características microscópicas da morfologia dos tecidos, presença de granulomas com necrose caseosa, histiócitos epitelióides e células gigantes do tipo Langhans, associada à coloração para BAAR, pela técnica de *Ziehl-Neelsen* (ZN). Ademais, investigação por imuno-histoquímica (IHQ), testes de amplificação de ácido nucleico pela Reação em Cadeia da Polimerase Hemianinhada (*nested-PCR*) e pelo sistema de detecção automatizado GeneXpert® MTB/RIF são métodos aplicados para o diagnóstico da infecção. Com isso, este estudo teve como objetivo investigar a presença do bacilo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras orais em parafina que continham granulomas com necrose caseosa. Ao todo, como critério de inclusão, foram selecionadas biópsias que apresentaram granulomas com necrose caseosa, sugerindo o diagnóstico de TB. Foram excluídas aquelas que após a revisão das fichas e histológicas, não apresentavam os granulomas exibindo necrose caseosa e aquelas que foram de biópsias intraósseas. O *M. tuberculosis* foi procurado por meio da coloração de ZN, IHC, *nested-PCR* e ensaios GeneXpert® MTB/RIF. Foram então selecionadas nove amostras com granulomas com necrose caseosa. Houve predominância de indivíduos do sexo masculino (2,5:1), com idade média de 50 anos ( $\pm 23,08$ ; 19-89), sendo a língua o local anatômico mais afetado (n=4). O bacilo não foi identificado pela técnica de ZN em nenhuma amostra, e a coloração por IHC mostrou um padrão granular grosseiro, sugerindo *M. tuberculosis*, em três delas. *Nested-PCR* e os ensaios GeneXpert® MTB/RIF foram positivos em duas e três das amostras, respectivamente. Conclui-se que testes moleculares e IHC podem ser métodos auxiliares úteis para casos suspeitos de tuberculose.

Palavras-chave: tuberculose oral; *Ziehl-Neelsen*; imuno-histoquímica; *nested-PCR*; GeneXpert® MTB/RIF.

## ABSTRACT

### **Investigation of the presence of *Mycobacterium tuberculosis* bacillus in samples suggestive of oral tuberculosis.**

Tuberculosis (TB) is a significant global public health issue. In 2021, according to the World Health Organization (WHO), it was estimated that approximately 10.6 million people developed TB worldwide, and 1.4 million died from the disease. Consequently, it became the leading cause of death due to infection worldwide and one of the top ten overall causes of death. TB primarily affects the lungs and is referred to as Pulmonary TB (PTB). However, it can be diagnosed in various organs of the body as Extrapulmonary TB (EPTB), with lymph nodes being the most common site of involvement. Moreover, pleural, neurological, synovial, pericardial, abdominal, genitourinary, and oral involvement have been described, demonstrating the potential for *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) dissemination. The detection of Acid-Fast Bacilli (AFB) typically involves the observation of microscopic tissue characteristics, the presence of granulomas with caseous necrosis, epithelioid histiocytes, and Langhans giant cells, along with AFB staining using the Ziehl-Neelsen (ZN) technique. Furthermore, immunohistochemistry (IHC), nucleic acid amplification tests by Nested Polymerase Chain Reaction (nested-PCR), and the automated detection system GeneXpert® MTB/RIF are methods employed for diagnosing the infection. Therefore, the aim of this study was to investigate the presence of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin-embedded oral samples containing granulomas with caseous necrosis. Inclusion criteria were based on the selection of biopsies displaying granulomas with caseous necrosis, suggesting a diagnosis of TB. Biopsies without these features upon review of records and histological findings, as well as intraosseous biopsies, were excluded. *M. tuberculosis* was sought using ZN staining, IHC, nested-PCR, and GeneXpert® MTB/RIF assays. Nine samples with granulomas and caseous necrosis were selected. The majority of individuals were male (2.5:1 ratio), with an average age of 50 years ( $\pm 23.08$ ; range 19-89), and the tongue was the most affected anatomical site ( $n=4$ ). AFB was not identified by the ZN technique in any of the samples, and IHC staining exhibited a coarse granular pattern, suggestive of *M. tuberculosis*, in three of them. Nested-PCR and GeneXpert® MTB/RIF assays yielded positive results in two and three of the samples, respectively. In conclusion, molecular tests and IHC can be valuable auxiliary methods for suspected cases of tuberculosis.

**Keywords:** oral tuberculosis; Ziehl-Neelsen; immunohistochemistry; nested-PCR; GeneXpert® MTB/RIF.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Tendência global nas notificações de casos de pessoas recém-diagnosticadas com tuberculose, 2015–2021 .....	17
Figura 2 – Padrão de coloração do bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pela técnica de Ziehl Neelsen .....	30
Quadro 1 - Leitura e interpretação de resultados de baciloscopias de outros materiais biológicos .....	31
Figura 3 – Padrão de marcação imuno-histoquímica pela reação com anticorpo policlonal anti-PPD .....	33
Figura 4 – Fluxograma metodológico de seleção de amostras do estudo .....	46
Figura 5 – Morfologia tecidual das amostras através da coloração especiais e imuno-histoquímica .....	50
Quadro 2 – Características histológicas, presença e ausência do bacilo álcool-ácido resistente pela coloração de Ziehl Neelsen e padrão de coloração imuno-histoquímica .....	51
Quadro 3 – Resultados dos métodos moleculares para detecção do bacilo <i>M. tuberculosis</i> .....	52
Figura 6 - Amplificação por PCR de um fragmento de 92 pb de IS6110.....	52
Quadro 4 – Use of different gene targets for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis, sensitivity and specificity of PCR tests .....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados e parâmetros da reação. ....	42
Tabela 2 – Diagnóstico clínico e histológico das amostras selecionadas .....	47
Tabela 3 – Características clínico-patológicas de cada indivíduo da amostra .....	48
Tabela 4 – Médias e desvio padrão das idades, tempo de evolução e tamanho das lesões .....	49
Tabela 5 – Dados de frequência das amostras selecionadas .....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Anti-PPD	Anticorpo Derivado de Proteína Purificada
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CD	Células Dendríticas
COEP	Comitê de Ética e Pesquisa
COVID-19	<i>Corona Virus Disease 2019</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
et. al.	E Colaboradores
FAO-UFMG	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
FFPE	Fixados em Formalina e Embebidos em Parafina ( <i>formalin-fixed paraffin-embedded</i> )
gDNA	DNA Genômico
H&E	Hematoxilina e Eosina
HIV/AIDS	Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome
ICB-UFMG	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
IHQ	Imuno-Histoquímica
ILTB	Infecção Latente pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
IS	Sequências de Inserção
MDR-TB	Tuberculose Resistente a Medicamentos ( <i>Multidrug-Resistant Tuberculosis</i> )
ml	Mililitro
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAAs	Amplificação de Ácidos Nucleicos ( <i>Nucleic Acid Amplification</i> )
<i>Nested</i> -PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Aninhada
OMS	Organização Mundial da Saúde
pAbBCG	Anticorpo Policlonal Anti-BCG ( <i>Anti-BCG Polyclonal Antibody</i> )
pAbPPD	Anticorpo Policlonal Derivado de Proteína Purificada

PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPD	Derivado de Proteína Purificada ( <i>Purified Protein Derivative</i> )
QRT-PCR	PCR Quantitativa com Transcriptase Reversa (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR)
RM	Ressonância Magnética
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences®
TB	Tuberculose
TB/HIV	Indivíduo Convivendo com Tuberculose e HIV
TBEP	Tuberculose Extrapulmonar
TBP	Tuberculose Pulmonar
TBRR	Tuberculose Resistente a Rifampicina
TC	Tomografia Computadorizada
TRM-TB	Teste Rápido Molecular TB
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZN	<i>Ziehl-Neelsen</i>
µl	Microlitro
µm	Micrometro

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>REVISAO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1	Epidemiologia da tuberculose.....	20
2.2	Etiologia da tuberculose .....	21
2.2.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	21
2.2.2	Genoma do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22
2.3	Transmissão .....	22
2.4	Imunopatogenia.....	23
2.5	Sinais e sintomas .....	24
2.6	Prevenção e tratamento .....	25
2.7	Tuberculose extrapulmonar e oral .....	26
2.7.1	Aspectos clínicos.....	26
2.7.2	Aspectos histológicos .....	27
2.7.3	Aspectos radiológicos tuberculose pulmonar e extrapulmonar .....	28
2.8	Diagnósticos diferenciais da tuberculose oral.....	28
2.9	Métodos diagnósticos.....	29
2.9.1	Coloração de bacilos de álcool-ácidos resistentes - técnica de <i>Ziehl Neelsen</i> .....	29
2.9.2	Cultura.....	31
2.9.3	Imuno-histoquímica .....	31
2.9.4	Teste rápido molecular de tuberculose.....	33
2.9.4.1	<i>Nested-PCR</i> .....	34
2.9.4.2	GeneXpert® MTB/RIF System .....	34
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
3.1	Objetivo geral .....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>37</b>
4.1	Submissão ao comitê de ética.....	37
4.2	Local da pesquisa.....	37

4.3	Delineamento do estudo.....	37
4.4	Obtenção de amostra dos indivíduos .....	37
4.5	Diagnósticos histológicos – Hematoxilina e Eosina; coloração de bacilo álcool-ácido resistente – Ziehl Neelsen .....	38
4.6	Imuno-histoquímica .....	38
4.7	Diagnóstico por método molecular .....	40
4.7.1	<i>nested</i> -PCR .....	40
4.7.1.1	Revisão de literatura para desenho dos primers .....	40
4.7.1.2	Extração do DNA.....	41
4.7.1.3	Reação em cadeia da polimerase em dois passos ( <i>nested</i> -PCR).....	41
4.7.2	GeneXpert® MTB/RIF <i>system</i> .....	43
4.7.2.1	Desparafinização dos tecidos.....	43
4.7.2.2	Extração do DNA, amplificação do DNA e resultado.....	43
4.8	Análise estatística.....	44
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
5.1	Seleção das amostras .....	46
5.2	Dados clínicos-patológicos .....	48
5.2.1	Características histológicas, coloração de Ziehl Neelsen e imuno- histoquímica .....	49
5.3	Métodos moleculares .....	52
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos, observou-se que a Tuberculose (TB) afetou os seres humanos de forma endêmica. Foram notadas evidências de TB em múmias egípcias há mais de 5000 anos, tendo sido a doença originalmente chamada de "peste branca" (DANIEL, 2000). No entanto, a doença permaneceu insignificante no ocidente até o advento da Revolução Industrial no século XVIII, quando ocorreu um aumento significativo nos casos (BATES, 1980).

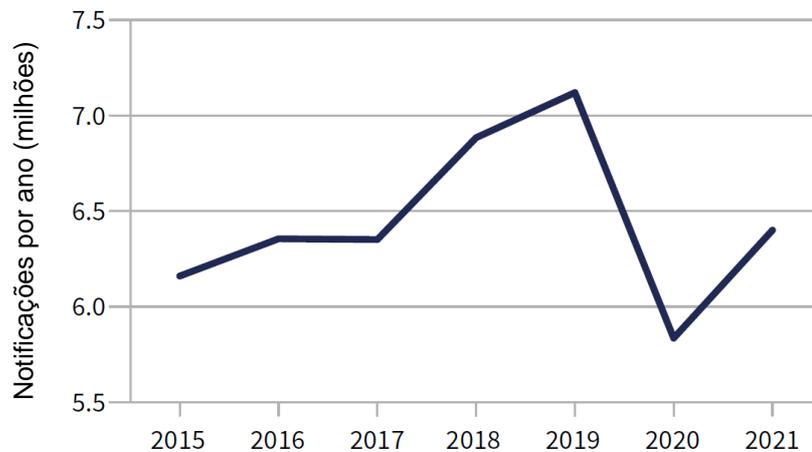
Já no início do século XX e ao longo deste século, a aflição e o isolamento decorrentes da enfermidade conferiam um tom poético às almas. Naquela época, a TB era considerada uma "doença romântica", retratada de maneira idealizada na literatura e na arte, seguindo os moldes do romantismo (BATES, 1980). No Brasil, a epidemia de TB se estabeleceu em grande parte das cidades, conhecida como a "praga dos pobres", devido à sua associação com condições de vida insalubres e dieta deficiente, fatores característicos das pessoas afetadas pela doença (SHEPPARD, 2001).

Causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), um Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR), descoberto e descrito pelo Dr. Robert Koch em 1882 (SAKULA, 1982), a TB é uma enfermidade contagiosa que tem um impacto significativo na saúde pública, sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo. Espalha-se quando as pessoas com TB expelem a bactéria no ar (por exemplo, pela tosse). Estima-se que cerca de um quarto da população global tenha sido infectada com o *M. tuberculosis* (HOUBEN; DODD, 2016), mas a maioria das pessoas não desenvolverão a doença e algumas eliminarão a infecção (BEHR; EDELSTEIN; RAMAKRISHNAN, 2019; EMERY *et al.*, 2021). Até surgir a pandemia do coronavírus (COVID-19), a TB era a principal causa de morte por um único agente infeccioso, ficando acima do Vírus da Imunodeficiência Humana/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida HIV/AIDS (BRASIL, 2022; GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2022).

Estima-se que 10,6 milhões de pessoas adoeceram com TB em todo o mundo em 2021, sendo um aumento de 4,5% em relação a 2020 (10,1 milhões). As restrições causadas pela pandemia de COVID-19 resultaram em um impacto imediato e evidente no número de pessoas recém-diagnosticadas e oficialmente notificadas em 2020 em comparação a 2019. Depois de grandes aumentos entre 2017 e 2019, houve uma

queda de 18% entre 2019 e 2020, passando de 7,1 milhões para 5,8 milhões. Em 2021, houve uma recuperação parcial, com um total de 6,4 milhões de casos notificados (FIGURA 1). Além disso, estima-se que a taxa de incidência de TB (novos casos por 100.000 habitantes por ano) tenha aumentado 3,6% entre 2020 e 2021, após declínios de cerca de 2% ao ano para a maioria das últimas 2 décadas (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2022).

Figura 1 - Tendência global nas notificações de casos de pessoas recém-diagnosticadas com tuberculose, 2015–2021



Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022 (adaptado)

Em 2021, houve um aumento significativo no número global de mortes por TB, totalizando 1,4 milhão de óbitos oficialmente registrados, o que representa mais que o dobro do número de mortes causadas pelo HIV/AIDS, que foi de 0,65 milhão (“UNAIDS 2022”, 2022).

Neste contexto, no Brasil, foram registrados 68.271 casos novos de TB, em 2021, o que levou a um coeficiente de incidência de 32,0 casos por 100 mil habitantes. Já em relação a mortalidade, em 2019, foram notificados cerca de 4,5 mil óbitos pela doença, com um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2022).

O local mais comum de infecção por TB é o pulmão, porém podem ser afetados outros sítios, resultando na Tuberculose Extrapulmonar (TBEP) (FURINI *et al.*, 2013; GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2022; HILLEMANN *et al.*, 2011). Além disso, cerca de 90% das pessoas que desenvolvem TB a cada ano são adultos, com mais casos entre homens do que mulheres (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2022). A taxa de acometimento da TBEP ainda é incerta, compreendendo cerca de 15 a 20%

dos casos de TB e pode compreender até 50% dos casos de TB daqueles indivíduos infectados pelo HIV (TB-HIV) (MEHTA *et al.*, 2012).

Os sintomas da incluem tosse por três semanas ou mais, febre vespertina, sudorese noturna e perda de peso. A tosse é o principal sintoma, podendo ser seca ou produtiva (com catarro) (BRASIL, 2022). As apresentações clínicas da TBEP com acometimento oral apresentam-se como ulcerações com centro granulomatoso e halo esbranquiçado (KUMAR *et al.*, 2010; RAZEM *et al.*, 2021).

Os métodos diagnósticos para detecção do bacilo *M. tuberculosis* melhoraram substancialmente nos últimos anos. Atualmente, existem vários Testes Rápidos Moleculares (TRM-TB) recomendados pela OMS para diagnóstico inicial de TB, incluindo testes que detectam resistência a medicamentos (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2022). O método mais antigo é a baciloscopia de escarro (desenvolvido há mais de 100 anos) e ainda é amplamente utilizado para o diagnóstico de TB em países de baixa e média renda, mas está sendo cada vez mais substituído por testes rápidos. O teste de cultura continua sendo o padrão de referência para o diagnóstico de TB. Após o diagnóstico, esfregaço ou cultura (ao contrário de testes moleculares rápidos) são necessários para monitorar a resposta de um indivíduo ao tratamento (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2022).

Os aspectos histológicos da TB, em qualquer sítio de infecção, pulmonar ou extrapulmonar, exibem lesões conhecidas como tubérculos, que são reações inflamatórias granulomatosas características contra o bacilo *M. tuberculosis* mediadas por células de imunidade do hospedeiro (NATARAJAN *et al.*, 2020). Porém, é desafiador para os patologistas diagnosticar a infecção com base apenas na histologia, podendo ser úteis os testes de Amplificação De Ácido Nucleico (NAAs). Maiores taxas de sensibilidades podem ser alcançadas por métodos de Reação em Cadeia da Polimerase Aninhada (*nested-PCR*), mas o risco de contaminação cruzada neste último pode ser preocupante (FU *et al.*, 2016).

Outro método de detecção do bacilo *M. tuberculosis* é a observação microscópica do tecido utilizando-se a técnica de *Ziehl-Neelsen* (ZN), considerada uma escolha por se tratar de um teste rápido e acessível. Entretanto, a sensibilidade é baixa quando comparada às técnicas moleculares, além de não permitir a identificação das espécies de *M. tuberculosis* presentes no espécime (BARCELOS; FRANCO; LEÃO, 2008).

Em comparação à coloração com ZN e cultura, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é altamente específica e sensível. Além do fato de ser uma técnica rápida, de baixo custo e possível de ser realizada na maioria dos laboratórios clínicos e de patologia (SCHOOLNIK, 1991). Porém, o diagnóstico definitivo e rápido para TBEP é visto como um desafio, uma vez que essa doença tem uma natureza paucibacilar (KHOSRAVI *et al.*, 2017). Além disso, esse diagnóstico também torna-se dificultado devido à falta de volumes adequados de amostra clínica e distribuição não uniforme de bactérias nessas amostras (MEHTA *et al.*, 2012). A técnica de PCR pode detectar quantidades <10 bacilos por mililitro de diferentes espécimes biológicos, sendo uma ferramenta útil para o diagnóstico de TB (CRUZ *et al.*, 2011). No entanto, um problema sério de detecção do BAAR por técnicas de PCR é a presença de substâncias inibidoras de PCR que se encontram associadas com o TBEP em comparação com as amostras pulmonares. A presença de tais inibidores é devida à presença de substâncias que interferem na atividade da polimerase e são utilizadas na preparação da amostra. Com isso, a detecção do bacilo para diagnóstico em amostras de TB na cavidade oral torna-se dificultada, assim como em outras amostras com localização extrapulmonar (ALLI; OGBOLU; ALAKA, 2011).

## 2 REVISAO DE LITERATURA

### 2.1 Epidemiologia da tuberculose

De natureza contagiosa, a TB é uma das principais causas de problemas de saúde, além de ser uma das 10 principais causas de morte em todo o mundo. Até a pandemia da COVID-19 era a principal causa de morte por um único agente infeccioso, ficando acima do HIV/AIDS (BRASIL, 2022; GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2022).

De acordo com o relatório da OMS de 2022 sobre TB global, houve um aumento de 4,5% no número de pessoas doentes por TB em 2021, em relação a 2020, totalizando 10,6 milhões de casos. Além disso, a TB foi responsável por 1,6 milhão de mortes em 2021, incluindo 187 mil mortes entre pessoas que vivem com HIV. Houve também um aumento de 3% na carga de TB multirresistente (TBMR - TB resistente a pelo menos dois medicamentos antituberculosos essenciais ao tratamento, a Isoniazida e a Rifampicina), com 450 mil novos casos de TB Resistentes a Rifampicina (TBRR) em 2021 (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2022).

Em todo mundo, o número anual estimado de mortes por TB caiu entre 2005 e 2019, mas as estimativas para 2020 e 2021 sugeriram que essa tendência foi revertida, sendo que houve uma estimativa de 1,4 milhão de mortes entre pessoas HIV negativas ( $\pm$  1,3–1,5 milhões) e 187.000 mortes ( $\pm$  158.000–218.000) entre pessoas HIV positivas em 2021 para um total combinado de 1,6 milhão. A maior parte do aumento estimado de mortes por TB em todo o mundo foi contabilizada por quatro países: Índia, Indonésia, Mianmar e Filipinas (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2022).

O Brasil está entre os 30 países de alta carga para a TB e para coinfeção TB-HIV, tornando-se prioritário para o controle da doença no mundo pela OMS (BRASIL, 2022). Além disso, no ano de 2021, o Brasil registrou 68.271 casos novos de TB, com um coeficiente de incidência de 32,0 casos por 100 mil habitantes. Em 2020, o país registrou 4.543 falecimentos, resultando em um coeficiente de mortalidade de 2,1 óbitos por 100 mil habitantes. Esse número segue a tendência dos anos anteriores na análise histórica de óbitos causados pela TB (BRASIL, 2022). Também em 2020, o Brasil e outros 15 países, foram responsáveis por 93% da redução das notificações

da TB no mundo. Essa variação negativa pode ser justificada pelos impactos causados pela pandemia de COVID-19 nos serviços e sistemas de saúde (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2022).

O estado de Minas Gerais apresentou uma média anual de 3.539 casos novos confirmados e uma média de óbitos de 245 notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) entre os anos de 2012 e 2021. Apenas no ano de 2021 apresentou um coeficiente de incidência de 16,2 novos casos por 100 mil habitantes e em 2020, um coeficiente de mortalidade de 1,1 óbitos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2022; NETO *et al.*, 2023).

O município de Belo Horizonte apresentou no ano de 2021, 407 novos casos de TB com uma taxa de incidência de 16,1 caso por 100 mil habitantes, sendo destes 314 casos de TB pulmonar. Foram notificados 28 óbitos em 2021 devido à doença, resultando em um coeficiente de mortalidade de 1,1 óbito a cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2022).

A TB é considerada uma doença de pobreza, e as pessoas afetadas por ela podem enfrentar frequentemente algum tipo de dificuldade econômica, vulnerabilidade, marginalização, estigma e discriminação (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2022). Observa-se o maior acometimento em indivíduos do sexo masculino (70,1%), em quase todas as faixas etárias, com exceção do grupo de dez a 14 anos. Homens de 20 a 34 anos apresentam 2,8 vezes mais risco de adoecimento por TB pulmonar do que mulheres na mesma faixa etária, seguidos do grupo de 50 a 64 anos, cujo risco de adoecimento por TB pulmonar é 2,6 vezes maior (BRASIL, 2022).

Destes, as populações mais vulneráveis ao adoecimento por TB, no Brasil, são as populações privada de liberdade, em situação de rua, imigrantes e profissionais de saúde, com um total de 6.773, 1.809, 1.023 e 427 casos, respectivamente, em 2021 no Brasil (BRASIL, 2022).

## 2.2 Etiologia da tuberculose

### 2.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, um BAAR identificado em 1882 por Robert Kock (SAKULA, 1982), se espalha quando pessoas doentes com TB

expelem bactérias no ar, como por exemplo, pela tosse. Estima-se que cerca de um quarto da população mundial está infectada com o bacilo (HOUBEN; DODD, 2016), mas a maioria das pessoas não desenvolverão a doença TB e algumas eliminarão o microrganismo (BEHR; EDELSTEIN; RAMAKRISHNAN, 2019).

O *M. tuberculosis*, pertencente à ordem dos *Actinomycetales*, à família *Mycobacteriaceae*, é um dos componentes do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Também pertencentes à esta família o *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*. Destes, o principal agente causal da TB pulmonar no Brasil, é o *M. tuberculosis*, sendo raros os casos de TB causados por outras espécies do complexo. Os bacilos do complexo *M. tuberculosis* possuem uma parede celular com alto teor de lipídios, representando até 40% do peso seco da célula (KRITSKI; RUFFINO-NETTO, 2000; NATARAJAN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2019).

### 2.2.2 Genoma do *Mycobacterium tuberculosis*

No ano de 1998, a linhagem H37Rv de *M. tuberculosis* teve seu genoma completamente sequenciado por Cole e Barrell. Esse micro-organismo apresenta um genoma com cerca de 4.000 genes, sendo composto por 4.411.529 pares de bases (pb). Adicionalmente, seu genoma apresenta sequências repetitivas de DNA, especialmente as sequências de inserção (IS), para as quais foram descritos 56 elementos de inserção. O elemento IS6110, que pertence à família IS3, é o mais abundante e mais bem caracterizado, com o número de cópias variando entre as linhagens e cepas analisadas (COLE; BARRELL, 1998; COROS; DECONNO; DERBYSHIRE, 2008).

### 2.3 Transmissão

O bacilo é transmitido de pessoa para pessoa por via aérea (LEWINSOHN *et al.*, 2017), e o contágio acontece de várias maneiras, sendo as mais frequentes pela fala, espirro e, principalmente, a tosse. Descrito por Wells, Ratcliffe e Grumb em 1948, as partículas contagiantes (denominadas 'Núcleos de Wells') apresentam um

tamanho de 5 a 10  $\mu\text{m}$  e quando em suspensão no ar podem infectar um próximo indivíduo (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2005; WELLS; RATCLIFFE; GRUMB, 1948).

A Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA - *Infectious Diseases Society of America*) elencou cinco fatores que determinam a probabilidade de transmissão do bacilo. Sendo eles (1) a infecciosidade do paciente-fonte - uma baciloscopia positiva para os BAAR ou uma radiolucidez na radiografia de tórax fortemente associada ao processo de infecção; (2) suscetibilidade do hospedeiro ao contato; (3) duração da exposição do contato ao paciente fonte; (4) o ambiente em que ocorre a exposição, principalmente aqueles que apresentam um espaço pequeno e mal ventilado (oferecendo maior risco); (5) e a infecciosidade da cepa *M. tuberculosis* (LEWINSOHN *et al.*, 2017).

## 2.4 Imunopatogenia

O *M. tuberculosis* é um microrganismo intracelular facultativo, de crescimento lento e aeróbio obrigatório, podendo se multiplicar dentro de macrófagos e de outras células do organismo (NORTH; JUNG, 2004). De início, o bacilo ao penetrar no pulmão, é fagocitado por um macrófago alveolar presente (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2005). Além disso, tem a capacidade de se manter vivo por anos no granuloma formado pela reação tecidual, porém quando as defesas do hospedeiro são reduzidas, ele pode se multiplicar e manter sua viabilidade (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2005).

Apesar dos macrófagos fagocitarem os bacilos e destruírem uma parte considerável deles, um número significativo consegue sobreviver, se multiplicando nos fagossomos, no citoplasma dos macrófagos ou na cavidade alveolar (BATES, 1980). Tal divisão e consequente crescimento é de maneira lenta, ocorrendo aproximadamente a cada 25 a 32 horas. Com uma taxa de crescimento em aproximadamente 2 a 12 semanas, alcançando um crescimento na potência de  $10^3$  a  $10^4$ , já suficiente para provocar uma resposta imune celular específica (LEWINSOHN *et al.*, 2017).

O granuloma tuberculoso é caracterizado pela presença de neutrófilos e macrófagos infiltrados, bem como um aumento gradual de linfócitos T (CD4+) e B que cercam os macrófagos infectados, células dendríticas e fibroblastos. Essas células

formam um agrupamento distintivo conhecido como granuloma tuberculoso (FERRAZ *et al.*, 2006; KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2005).

O granuloma é um mecanismo fundamental para limitar a disseminação do bacilo. Ele fornece um local para a interação entre linfócitos T e macrófagos ativados pelo IFN- $\gamma$ , que trabalham em conjunto para impedir a multiplicação do bacilo. No entanto, alguns bacilos permanecem viáveis por longos períodos, o que pode levar à reativação da doença latente (LEWINSOHN *et al.*, 2017).

Durante a infecção primária pelo bacilo, forma-se o complexo de Ghon primário, no qual se disseminam por meio da corrente sanguínea e linfática. Essa disseminação pode levar ao desenvolvimento de TBEP durante a infecção primária ou mais tarde na vida, durante a reativação da doença (TB secundária) (NATARAJAN *et al.*, 2020).

Indivíduos com TB/HIV frequentemente sofrem disseminação do bacilo, já que a incapacidade de formar o granuloma resulta em necrose pulmonar, tornando impossível conter o bacilo no sítio primário da infecção e, muitas vezes, levando ao acometimento de vários órgãos (LEWINSOHN *et al.*, 2017; MOUTINHO, 2011). Indivíduos com Infecção Latente pelo *M. tuberculosis* (ILTB - que não foi tratada) e que adquirem HIV correm o risco de desenvolver TB em uma taxa anual de cerca de 5% a 10% (CONDE *et al.*, 1999; LEWINSOHN *et al.*, 2017). Esses dados indicam a importância de um diagnóstico rápido de TB pulmonar em ambientes como hospitais, prisões e domicílios onde indivíduos infectados pelo HIV vivem em conjunto.

Em suma, a disseminação e evolução para a doença depende de múltiplos fatores relacionados à capacidade de virulência deste micro-organismo com o hospedeiro (imunidade, fatores genéticos, existência de outras doenças). A progressão para a TB ativa varia de acordo com o tipo de infecção, seja a primeira infecção ou uma reinfecção exógena. A ocorrência de TB ativa é mais comum em crianças, idosos e indivíduos imunodeprimidos. Mesmo indivíduos que já foram infectados pelo bacilo da TB e apresentam um teste tuberculínico positivo, podem ficar doentes se forem expostos continuamente à TB. Além disso, os bacilos latentes podem se tornar ativos mesmo após muitos anos (reativação endógena) (BLOOM; MURRAY, 1992).

## 2.5 Sinais e sintomas

Quando a infecção não é controlada e o processo pneumônico inflamatório tem início, os sintomas clínicos de tosse, expectoração, hemoptise, febre, sudorese noturna, anorexia e perda de peso aparecem. Esse processo inflamatório resulta em um infiltrado que pode sofrer cavitação e caseificação, tornando-se então um granuloma caseoso, mais comumente no lobo superior pulmonar direito. A cronicidade da inflamação pode levar à progressão do infiltrado para fibrose, o que causa a perda de elasticidade na área pulmonar afetada como sequela (FERRAZ *et al.*, 2006).

## 2.6 Prevenção e tratamento

Sem tratamento, a taxa de mortalidade por TB é alta. Estudos da história natural da TB na ausência de tratamento com drogas anti-TB (conduzidos antes do tratamento medicamentoso se tornarem disponíveis) descobriram que cerca de 70% dos indivíduos com baciloscopia positiva no escarro morreram em 10 anos após o diagnóstico, assim como cerca de 20% das pessoas com TB pulmonar com cultura positiva (mas baciloscopia negativa) (TIEMERSMA *et al.*, 2011).

Uma vacina é considerada a melhor solução para controlar a tuberculose. A Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), resultante de uma cepa virulenta de *M. bovis* atenuada, é a única vacina atualmente disponível para combater essa doença e vem sendo usada há mais de 80 anos. Ela está indicada para crianças de 0 a 5 anos, com peso  $\geq 2$  kg e que devem ser vacinados o mais precocemente possível, logo após o nascimento. A vacinação é a principal maneira de prevenção para as formas graves da doença, como TB miliar e meníngea. Embora possua esta eficiência, vários ensaios clínicos sugeriram que a BCG não previne a infecção com o bacilo da TB e é relativamente ineficaz na proteção de adultos contra a TBP (BRASIL, 2022; FERRAZ *et al.*, 2004).

Consequentemente, há uma necessidade urgente de vacinas mais eficazes. Novas estratégias experimentais têm se mostrado promissoras (FERRAZ *et al.*, 2004), mas o desenvolvimento de vacinas eficientes contra a TB depende claramente de uma compreensão completa da resposta imune exibida pelo hospedeiro contra esse patógeno (FERRAZ *et al.*, 2006).

Já para o tratamento, pode ser receitado terapias antibióticas com Isoniazida (H), Rifampicina (R) ou a associação dos dois rifampicina + isoniazida, sendo a posologia de acordo com o tipo de infecção e/ou manifestação (BRASIL, 2022).

## 2.7 Tuberculose extrapulmonar e oral

### 2.7.1 Aspectos clínicos

Tanto a TB pulmonar quanto a TBEP apresentam lesões conhecidas como tubérculos em qualquer sítio de infecção. Esta é uma reação inflamatória granulomatosa característica contra os bacilos provocada pela resposta imune mediada por células do hospedeiro. Estes tubérculos iniciam-se microscopicamente e se coalescem para se tornarem granulomas macroscopicamente visíveis. Os granulomas, caseosos ou não caseosos, contêm bacilos dentro dos macrófagos, exsudato alveolar rico em fibrina, linfócitos e células gigantes multinucleadas que estão próximas da borda fibroblástica (NATARAJAN *et al.*, 2020).

A TBEP se dá através da disseminação linfática e hematogênica, após a formação do complexo de Ghon primário, durante a infecção primária. O BAAR eventualmente pode entrar na corrente sanguínea e atingir diversos órgãos, o que pode levar ao desenvolvimento da TBEP durante a infecção primária ou mais tarde na vida durante a reativação da doença (TB secundária) (NATARAJAN *et al.*, 2020).

Na TBEP, o diagnóstico é frequentemente presuntivo por se tratar de uma forma paucibacilar. Além disso, ela é menos comum quando comparada à TBP, além de ser de difícil diagnóstico clínico. A taxa de acometimento da TBEP ainda é incerta (15-20% dos casos de TB), podendo se apresentar em maior número naqueles indivíduos infectados pelo HIV (até 50% dos casos de TB). Já o desenvolvimento da TB miliar é caracterizado por um extenso envolvimento dos órgãos por lesões granulomatosas (MEHTA *et al.*, 2012; NATARAJAN *et al.*, 2020). A TBEP pode ser diagnosticada em muitos órgãos do corpo, sendo o linfonodo o local mais comum. Porém, o envolvimento pleural, neurológico, sinovial, pericárdico, abdominal, geniturinário e oral tem sido descrito, o que mostra um expressivo potencial de disseminação (KHOSRAVI *et al.*, 2017; NATARAJAN *et al.*, 2020).

O acometimento oral é raro e é relatado em, aproximadamente, cerca de 1 a 1,5% dos casos de TBP. A manifestação primária oral é muito incomum, sendo geralmente secundária à infecção pulmonar. Os locais orais mais frequentemente afetados são língua, palato, amígdalas, faringe e mucosa bucal (KUMAR *et al.*, 2010).

Como hipóteses de inoculação da TB oral primária, o bacilo *M. tuberculosis* podem ser transferidos diretamente do escarro infectado ou leite de vaca cru infectado para as membranas mucosas orais. Além de outros focos de infecções, como a polpa aberta de dente cariado, ferida de extração, margem gengival ou perfuração de dente em erupção. Em consequente, a língua é o local mais comum para TB primária e 93% das lesões orais se apresentam como úlceras. Já a TB secundária pode ser explicada devido a via exógena, pelo próprio escarro infectado (através da tosse, por exemplo) ou endógena, pela disseminação hematogênica (KUMAR *et al.*, 2010; VAID *et al.*, 2010).

As lesões orais causadas pela TBEP geralmente apresentam uma aparência ulcerativa com um centro granulomatoso e um halo esbranquiçado, frequentemente localizadas no dorso da língua. Os sintomas da TB podem se manifestar como úlceras, nódulos, fissuras, tuberculomas ou granulomas, e as úlceras podem ser dolorosas ou não, apresentando uma superfície irregular e endurecida (KUMAR *et al.*, 2010).

### 2.7.2 Aspectos histológicos

A análise histopatológica é um método que tem a capacidade de detectar tanto a TBP quanto TBEP, usando tecidos afetados pelo *M. tuberculosis*. Em cerca de 80% dos casos de TBP, o padrão histopatológico típico é o granuloma com necrose caseosa, composto por histiócitos epitelioides, células gigantes multinucleadas e linfócitos. Em alguns indivíduos com sistema imunológico enfraquecido, granulomas não necróticos podem ocorrer quando a reação inflamatória não é completa. É importante considerar que a presença de granulomas sem necrose caseosa requer uma análise cuidadosa em conjunto com informações clínicas e epidemiológicas, pois outras doenças granulomatosas pulmonares e sistêmicas, como silicose, micoses e sarcoidose, podem apresentar características semelhantes. Apesar disso, a cultura seguida de testes bioquímicos ou moleculares é o único método de diagnóstico definitivo (BRASIL, 2011; ROSSATO SILVA *et al.*, 2021).

O diagnóstico das formas extrapulmonares é dificultado devido à natureza paucibacilar das amostras, à falta de quantidades ou volumes adequados de amostra e a sua distribuição para vários testes de diagnóstico (histologia/citologia, análise bioquímica, microbiologia e métodos de biologia molecular) (SILVA *et al.*, 2021). Ademais, também sendo necessárias técnicas de coloração especiais para evidenciação do BAAR, por exemplo pela técnica de ZN (KIM *et al.*, 2019).

### 2.7.3 Aspectos radiológicos tuberculose pulmonar e extrapulmonar

A radiografia de tórax é um importante meio de diagnóstico, mas alguns aspectos radiográficos da TB primária não são demonstrados em até 15% dos casos. Além disso, a Tomografia Computadorizada de Alta Resolução (TCAR) pode ser indicada em casos em que o indivíduo se encontra sintomático respiratório, mas com BAAR negativo no escarro ou incapazes de fornecer material para exames micobacteriológicos quando a radiografia é insuficiente para o diagnóstico (CONDE *et al.*, 1999).

Em lesões orais podem apresentar como coleções líquidas multiloculadas no assoalho da boca/regiões tonsilares e peritonsilares na Tomografia Computadorizada (TC) ou na Ressonância Magnética (RM) indicam formação de abscesso tuberculoso (VAID *et al.*, 2010).

## 2.8 Diagnósticos diferenciais da tuberculose oral

Com base no exame clínico, os diagnósticos diferenciais incluem úlcera aftosa maior, úlcera traumática, doenças granulomatosas além de outras infecções, causada por outros tipos de micobactérias ou não (KIM *et al.*, 2019).

O granuloma é um resultado do processo de defesa do organismo e cicatrização de feridas e é característico de doenças granulomatosas. Essas afecções podem ser classificadas em dois tipos: específicas, como hanseníase, leishmaniose, e não específicas, como granulomatose de Wegener e sarcoidose (FORNAZIERI *et al.*, 2008).

A forte pobreza, a desnutrição, a aglomeração domiciliar e outras doenças concomitantes em que as pessoas vivem em algumas regiões do Brasil permitem uma

maior disseminação de doenças infecciosas, incluindo granulomas específicos como hanseníase, leishmaniose cutaneomucosa, TB e Paracoccidioidomicose (PCM). Isso está relacionado ao ambiente social em que esses indivíduos vivem (FORNAZIERI *et al.*, 2008).

## 2.9 Métodos diagnósticos

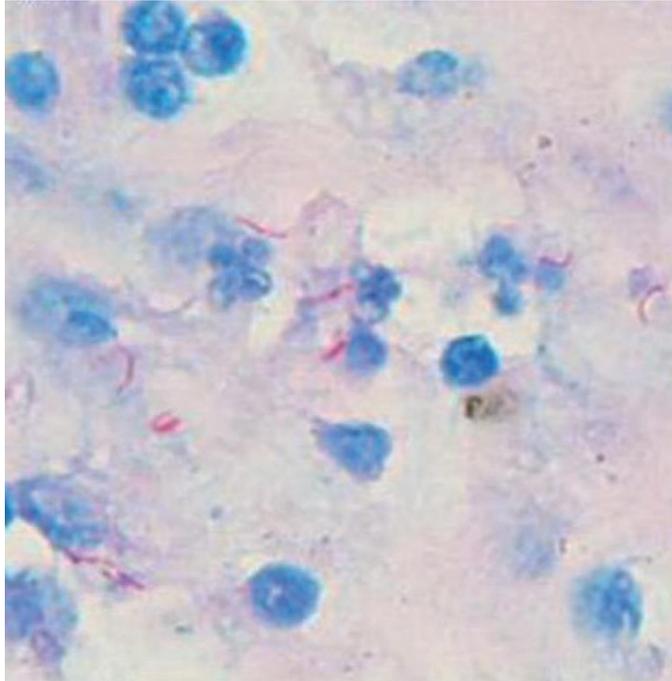
Ao se diagnosticar um indivíduo com TB, independentemente de qual tipo de teste ou critério utilizado, faz-se necessário a obrigatoriedade de se fazer um teste anti-HIV, visto que a prevalência de ambas as infecções é significativamente maior quando se relaciona a população soronegativa (BRASIL, 2022).

O diagnóstico definitivo da TB envolve a demonstração dos BAARs por métodos microbiológicos, cultura ou métodos moleculares. Além disso, o Teste Tuberculínico (TST), também é utilizado principalmente para detecção de ILTB e TB primária da infância (MEHTA *et al.*, 2012; NATARAJAN *et al.*, 2020). Além disso, para a TBEP, este diagnóstico deve também a partir de amostras de tecido geralmente por exame histopatológico que depende da presença de inflamação granulomatosa e necrose caseosa (MEHTA *et al.*, 2012).

### 2.9.1 Coloração de bacilos de álcool-ácidos resistentes - técnica de *Ziehl Neelsen*

Devido a parede celular do BAAR conter um alto teor de lipídios, a ligação com o corante fucsina é fortificada, tornando então incapaz de ser removido (descorado) pelo álcool e ácido. A presença do BAAR no esfregaço, aliada aos sinais e sintomas auxiliam no diagnóstico precoce. Esfregaços ácido-resistentes também são úteis no monitoramento da resposta ao tratamento (NATARAJAN *et al.*, 2020). É um método considerado simples e seguro, portanto, devendo ser realizado por todo laboratório público de saúde, também pelos privados tecnicamente habilitados (BRASIL, 2011). Este padrão de coloração é evidenciado na Figura 2.

Figura 2 – Padrão de coloração do bacilo *Mycobacterium tuberculosis* pela técnica de Ziehl Neelsen



Legenda: Coloração de Ziehl Neelsen de uma amostra de tecido de tuberculose  
Fonte: SHAMAEI *et al.*, 2017, p. 239. (adaptado)

Considerando a TBP, quando realizada de forma adequada em todas as suas etapas, a baciloscopia do escarro pode identificar entre 60% e 80% dos casos em adultos, constituindo um aspecto epidemiológico relevante, pois os casos com resultado positivo da baciloscopia são os principais responsáveis pela propagação da doença. No entanto, em crianças, a eficácia da baciloscopia é consideravelmente reduzida devido às dificuldades na obtenção de uma amostra de qualidade (BRASIL, 2011).

Um dos principais esfregaços ácido-resistentes é a coloração de ZN, sendo ela confiável, reprodutível e econômica. Porém, um dos principais problemas deste método, deve-se ao fato de que a microscopia de esfregaço tem valores de sensibilidade baixos e variáveis (0 e 40%). Além disso, a baciloscopia apresenta menor sensibilidade em indivíduos com a coinfeção por HIV (de 20-60%) (MÉNDEZ-SAMPERIO, 2017).

É uma técnica relativamente menos sensível, detectando BAARs apenas quando há  $10^4$  micobactérias por ml, e não consegue diferenciar entre *M. tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas, como por exemplo outras doenças granulomatosas como sarcoidose, hanseníase e lúpus eritematoso sistêmico (BENNEDSEN *et al.*, 1996; MEHTA *et al.*, 2012; NATARAJAN *et al.*, 2020). A técnica de baciloscopia para

outros materiais biológicos, além do escarro, também está indicada na suspeição clínica de TBEP. As análises dos resultados dos exames diretos são descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Leitura e interpretação de resultados de baciloscopias de outros materiais biológicos

<b>Achados</b>	<b>Resultado</b>
Não são encontrados bacilo álcool-ácido resistente no material examinado	Negativo
São encontrados bacilo álcool-ácido resistente em qualquer quantidade no material examinado	Positivo

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2011, p. 55.

### 2.9.2 Cultura

A realização de cultura em meios sólidos e/ou líquidos é considerada o padrão ouro para o diagnóstico definitivo de TB pela OMS. É indicada também na suspeita de TBEP (SILVA *et al.*, 2021). Para materiais respiratório, apresentam sensibilidade em torno de 80% e especificidade de 98%, através da cultura. Quando a TBP apresenta uma baciloscopia negativa, a cultura pode aumentar a detecção da doença em 20-40% (LEWINSOHN *et al.*, 2017). A identificação de cultura para *M. tuberculosis* são muito mais sensíveis porque menos bacilos (10 e 100 bacilos/ml de material concentrado) podem ser detectados. Já em diferentes amostras extrapulmonares a sensibilidade varia entre 0 e 80% com tempo de resposta relativamente longo, de 4 a 8 semanas (MEHTA *et al.*, 2012; NATARAJAN *et al.*, 2020).

### 2.9.3 Imuno-histoquímica

Alguns anticorpos foram desenvolvidos para auxílio no diagnóstico e presença do *M. tuberculosis*. O anticorpo policlonal anti-BCG (pAbBCG) foi criado a partir do sonificado da cepa BCG de *M. bovis* (coloração de Copenhagen), que contém antígenos bacterianos solúveis e insolúveis. Esse anticorpo tem se mostrado especialmente útil na identificação de organismos envoltos por células inflamatórias densas (KUTZNER *et al.*, 1998). Embora esse anticorpo não seja capaz de detectar vírus, espiroquetas e protozoários (como a Leishmania), ele tem sido efetivamente utilizado na detecção de diversos micro-organismos bacterianos e fúngicos. O anticorpo anti-*M. bovis* (BCG) possui alta sensibilidade e mínima coloração de fundo,

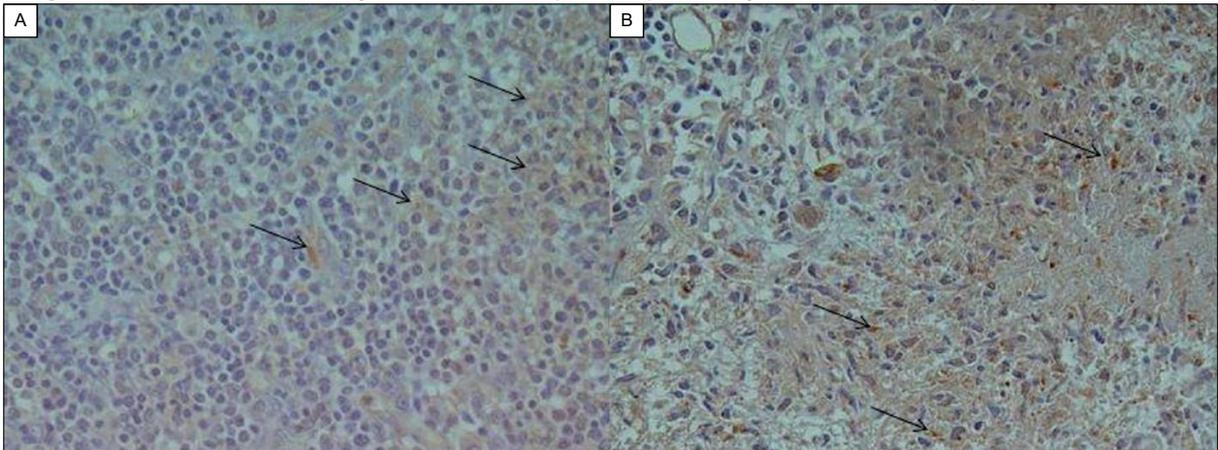
e não reage com detritos e estruturas normais da pele, tornando-se uma ferramenta de triagem ideal para identificar uma ampla gama dos patógenos microbianos cutâneos mais comuns (SHAMAEI *et al.*, 2017).

Já o anticorpo anti-*Mycobacterium tuberculosis*, Anticorpo Policlonal Derivado de Proteína Purificada (pAbPPD) é reativo com *M. tuberculosis*, *M. parafortuitum*, *M. phlei* e *M. avium* e não apresenta reatividade para outros microrganismos, como por exemplo *Salmonella typhimurium*, *E. coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Neisseria meningitides* e *Streptococcus* (grupo B) (SHAMAEI *et al.*, 2017).

Os padrões de coloração do pAbPPD, podem ser divididos em granulomas com padrão de coloração granular fino e grosso, que irá depender de suas características de coloração. O padrão granular fino é caracterizado pela observação de células consistentes e difusas de cor marrom, enquanto o padrão de grânulos grossos é causado pela presença de bacilos fragmentados vistos dentro ou ao redor do granuloma e em forma de grânulos e sólidos em ordem decrescente tanto no citoplasma de células gigantes/epitelioides quanto na área caseosa (FIGURA 3) (KOHLI *et al.*, 2014; SHAMAEI *et al.*, 2017). Outro padrão pode ser caracterizado pela presença/ausência de poeira antigênica na área caseosa e no citoplasma de células gigantes/epitelioides. Esta poeira pode ser observada como o padrão predominante, seguida pela poeira antigênica na área caseosa. Ademais, mais de um padrão frequentemente pode estar presente em áreas diferentes ou na mesma área em uma seção específica (KOHLI *et al.*, 2014). Além disso, vale ressaltar que, como este anticorpo não apresenta forte reatividade cruzada com antígenos de *M. bovis*, a vacinação com BCG pode não interferir nos resultados (SHAMAEI *et al.*, 2017).

Estudos de Shamaei e seus colaboradores, em 2017, sugere que os antígenos derivados de proteínas purificadas podem estar presentes nas células do tecido, mesmo quando o DNA do bacilo não pode ser detectado pelo método genômico micobacteriano mais comumente usados. A sensibilidade da técnica de IHQ é influenciada por diversos fatores, tais como a distribuição do antígeno micobacteriano no interior do granuloma, o estágio clínico da doença, o tempo de tratamento anti-TB recebido antes da realização da biópsia e a especificidade do anticorpo utilizado como reagente primário (KOHLI *et al.*, 2014).

Figura 3 – Padrão de marcação imuno-histoquímica pela reação com anticorpo policlonal anti-PPD



Legenda: A: Positividade citoplasmática em plasmócitos e linfócitos, imunocoloração de reação não granulomatosa de caso de TB mostrando citoplasma manchado de marrom como coloração fina e homogênea sugere pó de antígeno fino de produtos micobacterianos; B: positividade dentro ou em proximidade de macrófagos epitelioides como coloração não homogênea sugerindo bacilos fragmentados observados dentro ou ao redor de granuloma necrosado de caso TB  
 Fonte: adaptado de SHAMAEI *et al.*, 2017, p. 239.

#### 2.9.4 Teste rápido molecular de tuberculose

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é atualmente o preferido método para identificação de TBEP, pois este método é rápido e mostrou-se sensível à detecção de bactérias em espécimes paucibacilares (CHAKRAVORTY; SEN; TYAGI, 2005) além de ser um método rápido e sensível para detecção de *M. tuberculosis* específico em diferentes espécimes biológicos (CRUZ *et al.*, 2011).

O método da PCR possui algumas vantagens em relação aos outros, principalmente ao fato de ser sensível e rápido, podendo detectar o número de bacilos em espécimes em que este é menor que 10 (entre 1 e 10 bacilos/ml); determina de maneira rápida se o BAAR foi identificado é *M. tuberculosis* ou micobactérias atípicas; além de identificar a presença de modificações genéticas conhecidas como associados à resistência aos medicamentos. Já em contrapartida, o método apresenta algumas desvantagens principalmente pelas reações falso-positivas - devido à contaminação; reações falso-negativas - devido à presença de inibidores que podem interferir com o PCR; além de amplificação de DNA de bacilos vivos e mortos (NATARAJAN *et al.*, 2020).

Em um estudo de revisão de literatura em 2012 de Mehta e seus colaboradores, foi relatado que as técnicas moleculares são capazes de detectar sequências de nucleotídeos exclusivas do *M. tuberculosis* em amostras extrapulmonares

rapidamente. Além disso, o diagnóstico pode ser feito utilizando diferentes alvos genéticos descrito por vários autores. Destes, como por exemplo os genes IS6110, rpoB, gene 16S rRNA, gene de proteína de 65 kDa (Rv0440), devR (Rv3133c), gene de proteína MPB-64/MPT-64 (Rv1980c), gene de proteína de 38 kDa (Rv0934), TRC4 (elemento repetitivo conservado) GCRS (sequência repetitiva rica em guanina-citosina), hupB (Rv2986c), *dnaJ* (Rv0352), gene da proteína MTP-40 (Rv2351c) e gene PPE (Rv0355) foram empregados em ensaios de PCR (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2008; GARCÍA-ELORRIAGA *et al.*, 2009; HALDAR *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2000).

Dentre todos, o gene mais amplamente utilizado em testes de PCR é o IS6110, devido a presença de suas múltiplas cópias no genoma do complexo MTB, que se acredita conferir maior sensibilidade (MEHTA *et al.*, 2012). Para evitar a contaminação durante a amplificação e aumentar a sensibilidade destes testes, pode ser utilizado o método *nested*-PCR, que é levado em consideração, sendo este, a amplificação em dois passos principalmente para o diagnóstico de TBEP (MEHTA *et al.*, 2012; NATARAJAN *et al.*, 2020).

#### 2.9.4.1 *Nested*-PCR

Mesmo que a PCR convencional seja útil para a detecção do bacilo *M. tuberculosis*, alguns autores descrevem um procedimento que associa duas PCRs, chamado de *nested*-PCR, consistindo na reamplificação após diluir os inibidores para melhorar o rendimento, resultando em uma maior combinação de sensibilidade e especificidade (CRUZ *et al.*, 2011; MIYAZAKI *et al.*, 1993).

Por ser um desafio para os patologistas diagnosticar a infecção pelo bacilo *M. tuberculosis* com base apenas na histologia, os testes de NAA podem ser úteis. As sensibilidades dos testes moleculares comerciais na detecção destes bacilos em tecidos fixados em parafina variam muito e foram relatadas em até 95% (FU *et al.*, 2016; MEHTA *et al.*, 2012).

#### 2.9.4.2 GeneXpert® MTB/RIF System

Devido todas as limitações, o ensaio GeneXpert® MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, Califórnia, Estados Unidos), um sistema de PCR semi-*nested* totalmente automatizado em tempo real, foi endossado pela OMS como o teste mais rápido para o diagnóstico de TBP. Lançado em 2004, este sistema tem como objetivo simplificar os testes moleculares ao integrar e automatizar completamente os três processos necessários para testes baseados em PCR em tempo real, incluindo a preparação, amplificação e detecção de espécimes. O sistema é composto por um instrumento, um computador pessoal, um leitor de código de barras e um software pré-instalado, além de cartuchos descartáveis que contêm reagentes liofilizados, tampões e lavagens. A detecção e caracterização do alvo são realizadas em tempo real com o auxílio de um dispositivo de detecção a laser de seis cores (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Este teste molecular é simples e robusto o suficiente para ser introduzido e usado fora das configurações laboratoriais convencionais. O Xpert® MTB/RIF detecta o bacilo *M. tuberculosis*, além de mutações que conferem resistência à rifampicina. Para isto, utilizam três primers específicos e cinco sondas moleculares exclusivas para garantir especificidade. O ensaio fornece resultados em menos de 2 horas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Além disso, o sistema GeneXpert® MTB/RIF tem sensibilidade comparável à cultura e pode ser usado para determinar o diagnóstico de TBEP a partir de amostras frescas (ALLAHYARTORKAMAN *et al.*, 2019).

Para análises dos resultados para o Xpert® MTB/RIF pode indicar que o *M. tuberculosis* não foi detectado, o *M. tuberculosis* foi detectado e não era resistente à rifampicina (ou seja, é suscetível à rifampicina) ou que o *M. tuberculosis* foi detectado e era resistente à rifampicina. Uma pequena proporção de testes pode resultar em erro ou resultado inválido (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar a presença do bacilo de *M. tuberculosis* em lesões sugestivas de TB oral utilizando métodos histológicos e moleculares.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Investigar a presença do bacilo *M. tuberculosis* em biópsias bucais que apresentam reação inflamatória granulomatosa, contendo necrose caseosa, através da coloração de ZN;
- Averiguar a presença do bacilo *M. tuberculosis* em biópsias bucais que apresentam reação inflamatória granulomatosa, contendo necrose caseosa através da reação de IHQ utilizando o anticorpo policlonal pAbPPD;
- Pesquisar a amplificação do gene IS6110 através da reação de *nested*-PCR para avaliar a presença do *M. tuberculosis* em amostras de biópsias bucais que apresentam reação inflamatória granulomatosa, contendo necrose caseosa;
- Pesquisar a amplificação do gene *rpoB* e mutação para análise de resistência da rifampicina utilizando o sistema GeneXpert® MTB/RIF para avaliar a presença do *M. tuberculosis* em amostras de biópsias bucais que apresentam reação inflamatória granulomatosa, contendo necrose caseosa.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Submissão ao comitê de ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e aceito sob o número CAAE: 56476622.6.0000.5149 e com o Número do Parecer: 5.429.194.

### 4.2 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAO-UFMG), Laboratório de Biologia Integrativa no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG) e no Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Medicina da UFMG, todos situados no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

### 4.3 Delineamento do estudo

Trata-se de uma pesquisa transversal e retrospectiva de uma série de casos, com aspecto populacional. As amostras elegidas foram de indivíduos que fizeram biópsias de tecido mole, utilizando amostras fixadas em parafina.

### 4.4 Obtenção de amostra dos indivíduos

Para seleção das amostras, inicialmente foram coletados os dados dos indivíduos no Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial, FAO-UFMG, sendo consideradas aquelas com hipótese clínica de Tuberculose oral (TB oral) e/ou laudadas histologicamente como TB oral ou sugestivo de TB oral. Ademais, foram considerados aqueles que possuíam a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Através de informações armazenadas no sistema digital, no Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da FAO-UFMG, foram coletadas as seguintes informações dos indivíduos selecionados: idade, sexo, tipo da lesão, cor da lesão, sintomatologia,

tipo de biópsia, status de HIV, localização, tempo de evolução (meses), tamanho (em mm), outras observações, diagnóstico clínico, quadro macroscópico, microscopia, diagnóstico, data, ano e origem.

Somente amostras armazenadas em blocos de parafina contendo quantidades suficientes de tecido para os experimentos e que apresentavam reação inflamatória granulomatosa, contendo necrose caseosa, foram selecionadas. Colorações especiais pelo PAS e coloração pelo Grocott foram realizadas para exclusão de outras doenças infecciosas.

Os casos em que não havia material disponível ou com dados clínicos incompletos foram excluídos.

#### 4.5 Diagnósticos histológicos – Hematoxilina e Eosina; coloração de bacilo álcool-ácido resistente – Ziehl Neelsen

Lâminas histológicas dos casos selecionados foram submetidas a coloração pelo ZN. Na técnica de ZN, todos os elementos celulares são inicialmente corados de vermelho com a fucsina. Em seguida elas são submetidas a descoloração com o álcool e ácido, ficando somente os BAAR com a coloração preservada em vermelho. Após isso, os demais elementos celulares na amostra são corados utilizando azul de metileno para que haja um contraste necessário. Assim, os elementos celulares ficam a coloração em azul e os BAAR continuarão em vermelho.

Todas as lâminas coradas em H&E e ZN foram revisadas por 3 observadores (R.S.O.S., V.F.B. e R.S.G.) para a confirmação ou exclusão da presença do BAAR.

#### 4.6 Imuno-histoquímica

Para avaliação da presença de *M. tuberculosis* em amostras orais fixadas em parafina foram realizadas reações de IHQ em todas as amostras selecionadas deste estudo seguindo protocolo padrão. Foi utilizado o Anticorpo Policlonal Derivado de Proteína Purificada (pAbPPD – BIO SB, Santa Bárbara, CA, EUA – RUO, *for Research Use Only*), sob número de catálogo BSB 2995.

Foram utilizadas lâminas contendo três cortes de 3µm da amostra uma lâmina de vidro silanizada (StarFrost, Knittel Glass, Germany) a depender do tamanho do

fragmento de tecido. Toda sequência do protocolo realizado está listada em resumo abaixo.

#### Desparafinização e recuperação antigênica:

1. Inicialmente foi realizada a desparafinização em 03 banhos de xilol (Xilol I, II e III) por 30 minutos cada. Seguidos então por quatro banhos em álcool, 10 minutos cada, iniciando por dois banhos em álcool absoluto, um banho em álcool 95% e posteriormente em álcool 80%;
2. Posteriormente, a recuperação antigênica foi realizada em *steamer* a 90°C com as amostras encubadas em Ácido Cítrico, pH 6,0, por 20 minutos, sendo posteriormente transferido para uma nova solução de tampão de citrato a temperatura ambiente, por 20 minutos. Após 5 lavagens consecutivas em água destilada, realizamos o bloqueio da peroxidase endógena das amostras por meio de incubação dos cortes em uma solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 20v por 10 minutos 2 vezes. Em seguida, realizamos novamente 5 lavagens consecutivas com água destilada e, logo depois, 3 banhos de 5 minutos cada com solução de TRIS-HCl 20 mM pH 7,4.

#### Marcação do anticorpo:

3. Em seguida foi realizada a marcação da área de interesse com a caneta hidrofóbica *dakopen* (Dako Denmark A/S, Denmark), seguida da incubação com o anticorpo primário (pAbPPD – BIO SB, Santa Bárbara, CA, EUA), em diluição 1:500 em solução diluente *Envision+ Antibody Diluent* (Dako Denmark A/S, Denmark) em uma câmara escura em ambiente úmido sob agitação em baixa velocidade por 1h. Após este período foram realizadas 3 lavagens com tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4 por 5 minutos cada;
4. Adiante, a marcação com anticorpo secundário foi realizada com o sistema a base de polímero *Dako EnVision®+Dual Link System-HRP* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), sendo incubado em câmara escura em ambiente úmido sob agitação em baixa velocidade por 30 mins. Posteriormente, realizamos mais 3 novas lavagens com tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4 por 5 minutos cada.

#### Evidenciação da reação e montagem das lâminas

5. Após isto, foi realizada a incubação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB - Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) por aproximadamente 5 minutos, ajustado de acordo com a inspeção visual. Após lavagem em água corrente, por 5 minutos, realizamos a contra coloração com hematoxilina de Mayer por 1 minuto, seguidos por uma nova lavagem em água destilada. Em seguida, fizemos uma rápida passagem em solução aquosa de hidróxido de amônio e, em seguida, 5 banhos de água destilada;
6. Após a desidratação em cadeia ascendente de etanol (70%, 90% e 3 vezes a 100% - Merck), diafanização em dois banhos de xilol, as lâminas foram montadas com lamínulas de vidro e meio de montagem Entellan (Merck).

Os controles negativos consistiram na omissão do anticorpo primário.

Os resultados das reações de IHQ também foram avaliados por três observadores (R.S.O.S., V.F.B. e R.S.G.) em microscópio óptico de luz (Zeiss). Toda a extensão das lâminas foi avaliada e a marcação foi considerada positiva quando em toda região próxima, ao redor ou por dentro do granuloma fosse observado o padrão granular grosso, onde seriam observados os bacilos *M. tuberculosis* fagocitados e/ou fragmentados. O padrão de granulação fino foi também avaliado.

As lâminas então foram escaneadas em um aumento de 40x, utilizando Panoramic MIDI Digital Slide Scanner (3DHistech, Hungary) e as imagens foram visualizadas e capturadas utilizando o aplicativo Case Viewer v.2.3. (3DHistech).

## 4.7 Diagnóstico por método molecular

### 4.7.1 *nested*-PCR

#### 4.7.1.1 Revisão de literatura para desenho dos primers

Para determinação e desenho dos primers internos e externos, foi feita uma breve revisão de dados publicados na literatura, onde foram realizadas reações de PCR para determinação e avaliação dos diagnósticos de TBEP em várias regiões do organismo. Foram levadas em consideração para seleção dos artigos aqueles que apresentavam as seguintes informações:

- Referência utilizada;
- Tipo de TBEP - região do organismo;
- Tipo de teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos (NAAs test) – PCR, *nested*-PCR, qPCR, Droplet Digital PCR (ddPCR) ou GeneXpert® MTB/RIF;
- Gene Alvo;
- Primers utilizados;
- Tamanho do Amplicon;
- Temperatura de anelamento (°C);
- Sensibilidade;
- Especificidade.

Os resultados da busca foram apresentados em forma de quadro sendo encontrado nos Apêndices (APÊNDICE D – QUADRO 4).

#### 4.7.1.2 Extração do DNA

Inicialmente foram realizados 10 a 15 cortes de 5µm das amostras de tecido, em seguida colocados em tubos eppendorf de 1,5ml. O DNA genômico (gDNA) foi extraído das amostras de tecidos fixados em parafina utilizando o QIAamp DNA *FFPE Tissue kit* (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. A desparafinização foi feita usando um método de xilol modificado. Este método envolveu duas lavagens em 1 mL de xilol e uma lavagem em 1 mL de etanol absoluto. Então seguido de um tempo de 5 minutos com a tampa do tubo aberta para secar o *pellet* de tecidos. Posteriormente foram digeridas com proteinase K (QIAGEN, Hilden, Germany) a 56°C, *overnight*. O gDNA foi isolado conforme recomendações do fabricante do kit.

A análise da concentração e da qualidade do gDNA obtido foi realizada por meio do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

#### 4.7.1.3 Reação em cadeia da polimerase em dois passos (*nested*-PCR)

Foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação da região de interesse correspondente ao gene IS6110, (GenBank: NC\_000962.3). Os iniciadores *Forward* (F) e *Reverse* (R) para a região de interesse foram desenhados (primers externos e interno) de acordo com estudos prévios e apresentados no Quadro 4.

Para ambas as reações da PCR foram utilizados um volume final de 25µl, 10µM de cada iniciador e 12,5 µl de MyTaq HS Red Mix, 2x (Bioline Reagents Ltd, UK). Todas as reações foram realizadas na Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Waltham, Massachusetts, USA) e as condições para os ciclos de PCR para o alvo IS6110 foram ajustadas para permitir uma melhor amplificação do gDNA. As reações de PCR foram conduzidas utilizando as amostras extraídas e controle negativo (reação sem gDNA) em cada etapa realizada.

Para segunda amplificação, o primeiro amplicon do PCR serviu como modelo para a amplificação aninhada (nPCR) de um fragmento de determinado pb dentro da sequência inicial do gene alvo usando um par interno de primers. Os iniciadores de ambas as reações foram evidenciados na Tabela 1.

Tabela 1 - Primers utilizados e parâmetros da reação.

Primers	Produto	Temp. Anelamento	Ciclos
<b>1ª PCR</b>			
5'CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG3'	123 pb	55°C	45
5'CTC GTC CAG CGC TTC GG3'			
<b>2ª PCR</b>			
5'TTC GGA CCA GCA CCT AA3'	92 pb	55°C	45
5'TCG GTG ACA AAG GCC ACG TA3'			

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Os padrões de temperatura de acordo com o recomendado pela MyTaq HS Red Mix, 2x (Bioline Reagents Ltd, UK) foi realizado por uma etapa de ativação inicial de aquecimento a 95°C por 3 min, seguido então pelos 45 ciclos variando de 15s a 95°C (desnaturação), 15s a 55°C (anelamento), 30s a 72°C (extensão) e uma extensão final a 72°C por 10 min e uma temperatura de 4°C como Hold. Esse protocolo foi utilizado para todas as amplificações de PCR.

A amplificação dos produtos da *nested*-PCR foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 3% com utilização de um marcador para fluorescência das bandas (SYBR® Safe DNA gel stain; invitrogen by Thermo Fisher Scientific) por 90 minutos e visualizados no iBright Imaging Systems 750 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Foram considerados positivos aqueles que apresentaram bandas positivas de peso molecular de 92 pb, analisadas em comparação ao padrão Ladder 100 PB (Ludwig Biotecnologia LTDA, Alvorada, Brasil).

#### 4.7.2 GeneXpert® MTB/RIF system

##### 4.7.2.1 Desparafinização dos tecidos

Para desparafinização, inicialmente foram realizados 10 a 15 cortes de 5µm das amostras de tecido fixados em parafina, em seguida colocados em tubos *ependorf* de 1,5ml. Os tubos foram centrifugados brevemente, com intuito de decantar todo material. As amostras foram desparafinizadas utilizando 160µl ou 320µl de solução desparafinizadora (QIAGEN, Hilden, Germany) e então agitadas vigorosamente com vórtex por 10s, e posteriormente uma breve centrifugação. Em seguida levados ao banho seco à 56°C durante 15 min, após este período, deixados 5 min para atingir a temperatura ambiente (15-25°C). Uma nova centrifugação por 1 min a 11.000 x g (10.000 rpm) foi realizada para formação do *pellet* de tecido. Então foi retirada a solução desparafinizadora e lavado o *pellet* com 320µl solução salina estéril (Soro Fisiológico - NaCl 0,9%), repetindo a breve agitação, centrifugação de 1 min a 11.000 x g (10.000 rpm) e remoção da solução salina. Foi então colocado novamente 320µl de solução salina estéril e transferido o material do tubo para o gral de cerâmica e então macerado todo tecido com pistilo até uma consistência líquida. Foi retirado todo conteúdo de tecido macerado do gral e colocado em um novo tubo *ependorf* de 1,5ml e então foi lavado o gral novamente com mais 320µl de solução salina estéril, com intuito de aspirar todo fragmento presente no gral e colocado no mesmo tubo *ependorf*, sendo o volume final de no mínimo 500µl.

##### 4.7.2.2 Extração do DNA, amplificação do DNA e resultado

Toda etapa foi realizada no Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Medicina da UFMG.

O Sistema GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, CA), Nº de catálogo: GXMTB/RIF-10, é um dispositivo de diagnóstico integrado controlado por software e

um termociclador quantitativo integrado baseado em fluorescência, que permite o processamento de amostras e a análise de PCR em tempo real em um único passo, sem a necessidade de intervenção manual. O ensaio GeneXpert® MTB/RIF é composto por dois componentes principais:

- I. O cartucho plástico Xpert MTB/RIF, que contém tampões de processamento de amostras líquidas e de PCR, bem como reagentes de PCR em tempo real liofilizados;
- II. O instrumento GeneXpert®, que controla a fluidodinâmica intracartucho e realiza a análise de PCR em tempo real.

O intuito do ensaio Xpert MTB/RIF é amplificar uma sequência do gene *rpoB* específica para membros do complexo MTB e sondar mutações dentro do gene *rpoB* para Tuberculose Resistente a Rifampicina (TBRR). As sequências dos iniciadores *rpoB* do *M. tuberculosis* e dos beacons moleculares específicos para *rpoB* foram descritas para permitir o uso de PCR hemianinhada (EL-HAJJ *et al.*, 2001; HELB *et al.*, 2010; RAJA *et al.*, 2005).

Ele se conecta com os cartuchos descartáveis de uso único para realizar o isolamento de ácido nucleico e QRT-PCR. O cartucho Xpert baseado em microfluídica é composto por várias câmaras projetadas para conter a amostra biológica em tampão de lise, tampões de purificação e eluição, além de todos os reagentes de RT-PCR, enzimas e tampões necessários. Ele também é capaz de reter todos os resíduos de processamento de amostras. Além disso, o cartucho tem um tubo de PCR anexado com conexões fluidas aos reagentes presentes nas câmaras do cartucho. Quando inserido no GeneXpert®, o tubo de PCR é cercado por placas de aquecimento/resfriamento e blocos ópticos que permitem a amplificação e a detecção em tempo real dos produtos de PCR baseada em fluorescência (RAJA *et al.*, 2005).

Os resultados do sistema GeneXpert® MTB/RIF, após seu processamento podem ser exibidos como negativo para a presença do *M. tuberculosis* e negativo para a resistência à rifampicina; positivo para a presença do *M. tuberculosis* e negativo para a resistência à rifampicina e positivo para a presença do *M. tuberculosis* e positivo para a resistência à rifampicina

#### 4.8 Análise estatística

Os dados das variáveis qualitativos e quantitativos coletados dos indivíduos e os resultados obtidos através da confirmação diagnóstica pelos testes foram tabulados em planilha no software Excel® (Microsoft 365). A análise estatística descritiva (incluindo distribuição de frequência e porcentagens) foi realizada para os dados dos resultados obtidos no programa Statistical Package for the Social Sciences® (SPSS), version 20.0 (IBM Inc., Armonk, EUA).

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos estão apresentados abaixo e também foram escritos sob forma de artigo científico submetido ao periódico *Oral Diseases* (APÊNDICE E).

### 5.1 Seleção das amostras

A Figura 4 representa o fluxo de seleção das amostras, levando em consideração os critérios de seleção e exclusão relatado na metodologia.

Figura 4 – Fluxograma metodológico de seleção de amostras do estudo

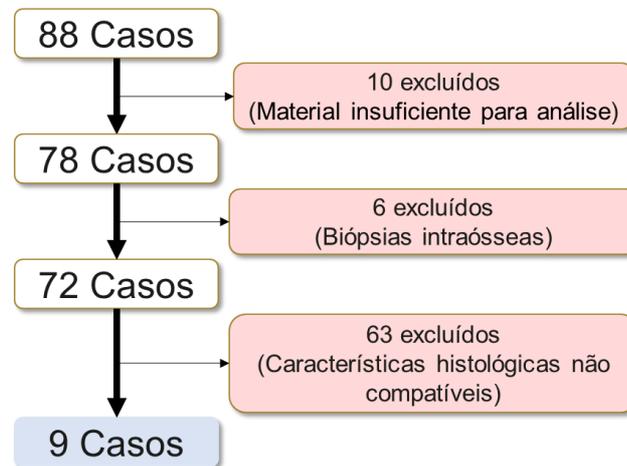


Imagem esquemática da sequência para seleção das amostras deste estudo  
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

O material que foi insuficiente para análise deveu-se ao fato de que algumas amostras em fixadas em parafina não foram encontradas no arquivo da FAO-UFMG e algumas não possuíam material suficiente para todas as análises necessárias. As características histológicas compatíveis ou não, foram levadas em consideração principalmente a presença ou ausência do granuloma com necrose caseosa, uma vez que pode ser um indicativo da presença do *M. tuberculosis*. Ademais, foram levadas em consideração as características clínicas descritas nas fichas aliadas a morfologia tecidual, onde muitos casos não colaboravam com a hipótese de TB oral e algumas foram de regiões intraósseas.

Após todos os critérios de inclusão e exclusão aplicados, as amostras selecionadas foram apresentadas na Tabela 2, onde os diagnósticos clínicos e

histológicos estavam relatados nas fichas arquivadas pelo Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial.

Tabela 2 – Diagnóstico clínico e histológico das amostras selecionadas

<b>Amostra</b>	<b>Diagnóstico Clínico</b>	<b>Diagnóstico Histológico</b>
<b>1*</b>	-	Tuberculose
<b>2*<sup>1</sup></b>	-	Tuberculose
<b>3*<sup>1</sup></b>	-	Tuberculose
<b>4</b>	Granulomatose orofacial.	Inflamação granulomatosa.  Nota: Considerar a hipótese de granulomatose orofacial, doença de Crohn, Sarcoidose, Tuberculose e doença granulomatosa crônica.
<b>5</b>	Cisto epidermóide.	Sugestivo de tuberculose.
<b>6</b>	CCE	Lesão granulomatosa.  Nota: sugere-se investigação clínica para descartar possibilidade de tuberculose.
<b>7<sup>2</sup></b>	CCE ou Lesão infecciosa	Reação inflamatória crônica granulomatosa.  Nota: apesar da coloração Ziehl Neelsen não ter demonstrado bacilos, não está descartada a possibilidade de tuberculose.
<b>8<sup>2</sup></b>	CCE ou Lesão infecciosa	Reação inflamatória crônica granulomatosa.  Nota: apesar da coloração Ziehl Neelsen não ter demonstrado bacilos, não está descartada a possibilidade de tuberculose.
<b>9</b>	CCE	Processo inflamatório crônico granulomatoso.  Nota: avaliação clínica e laboratorial é necessária para confirmação de diagnóstico.

(-): não informado;

\*Amostras onde que não foram relatados outro tipo de coloração especial ou características clínicas que colaboravam para o diagnóstico;

<sup>1,2</sup> Amostras de um mesmo indivíduo;

Abreviações: CCE: Carcinoma de Células Escamosas;

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

## 5.2 Dados clínicos-patológicos

Na Tabela 3 observa-se a descrição dos dados clínicos detalhados de todas amostras obtidas entre os anos de 1953 e 2022 e que foram incluídas nos experimentos.

Tabela 3 – Características clínico-patológicas de cada indivíduo da amostra

Casos	Idade (anos)	Sexo	Lesão	Cor da lesão	Sintomatologia	Biópsia	HIV Status	Localização	Evolução (meses)	Tamanho (mm)	Observações clínicas
1	19	Masc.	Tumor	-	-	-	-	Mandíbula	6	-	-
2 <sup>1</sup>	43	Masc.	Úlcera	-	-	I	-	Sublingual	3	-	-
3 <sup>1</sup>			Úlcera	-		I		Comissura labial			
4	49	Fem.	Tumor	Semelhante à Mucosa Bucal	-	I	-	Mucosa jugal	2	-	-
5	38	Masc.	Cística	-	-	E	HIV+	Assoalho bucal - bilateral	Ind	60	-
6	89	Fem.	Úlcera	Eritematosa	S	I	-	Borda de língua	0,26	25	-
7 <sup>2</sup>	41	Masc.	Úlcera	Eritematosa	S	I	-	Borda de língua (terço posterior)	Ind	10	Paciente em situação de rua; Achados pulmonares sugestivos de TBP
8 <sup>2</sup>			Úlcera	Eritematosa		I		Borda lateral de língua (ápice de língua)			
9	71	Masc.	Úlcera	-	AS	-	-	Rebordo alveolar mandibular	-	5	-

(-): não informado;

<sup>1,2</sup> Amostras de um mesmo indivíduo;

Abreviações: AS: assintomático; E: excisional; Fem.: Feminino; HIV+: Indivíduo convivendo com o Vírus da Imunodeficiência Humana; I: Incisional; Ind: Indeterminada; Masc.: Masculino; S: Sintomático; TBP: Tuberculose Pulmonar;

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Na Tabela 5 (APÊNDICE C) observa-se todos dados de frequência. Em relação aos dados do total dos indivíduos diagnosticados ou sugestivos de TB oral, a idade variou de 19 a 89 anos, com média de 50 anos ( $\pm 23,08$ ) tendo a maior taxa de acometimento entre a 3ª a 6ª décadas de vida (n=4). Também, maior acometimento em indivíduos do sexo masculino (n=5), com uma taxa de 2,5:1. A média de tempo de evolução da doença foi de 2,81 meses, variando de 0,26 mês (8 dias) a 6 meses. Já em relação ao tamanho, a média foi de 22 mm, variando de 5 a 60mm, com a maior taxa de acometimento com aqueles indivíduos que possuíam lesões de até 10mm (3/9). Ademais, o tipo de lesão mais comum foi de lesões ulceradas (6/9), de coloração eritematosa (3/9), sintomática (2/7) e sendo a língua a região de maior acometimento (4/9).

Quanto às médias e desvio padrão de idade, tempo de evolução (meses) e tamanho (mm) está relatado na Tabela 4:

Tabela 4 – Médias e desvio padrão das idades, tempo de evolução e tamanho das lesões

Variável	Média (DP)	Min - Max	Incluídos n %
Idade (anos)	50 (23,08)	19 - 89	7/7 (100%)
Tempo de Evolução (Meses) <sup>a</sup>	2,81 (2,40)	0,26 - 6	4/7 (57,14%)
Tamanho (mm) <sup>b</sup>	22 (22,528)	5 - 60	5/9 (55,5%)

Abreviações: Max: Máximo; Min: Mínimo; mm: milímetro; DP: Desvio Padrão;

<sup>a</sup>dados faltantes de 3 casos desta variável;

<sup>b</sup>dados faltantes de 2 amostras desta variável; 2 amostras indeterminadas

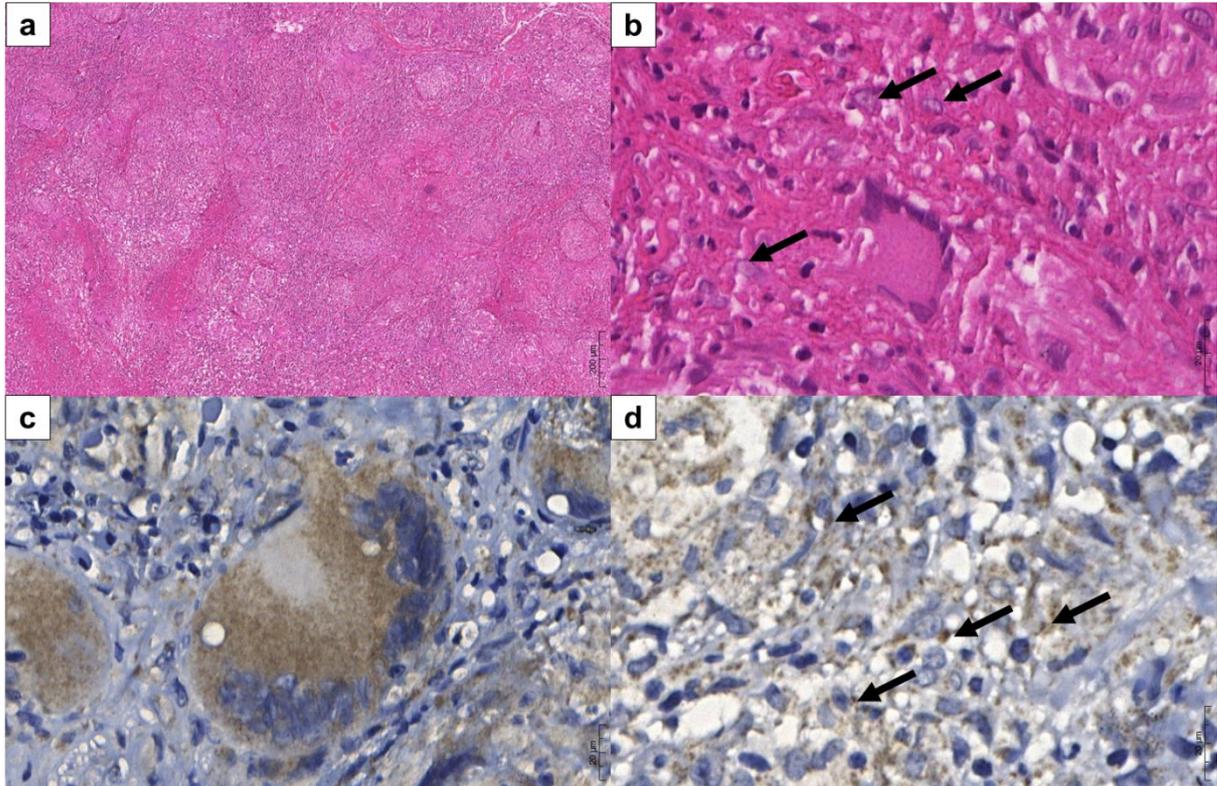
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

### 5.2.1 Características histológicas, coloração de Ziehl Neelsen e imuno-histoquímica

As características histopatológicas foram analisadas através da coloração de H&E onde foram confirmadas a presença de granuloma com necrose caseosa em todas as amostras. Também foi observado a presença de células gigantes multinucleadas em 8 amostras (n=9), sendo do tipo Langhans (8/9). As células histiocíticas epitelioides, numerosos linfócitos e macrófagos foram observados em todas as amostras, todas em maiores quantidades em proximidade dos granulomas. Já a observação da presença do bacilo *M. tuberculosis* através da coloração de BAAR pela técnica de ZN não foi conclusiva em nenhuma amostra. Por fim a análise da marcação pela técnica de imuno-histoquímica foi observado o padrão granular fino em

todas amostras (9/9), porém o padrão granular grosso em 3 amostras (n=9) (FIGURA 5; QUADRO 2)

Figura 5 – Morfologia tecidual das amostras através da coloração especiais e imuno-histoquímica



Legenda: (a, b) Coloração de H&E; a – Presença do granuloma com necrose caseosa (40x); b – presença de célula gigante multinucleada do tipo Langhans e células histiocíticas epitelioides (setas) (100x). (c, d) Marcação Imuno-histoquímica; c – A presença de positividade citoplasmática em células plasmáticas e linfócitos e dentro da célula gigante multinucleada evidenciada pela imunocoloração, que revela um citoplasma manchado de marrom com coloração fina e homogênea, sugerindo a presença de pó de antígeno fino proveniente de produtos micobacterianos sugestiva do padrão granular fino (400x); d – Positividade em proximidade de macrófagos epitelioides, com coloração não homogênea, sugere a presença de bacilos fragmentados observados dentro ou ao redor do granuloma necrosante, sugestivo do padrão granular grosseiro.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Quadro 2 – Características histológicas, presença e ausência do bacilo álcool-ácido resistente pela coloração de Ziehl Neelsen e padrão de coloração imuno-histoquímica

Amostra	Características Histológicas		ZN	IHQ	
	Células que compõem o granuloma			Padrão granular	Fino
	Epitelioides	Células gigantes - Langhans	Bacilo		
1	+	+	-	+	-
2	+	+	-	+	-
3	+	+	-	+	-
4	+	+	-	+	-
5	+	-	-	+	+
6	+	+	-	+	-
7	+	+	-	+	+
8	+	+	-	+	+
9	+	+	-	+	-
<b>Total</b>	9/9 (100%)	8/9 (88,8%)	0/9 (0%)	9/9 (100%)	3/9 (33,3%)

Legenda: Análise de presença e ausência de células específicas encontradas em granulomas com necrose caseosa de biópsias de TB oral ou sugestivas de TB oral através da coloração de H&E, técnica de Ziehl Neelsen e Imuno-histoquímica;

(+): presença; (-): ausência;

Abreviações: CE: Células gigantes do tipo corpo estranho; IHQ: Imuno-histoquímica; Lg: Células gigantes do tipo Langhans; TB: Diagnóstico de tuberculose ou sugestivos de tuberculose oral (TB oral); ZN: coloração para Bacilo Álcool-Ácido Resistente pela técnica de Ziehl Neelsen;

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

### 5.3 Métodos moleculares

Em relação aos métodos moleculares, os resultados estão apresentados no Quadro 3:

Quadro 3 – Resultados dos métodos moleculares para detecção do bacilo *M. tuberculosis*

Amostra	<i>nested</i> -PCR	GeneXpert® MTB/RIF	
		Complexo MTB	Resistência a Rifampicina
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	+	+ (traços)	Ind.
6	-	-	-
7	+	+ (traços)	Ind.
8	-	+ (traços)	Ind.
9	-	-	-
<b>Total</b>	<b>2/9 (22,2%)</b>	<b>3/9 (33,3%)</b>	<b>0/9 (0,0%)</b>

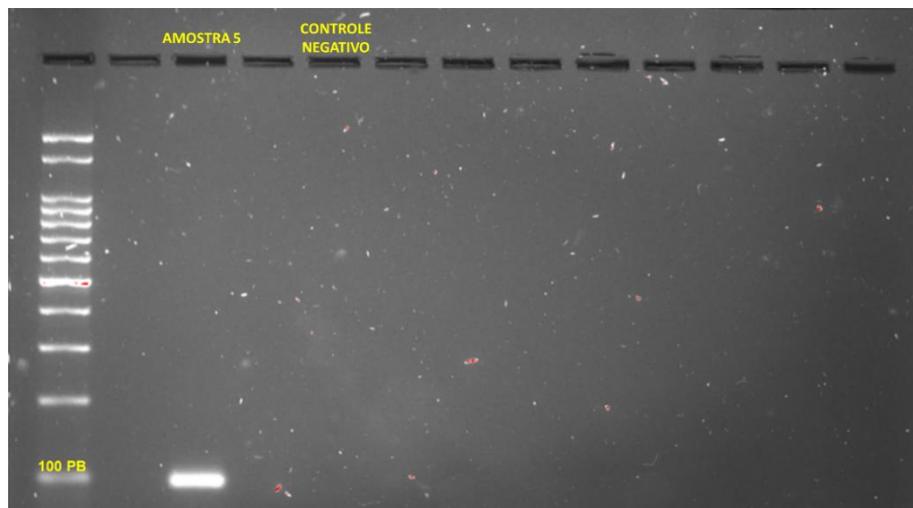
Legenda: (+): amostras que apresentaram positividade para *nested*-PCR apresentando banda positiva de 92 pb em gel de agarose a 3%; (-): amostras que não apresentaram bandas específicas de 92 pb em gel de agarose a 3% para a *nested*-PCR, ou não foi detectado o complexo MTB para o GeneXpert® MTB/RIF e/ou não foi determinado a resistência à rifampicina;

Abreviações: Ind.: Indeterminada; MTB: *Mycobacterium tuberculosis*; TB: Diagnóstico de tuberculose oral ou sugestivos de tuberculose oral (TB oral).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

O padrão de amplificação para a *nested*-PCR pode ser observado na Figura 6, onde é observada a banda de amplificações de 92 pb.

Figura 6 - Amplificação por PCR de um fragmento de 92 pb de IS6110.



Legenda: Padrão de escada de 100 pb;

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

## DISCUSSÃO

A tuberculose é transmitida de pessoa para pessoa pelo ar, e esse contágio pode ocorrer de diversas formas, sendo a mais comum pela fala, espirro e principalmente pela tosse o que a torna uma das doenças mais transmissíveis do mundo (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2022; LEWINSOHN *et al.*, 2017). Este presente estudo teve o intuito de investigar a presença do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, responsável pela etiologia desta doença, em amostras de TBEP com manifestação oral.

A TBEP tem raro acometimento e tratando-se da cavidade oral, pode apresentar de maneira ainda mais rara. Tem-se relatado que a taxa de acometimento de TB oral é de 1 a 1,5% daqueles indivíduos que apresentam TBP (KUMAR *et al.*, 2010). É discutido que a autoinoculação através do escarro infectado seja um dos principais fatores para o acometimento da TB oral secundária a infecção pulmonar, o que também resulta na característica paucibacilar nesta região (KUMAR *et al.*, 2010; VAID *et al.*, 2010).

Quando a TB se manifesta primariamente na cavidade oral, é consequente da inoculação diretamente na mucosa oral de uma pessoa que não foi previamente infectada. Sendo devido ao contato do bacilo na mucosa oral ou a inoculação pelo consumo de leite cru que possa estar contaminado (KUMAR *et al.*, 2010; VAID *et al.*, 2010). Nesta manifestação tem-se relatado que 93% dos casos se apresentam como lesões ulceradas, com as bordas da língua sendo o local mais comum de acometimento (KUMAR *et al.*, 2010). Além disso, também pode ser encontrada na ponta e terço posterior da língua, enquanto na superfície ventral e anterior é relativamente rara (KUMAR *et al.*, 2010; RAZEM *et al.*, 2021). Tal escassez nessas regiões pode ser explicada devido ao pH da cavidade oral, ao intenso suprimento sanguíneo, à escassez de linfonodos e ao efeito físico da saliva permitindo a limpeza contínua da mucosa oral (RAZEM *et al.*, 2021). Por fim, a TB oral primária tem maior taxa de acometimento em indivíduos crianças e jovens e pode estar associada a linfadenopatias (RAZEM *et al.*, 2021; ROUT *et al.*, 2019).

Em relação a TB oral secundária ao acometimento pulmonar, a autoinoculação pode ocorrer a partir de escarro infectado ou disseminação hematogênica. Um dos principais desencadeadores é o escarro infectado com o trauma na cavidade oral, uma vez que o epitélio escamoso estratificado oral normalmente resiste à penetração

direta do bacilo *M. tuberculosis*. As áreas mais vulneráveis são gengiva, alvéolos de extração e língua. Clinicamente, as lesões podem apresentar de maneira irregular, pálida, com margens submersas, tecido de granulação e, às vezes, com esfacelo fino (KUMAR *et al.*, 2010).

No estudo Gabriel *et al.*, 2022, foi relatado que a lesão oral foi a primeira manifestação clínica da TBEP em 249 casos de um total de 301 (82,7%). Desses casos, 104 (41,7%) estavam associados a manifestações pulmonares, uma vez que o diagnóstico da lesão oral conduziu ao diagnóstico pulmonar. No entanto, houve também 127 casos (51%) que não estavam associados a manifestações pulmonares. Já no estudo realizado por Kakisi *et al.*, em 2010, foi descrito que 42,0% dos casos como TBEP com lesões orais primárias (KAKISI *et al.*, 2010). Contudo, é essencial notar o viés relacionado à preferência da divulgação de casos mais incomuns, como aqueles envolvendo a manifestação oral de TB primária. Portanto, torna-se desafiador fazer uma estimativa precisa da porcentagem de pacientes que desenvolvem essa condição. Não obstante, é importante que o cirurgião-dentista esteja ciente dessa manifestação potencial (GABRIEL *et al.*, 2022; KAKISI *et al.*, 2010). Com isso, é evidenciado que a lesão oral pode se manifestar como uma forma isolada de TBEP ou estar associada tanto a manifestações pulmonares quanto a TBEP em outras regiões do corpo (GABRIEL *et al.*, 2022).

Neste contexto, o sexo masculino é o mais afetado pela TB tanto relatado na literatura, numa taxa de 1,7:1 (GABRIEL *et al.*, 2022), como foi observado neste estudo. As taxas de acometimento das lesões orais foram maiores em indivíduos na 5ª década de vida no momento da biópsia em (3/7). Esses dados corroboram para o possível diagnóstico de TB oral secundária à infecção pulmonar neste estudo (BRASIL, 2022). Ademais, neste estudo, o local mais acometido foi a língua, na forma úlcera, eritematosa, sintomática, o que pode estar relacionado tanto com a TB oral primária, quanto a TB oral secundária (KUMAR *et al.*, 2010; ROUT *et al.*, 2019; VAID *et al.*, 2010).

A TB oral pode mimetizar clinicamente uma apresentação maligna muitas vezes sendo nodular e com úlceras não típicas da TB. As úlceras tuberculosas são geralmente mais irregulares do que as lesões perfuradas do carcinoma. Em alguns casos, a úlcera pode exibir margens enroladas com endurecimento mimetizando CCE da mucosa bucal. Porém, para um diagnóstico mais assertivo, leva-se em consideração principalmente a característica histológica. Isto porque tais lesões

histologicamente se diferem principalmente pela presença do granuloma, característica mais correlacionada à TB (RAM *et al.*, 2012).

A identificação limitada dos microrganismos por coloração de tecido ou cultura de amostras de tecido patológico ainda é um dos principais problemas para conclusão do diagnóstico (SHAMAEI *et al.*, 2017). Este fato desafiador pode ser observado por vários motivos, dentre eles, a falta de amostras ou volumes adequados; a natureza paucibacilar dos espécimes e a falta de uma técnica eficiente de processamento de amostras universalmente aplicável em todos os tipos de amostras extrapulmonares. Além disso, existem também a necessidade de dividir a amostra para vários testes diagnósticos (histologia/citologia, análise bioquímica, microbiologia e molecular), o que resulta em uma distribuição não uniforme de microrganismos. Até mesmo os testes moleculares podem ser afetados devido a presença de inibidores que prejudicam o desempenho das técnicas. Entretanto, mesmo com o baixo desempenho das técnicas microbiológicas convencionais em espécimes extrapulmonares, o uso de testes moleculares pode ser justificável (CHAKRAVORTY; SEN; TYAGI, 2005).

O padrão histológico mais comum a ser encontrado são granulomas com necrose caseosa composto por histiócitos epitelioides em torno de um centro necrótico, geralmente acompanhado de um número variável de células gigantes multinucleadas e linfócitos (NETO *et al.*, 2023; SILVA *et al.*, 2021). Além disso, os bacilos *M. tuberculosis* podem estar dentro de macrófagos e pode apresentar exsudato alveolar rico em fibrina (NATARAJAN *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021). Também podem ser encontrados granulomas não necróticos, especialmente em indivíduos imunodeprimidos quando a reação inflamatória não é completa. Para avaliação completa desses casos, deve ser levado em consideração principalmente o conjunto das características clínicas e epidemiológicas de cada indivíduo isolado (SILVA *et al.*, 2021).

No estudo de Kohli *et al.*, em 2014, foi observado presença de células epitelioides, linfócitos e células gigantes multinucleadas, tanto de Langhans, quanto de corpo estranho em todos os casos analisados. Já neste estudo em todas as amostras foram encontradas células histiócitos epitelióides, além de numerosos macrófagos e linfócitos ao redor do granuloma e células gigantes multinucleadas do tipo Langhans em 8 amostras (8/9).

Apesar de ser uma técnica simples, barata e rápida, a coloração de ZN torna-se desafiadora principalmente devido à pequena quantidade de bacilos tipicamente

encontrada neste tipo de amostra (PUROHIT, 2015). Nesta investigação, não foi possível detectar a presença do BAAR em nenhuma das amostras utilizando esta técnica. No entanto, a ausência de detecção através da coloração ZN não deve ser considerada um fator de exclusão para o diagnóstico de TB oral em qualquer amostra, dada a sensibilidade geralmente baixa que pode ser atribuída a este tipo de teste (PUROHIT, 2015). Nesses casos, a combinação de informações adicionais, características e testes torna-se necessária para chegar a um diagnóstico conclusivo (KOHLI *et al.*, 2014; MUSTAFA *et al.*, 2006).

Estudos mostram que a marcação IHQ apresenta maiores taxas de sensibilidade e especificidade, em relação à coloração de ZN. Visto que esta tem uma sensibilidade de 10-45% e requer uma parede celular intacta, enquanto a técnica IHQ pode identificar os bacilos fragmentados e a poeira antigênica. Com isso, oferecendo uma grande melhoria no potencial diagnóstico e deve ser adequada para TBEP paucibacilar (PUROHIT, 2015; PUROHIT *et al.*, 2007; SHAMAEI *et al.*, 2017). Em contrapartida, é necessário utilizar a coloração pela técnica de ZN sempre que possível. Isto porque mesmo que apresente uma baixa sensibilidade, é um método considerado simples e seguro, podendo ser realizado por todo laboratório público de saúde, também pelos privados tecnicamente habilitados (BRASIL, 2011).

Em relação aos anticorpos policlonais, a diluição e a técnica de IHQ são os principais desafios para obter uma coloração adequada. A coloração granular fina no fundo pode causar reações falso-positivas, especialmente se o patologista não estiver familiarizado com essa técnica, sendo uma das principais limitações dela. No entanto, quando há positividade na coloração, como o padrão citoplasmático granular grosseiro, bacilos fragmentados corados ou forma de bacilos corados, a porcentagem de especificidade para essa técnica de coloração é consideravelmente aumentada (GOEL; BUDHWAR, 2007; KARIMI *et al.*, 2014). Outrossim com a técnica adequada, há a maior eliminação da marcação de fundo e então possível atingir taxas de especificidade de até 100%. Sendo levado em consideração a coloração granular grosseira do citoplasma e do bacilo (KARIMI *et al.*, 2014).

Estudos prévios mostram que os anticorpos anti-MPT64 deram sinais nítidos e fortes com fundo claro em comparação com os anticorpos pAbBCG, tornando a interpretação mais fácil e permitindo um diagnóstico mais confiável do organismo complexo MTB (PUROHIT *et al.*, 2007). A especificidade mais baixa com o pAbBCG pode ser devida à reatividade cruzada com outros organismos infecciosos, conforme

descrito anteriormente (ARRESE; PIÉRARD, 1998; KUTZNER *et al.*, 1998; PUROHIT *et al.*, 2007). Logani *et al.* demonstraram que a coloração IHQ com pAbBCG produz resultados positivos mesmo em tecidos com 10 bacilos por lâmina. Portanto, é possível aplicar essa técnica mesmo em situações em que o número de bacilos é pequeno, independentemente da causa (como na TBEP paucibacilar). Essa abordagem pode ser utilizada como um teste patológico de rotina nos estágios iniciais das infecções por TB e HIV (KARIMI *et al.*, 2014).

Karimi *et al.* e Kohli *et al.*, ambos em 2014, utilizaram pAbBCG em amostras de tecido. No estudo de Karimi *et al.*, foram relatados positividade em 100% (23/23) dos casos para IHQ e 39,1% (9/23) para coloração de ZN. Já no estudo de Kohli *et al.*, registraram 72% (72/100) e 23% (23/100) de positividade para IHQ e ZN, respectivamente. Nos estudos de Mustafa *et al.*, 2006 e Purohit *et al.*, 2007, utilizaram o anticorpo policlonal anti-MPT64. Mustafa *et al.* dividiram as análises em dois grupos, onde no primeiro obtiveram positividade em 95% (19/20) para IHQ e 10% (2/20) para ZN, já o segundo grupo, obtiveram positividade em 46% (16/35) para IHQ e 0% (0/35) para ZN. Já Purohit *et al.*, obtiveram taxas de positividade de 100% (51/51) e 10% (5/51) para IHC e ZN, respectivamente. Por fim, estudos de Addo *et al.*, 2022 e Shamaei *et al.*, 2017, utilizaram anticorpo policlonal anti-MTB, pAbPPD, o mesmo utilizado neste presente estudo. Addo *et al.* relataram positividade para IHQ em 52,5% (21/40) dos cortes de tecido histologicamente sugestivos e nenhum 0% (0/40) para ZN. No estudo conduzido por Shamaei *et al.*, foi observado em 100% (12/12) dos casos analisados de TB. Já no presente estudo, onde foi utilizado o anticorpo pAbPPD, observamos ampla marcação, principalmente do padrão granular fino, em todas as amostras selecionada. Já o padrão granular grosseiro foi observado em 3 amostras (3/9).

Relacionado aos testes moleculares, a distribuição não uniforme e o número de microrganismos no espécime também podem ser um fator prejudicial para o diagnóstico. Outro agravante para este tipo de teste, deve-se ao fato de que amostras de TBEP frequentemente associados a resultados falso-positivos e falso-negativos. Também, a PCR detecta tanto *M. tuberculosis* viável quanto não viável e não pode diferenciar entre TB ativa e latente. Em contrapartida estes testes oferecem uma abordagem alternativa e robusta para detectar o bacilo em espécimes paucibacilares de TBEP, apresentando resultados rápidos com boa precisão diagnóstica. Com isso,

contribuindo significativamente para um diagnóstico precoce de TBEP e exercem um impacto aceitável no manejo clínico da doença (MEHTA *et al.*, 2012).

A *nested*-PCR tem um potencial de aumentar a sensibilidade, devido a reamplificação do material, quando comparado ao PCR em uma única etapa em amostras extrapulmonares (GARCÍA-ELORRIAGA *et al.*, 2009; KHOSRAVI *et al.*, 2017). Já o GeneXpert® MTB/RIF também possui a capacidade de detectar o *M. tuberculosis* em tecidos FFPE, mesmo que sua sensibilidade pode não ser considerada satisfatória devido à natureza paucibacilar da TBEP. Conseqüentemente, a obtenção de amostras de ácido nucleico em quantidade suficiente de espécimes de tecido FFPE é um desafio (QING JUN *et al.*, 2023). Por outro lado, o tempo de execução da técnica é curto devido à automação da lise bacteriana, extração de DNA, amplificação por PCR em tempo real e detecção de amplicon em um único sistema (HILLEMANN *et al.*, 2011).

Em seu estudo Allahyartorkaman *et al.*, em 2019, por exemplo, avaliou o desempenho do GeneXpert® MTB/RIF e mostrou que a sensibilidade para espécimes pulmonares foi maior do que para amostras extrapulmonares (95,5% vs. 76,5%). Isto pode ser justificado devido a possibilidade de que a etapa de descontaminação tenha determinado a diminuição da carga bacilar e conseqüentemente a redução da sensibilidade do teste. Já no estudo de Qing Jun *et al.*, de 2023, foi observado uma taxa de positividade com o teste utilizando o GeneXpert® MTB/RIF de 57.81% (37/64) em amostras extrapulmonares, utilizando tecido em FFPE.

Este foi o primeiro estudo a utilizar o sistema do GeneXpert® MTB/RIF para investigação de amostras com suspeita de TBEP na cavidade oral. E nesta investigação, foi possível detectar a presença do *M. tuberculosis* através da amplificação do gene IS6110, utilizando a *nested*-PCR para 2 amostras (2/9). Em relação a detecção utilizando o sistema GeneXpert® MTB/RIF, foi observado a positividade em 3 amostras (3/9) do total.

Os resultados deste estudo, principalmente os que apresentaram positividade para os testes moleculares e de imuno-histoquímica, podem ser explicado pelo perfil do indivíduo testado. Isto porque, as amostras que apresentaram positividade tanto para a *nested*-PCR, quanto para o GeneXpert® MTB/RIF, foram de indivíduos que são da população mais vulneráveis ao adoecimento pela TB, sendo um deles vivendo em situação de rua e o outro um indivíduo convivendo com o HIV.

Tais informações corroboram tanto para positividade dos casos, quanto para o fato de serem amostras de TBEP, tendo manifestado na cavidade oral. Em contrapartida, a diferença de positividade entre a *nested*-PCR e o ensaio GeneXpert® MTB/RIF pode ser explicada devido a quantidade de etapas para a primeira reação. Visto que a primeira possui um maior número de passos realizados de forma manual, podendo aumentar assim a chance de degradação de DNA e possível contaminação (MEHTA *et al.*, 2012). Já a segunda técnica, possui uma maior etapa automatizada sem a necessidade de intervenção manual (HELB *et al.*, 2010). Outro fator que possa corroborar para tal diferença, a distribuição não homogênea de quantidades de *M. tuberculosis* em toda amostra de tecido (MEHTA *et al.*, 2012; NATARAJAN *et al.*, 2020), uma vez que foi utilizado, de cada indivíduo, a mesma amostra de parafina para ambos os testes, porém cortes de tecidos diferentes.

O diagnóstico de TB pode ser confirmado por exame histopatológico, presença de BAAR em corte de tecido ou por cultura de bacilos tuberculosos e testes moleculares. Na maioria dos casos, uma única biópsia pode não ser suficiente porque as alterações granulomatosas podem não ser evidentes nas lesões iniciais. A lesão é eventualmente revelada por uma nova biópsia (DE AGUIAR *et al.*, 1997; RAM *et al.*, 2012). No entanto, a biópsia realizada em um local superficial ou inapropriado pode ser negativa para alterações granulomatosas (RAM *et al.*, 2012).

A cultura de micobactérias é frequentemente utilizada como padrão-ouro na confirmação de testes diagnósticos. Entretanto, é comum as culturas de *M. tuberculosis* não revelarem positividade no material estudado. Isto porque nem todos os tecidos submetidos a estudos histológicos são cultivados simultaneamente para detectar a presença de TB (MUSTAFA *et al.*, 2006).

Ademais, a baixa positividade da cultura na TBEP é bem conhecida e também representa um problema geral. Além disso, a cultura de micobactérias também não diferencia micobactérias tuberculosas de não tuberculosas, a menos que testes específicos sejam realizados (MUSTAFA *et al.*, 2006).

Este estudo exemplifica a principal dificuldade enfrentada por patologistas orais, visto que a falta de informação clínica aliada a característica paucibacilar da manifestação da doença na cavidade oral, torna o diagnóstico conclusivo bastante desafiador. Conseqüentemente, tem-se a real necessidade de aliar as informações clínicas com mais de um teste, além das características histológicas.

Apesar dos pontos fortes, o nosso estudo apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, a amostra do estudo teve tamanho relativamente pequeno para determinar sensibilidade e especificidade, além do fato de que não foi possível confirmar os casos verdadeiramente positivos e verdadeiramente negativos. Portanto, novos estudos com amostras maiores é necessário. Além disso, por ser retrospectivo e baseado em laboratório, a quantidade de dados demográficos e clínicos disponíveis foi limitada. Também, foi utilizado um anticorpo policlonal que possui um potencial de reação cruzada com três micobactérias atípicas. No entanto, essas micobactérias atípicas raramente causam doenças em humanos. Também, dado que o anticorpo não apresenta forte reatividade cruzada com antígenos de *M. bovis*, a vacinação com BCG não interferiria nos resultados (ADDO *et al.*, 2022; SHAMAEI *et al.*, 2017).

Ademais, um dos principais empecilhos relacionado ao GeneXpert® MTB/RIF infelizmente é o alto custo e acesso a este equipamento, o que tem dificultado sua ampla aplicação. Visto que, mesmo as amostras de tecido em parafina tenham uma natureza paucibacilar, a extração eficiente e os métodos de avaliação científica são benéficos para superar esse defeito (QING JUN *et al.*, 2023).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, esta investigação mostrou que a tuberculose oral apresentou uma predileção por homens por volta da quinta década de vida, sendo a língua o local preferido. A apresentação clínica mais comum foi úlcera oral, sintomática e eritematosa. De acordo com esses aspectos, é crucial estabelecer um diagnóstico correto, considerando que as algumas hipóteses diagnósticas eram lesões malignas. Porém, devido a característica paucibacilar, o diagnóstico de lesões orais deve levar em consideração mais de um método aliado as características clínico-demográfica de cada indivíduo. Neste estudo foi possível concluir que os testes moleculares e a técnica de imuno-histoquímica possuem uma maior capacidade de identificação ao investigar a presença do bacilo *M. tuberculosis* em amostras de tecido fixadas em parafina com suspeita de tuberculose oral apresentando granulomas com necrose caseosa. Este estudo forneceu dados clínico-demográficos e informações sobre os métodos diagnósticos necessários para auxiliar o clínico no diagnóstico precoce das lesões de TB oral.

Como o cirurgião-dentista tem maior acesso ao exame da cavidade oral, a Odontologia tem um grande papel no diagnóstico precoce da doença. Com isso, tem-se necessidade de o profissional saber identificar as manifestações da doença para o correto encaminhamento do paciente para tratamento. Por isso, o diagnóstico precoce e uma abordagem multidisciplinar são indispensáveis para o manejo do paciente com a TB. A ampla divulgação e conscientização nesse campo têm facilitado a identificação de fatores de risco e vias de causação. A prática clínica odontológica tem potencial para a transmissão de várias infecções do paciente para o dentista, do paciente para o paciente, assim como do dentista para o paciente, devido à proximidade com as cavidades nasal e oral do paciente. Com isso, um histórico detalhado de TB deve levar o profissional odontológico a discernir se a pessoa é um caso ativo em tratamento, um caso ativo sem tratamento ou anteriormente infectado, mas atualmente livre da doença. Os casos ativos não tratados podem representar um risco para os profissionais de saúde bucal. O tratamento odontológico para aqueles com tuberculose ativa deve ser limitado a procedimentos urgentes e essenciais.

## REFERÊNCIAS

ADDO, S. O. *et al.* Utility of anti-Mycobacterium tuberculosis antibody (ab905) for detection of mycobacterial antigens in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from clinically and histologically suggestive extrapulmonary tuberculosis cases. **Heliyon**, v. 8, n. 12, p. e12370, dez. 2022.

ALLAHYARTORKAMAN, M. *et al.* Low diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary tuberculosis: A multicenter surveillance. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18515, 6 dez. 2019.

ALLI, O. A. T.; OGBOLU, O. D.; ALAKA, O. O. Direct molecular detection of Mycobacterium tuberculosis complex from clinical samples - An adjunct to cultural method of laboratory diagnosis of tuberculosis. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 281–288, jun. 2011.

ARRESE, J. E.; PIÉRARD, G. E. Immunostaining of various micro-organisms by a polyclonal anti-Mycobacterium bovis antibody. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, n. 5 Pt 1, p. 810, nov. 1998.

BANDYOPADHYAY, D. *et al.* Adenosine deaminase estimation and multiplex polymerase chain reaction in diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis. **INT J TUBERC LUNG DIS**, v. 12, n. 10, p. 1203–1208, 2008.

BARCELOS, D.; FRANCO, M. F.; LEÃO, S. C. Effects of tissue handling and processing steps on PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded samples. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 50, n. 6, p. 321–326, nov. 2008.

BATES, J. H. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. **Clinics in chest medicine**, v. 1, n. 2, p. 167–174, 1980.

BEHR, M. A.; EDELSTEIN, P. H.; RAMAKRISHNAN, L. Is Mycobacterium tuberculosis infection life long? **The BMJ**, v. 367, 2019.

BENNEDSEN, J. *et al.* Utility of PCR in Diagnosing Pulmonary Tuberculosis. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 34, n. 6, p. 1407–1411, 1996.

BLOOM, B. R.; MURRAY, C. J. L. Tuberculosis: Commentary on a Reemergent Killer. **SCIENCE**, v. 257, n. 1, p. 1055–1064, 21 ago. 1992.

BRASIL. **Manual de Recomendações Para o Controle de Tuberculose no Brasil**. , 2011. Disponível em: <[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_recomendacoes\\_controle\\_tuberculose\\_brasil\\_2\\_ed.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil_2_ed.pdf)>. Acesso em: 20 mar. 2023

BRASIL. **Boletim Epidemiológico Tuberculose 2022**. (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Eds.), 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de->

[conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-tuberculose-numero-especial-marco-2022.pdf](#)>. Acesso em: 5 mar. 2023

CHAKRAVORTY, S.; SEN, M. K.; TYAGI, J. S. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by smear, culture, and PCR using universal sample processing technology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4357–4362, set. 2005.

COLE, S. T.; BARRELL, B. G. Analysis of the genome of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. **Novartis Foundation symposium**, v. 217, p. 160–72; discussion 172-7, 1998.

CONDE, M. B. *et al.* Predictive Value of the Acid Fast Smear for Detection of Mycobacterium tuberculosis in Respiratory Specimens in a Reference Center of HIV/Aids in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 94, n. 6, p. 787–790, 1999.

COROS, A.; DECONNO, E.; DERBYSHIRE, K. M. IS6110, a Mycobacterium tuberculosis complex-specific insertion sequence, is also present in the genome of Mycobacterium smegmatis, suggestive of lateral gene transfer among mycobacterial species. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 9, p. 3408–3410, maio 2008.

CRUZ, H. L. A. DA *et al.* Evaluation Of A Nested-Pcr For Mycobacterium Tuberculosis Detection In Blood And Urine Samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 321–329, 2011.

DANIEL, T. M. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? **The international journal of tuberculosis and lung disease**, v. 4, n. 5, p. 395–400, 2000.

DE AGUIAR, M. C. *et al.* Tuberculosis of the oral cavity: a case report. **Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)**, v. 28, n. 11, p. 745–7, nov. 1997.

GABRIEL, A. *et al.* Oral and maxillofacial tuberculosis: A systematic review. **Oral Diseases**, 21 jul. 2022.

EL-HAJJ, H. H. *et al.* Detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis in a single tube with molecular beacons. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4131–7, nov. 2001.

EMERY, J. C. *et al.* Self-clearance of Mycobacterium tuberculosis infection: Implications for lifetime risk and population at-risk of tuberculosis disease. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 288, n. 1943, 27 jan. 2021.

FERRAZ, J. C. *et al.* A heterologous DNA priming-Mycobacterium bovis BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. **Infection and immunity**, v. 72, n. 12, p. 6945–50, dez. 2004.

FERRAZ, J. C. *et al.* Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 11, p. 1387–1397, 2006.

FORNAZIERI, M. A. *et al.* The Most Common Otorhinolaryngologic Manifestations of Granulomatous Diseases. **Intl. Arch. Otorhinolaryngol**, v. 12, n. 3, p. 362–365, 23 ago. 2008.

FURINI, A. A. DA C. *et al.* Detection of Mycobacterium tuberculosis complex by nested polymerase chain reaction in pulmonary and extrapulmonary specimens. **J Bras Pneumol**, v. 39, n. 6, p. 711–718, 2013.

FU, Y.-C. *et al.* Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Paraffin-Embedded Tissues by the New Automated Abbott RealTime MTB Assay. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 46, n. 4, p. 412–417, 2016.

GARCÍA-ELORRIAGA, G. *et al.* Clinical usefulness of the nested polymerase chain reaction in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. **Salud pública de México**, v. 3, p. 240–245, 2009.

GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT. **GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2022**. Genebra: [s.n.]. Disponível em: <<http://apps.who.int/bookorders>>. Acesso em: 5 mar. 2023.

GOEL, M. M.; BUDHWAR, P. Immunohistochemical localization of mycobacterium tuberculosis complex antigen with antibody to 38 kDa antigen versus Ziehl Neelsen staining in tissue granulomas of extrapulmonary tuberculosis. **The Indian journal of tuberculosis**, v. 54, n. 1, p. 24–9, jan. 2007.

HALDAR, S. *et al.* **Improved laboratory diagnosis of tuberculosis - The Indian experience. Tuberculosis**, set. 2011.

HELB, D. *et al.* Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampin Resistance by Use of On-Demand, Near-Patient Technology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 229–237, jan. 2010.

HILLEMANN, D. *et al.* Rapid Molecular Detection of Extrapulmonary Tuberculosis by the Automated GeneXpert MTB/RIF System. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1202–1205, abr. 2011.

HOUBEN, R. M. G. J.; DODD, P. J. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. **PLoS Medicine**, v. 13, n. 10, 1 out. 2016.

KAKISI, O. K. *et al.* Tuberculosis of the oral cavity: a systematic review. **European Journal of Oral Sciences**, v. 118, n. 2, p. 103–109, abr. 2010.

KARIMI, S. *et al.* Histopathological Findings in Immunohistological Staining of the Granulomatous Tissue Reaction Associated with Tuberculosis. **Tuberculosis Research and Treatment**, v. 2014, p. 1–6, 2014.

KHOSRAVI, A. D. *et al.* Identification of Mycobacterium tuberculosis in Clinical Specimens of Patients Suspected of Having Extrapulmonary Tuberculosis by Application of Nested PCR on Five Different Genes. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 17 jan. 2017.

KIM, S. Y. *et al.* A case report of a tongue ulcer presented as the first sign of occult tuberculosis. **BMC Oral Health**, v. 19, n. 1, 29 abr. 2019.

KOHLI, R. *et al.* Relative value of immunohistochemistry in detection of mycobacterial antigen in suspected cases of tuberculosis in tissue sections. **Indian journal of pathology & microbiology**, v. 57, n. 4, p. 574–8, 2014.

KRITSKI, A. L.; CONDE, M. B.; SOUZA, G. R. M. DE. **TUBERCULOSE - DO AMBULATÓRIO À ENFERMAGEM**. 3ª ed. [s.l.] Atheneu, 2005.

KRITSKI, A. L.; RUFFINO-NETTO, A. **INT J TUBERC LUNG DIS 4(7):622-626**  
**Health sector reform in Brazil: impact on tuberculosis control.** [s.l: s.n.].

KUMAR, S. *et al.* Primary Lingual Tuberculosis in Immunocompetent Patient: a Case Report. **Head and Neck Pathology**, v. 4, n. 2, p. 178–180, 13 jun. 2010.

KUTZNER, H. *et al.* A new application of BCG antibody for rapid screening of various tissue microorganisms. **J Am Acad Dermatol**, v. 38, p. 56–60, 1998.

LEWINSOHN, D. M. *et al.* Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. e1–e33, 15 jan. 2017.

MARTINS, L. C. *et al.* Nested-PCR using MPB64 fragment improves the diagnosis of pleural and meningeal tuberculosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 253–7, 2000.

MEHTA, P. K. *et al.* Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 20–36, out. 2012.

MÉNDEZ-SAMPERIO, P. Diagnosis of Tuberculosis in HIV Co-infected Individuals: Current Status, Challenges and Opportunities for the Future. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 86, n. 2, p. 76–82, ago. 2017.

MIYAZAKI, Y. *et al.* Nested polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2228–32, ago. 1993.

MOUTINHO, I. L. D. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Rev Med Minas Gerais**, v. 21, n. 1, p. 42–48, 2011.

MUSTAFA, T. *et al.* Immunohistochemistry using a Mycobacterium tuberculosis complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis.

**Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 19, n. 12, p. 1606–14, dez. 2006.

NATARAJAN, A. *et al.* A systemic review on tuberculosis. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 67, n. 3, p. 295–311, 1 jul. 2020.

NETO, R. Z. *et al.* **Plano Estadual Pelo Fim Da Tuberculose Como Problema De Saúde Pública: Estratégias para 2023-2026 Minas Gerais 2023**. Belo Horizonte, 2023. Disponível em: <<https://www.saude.mg.gov.br/tuberculose>>. Acesso em: 13 mar. 2023

NORTH, R. J.; JUNG, Y. J. Immunity to tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 599–623, 2004.

PUROHIT, M. Laboratory Diagnosis of Extra-pulmonary Tuberculosis (EPTB) in Resource- constrained Setting: State of the Art, Challenges and the Need. **JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**, 2015.

PUROHIT, M. R. *et al.* Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting Mycobacterium tuberculosis complex specific antigen MPT64. **Diagnostic Pathology**, v. 2, n. 1, p. 36, 25 dez. 2007.

QING JUN, J. *et al.* The Retrospective Diagnostic Potential of GeneXpert MTB/RIF for the Analysis of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue from Extrapulmonary Tuberculosis Patients \*. **Biomed Environ Sci**, v. 36, n. 3, p. 295–298, 2023.

RAJA, S. *et al.* Technology for Automated, Rapid, and Quantitative PCR or Reverse Transcription-PCR Clinical Testing. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 882–890, 1 maio 2005.

RAM, H. *et al.* Tubercular Ulcer: Mimicking Squamous Cell Carcinoma of Buccal Mucosa. **Journal of Maxillofacial and Oral Surgery**, v. 11, n. 1, p. 105–108, 4 mar. 2012.

RAZEM, B. *et al.* Lingual primary tuberculosis mimicking malignancy. **Annals of Medicine & Surgery**, v. 67, jul. 2021.

SILVA, D. *et al.* Diagnosis of tuberculosis: a consensus statement from the Brazilian Thoracic Association. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, p. e20210054, 30 abr. 2021.

ROUT, P. *et al.* Prevalence of oral lesions in tuberculosis: A cross sectional study. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 8, n. 12, p. 3821, 2019.

SAKULA, A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. **Thorax**, v. 37, n. 4, p. 246–251, 1982.

SCHOOLNIK, G. K. Applications and transfer of technology to the nations of the South. Biotechnology and the control of childhood enteric infections. **Infectious disease clinics of North America**, v. 5, n. 2, p. 265–75, jun. 1991.

SHAMAEI, M. *et al.* The presence of mycobacterial antigens in sarcoidosis associated granulomas. **Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases**, v. 34, n. 3, p. 236–241, 2017.

SHEPPARD, D. DE S. A literatura médica brasileira sobre a peste branca: 1870-1940. **História, ciências, saúde-Manguinhos**, v. 8, p. 173–192, 2001.

TIEMERSMA, E. W. *et al.* Natural history of tuberculosis: Duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

**UNAIDS 2022**. Disponível em:

<[https://www.unaids.org/en/resources/documents/2023/2022\\_unaids\\_data](https://www.unaids.org/en/resources/documents/2023/2022_unaids_data)>. Acesso em: 6 mar. 2023.

VAID, S. *et al.* Tuberculosis in the head and neck — a forgotten differential diagnosis. **Clinical Radiology**, v. 65, n. 1, p. 73–81, jan. 2010.

WANG, H. Y. *et al.* Development of a high sensitivity TaqMan-based PCR assay for the specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex in both pulmonary and extrapulmonary specimens. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

WELLS, W. F.; RATCLIFFE, H. L.; GRUMB, C. On the mechanics of droplet nuclei infection; quantitative experimental air-borne tuberculosis in rabbits. **American journal of hygiene**, v. 47, n. 1, p. 11–28, jan. 1948.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Xpert MTB/RIF implementation manual : technical and operational “how-to”: practical considerations**. Genebra, 2014.

Disponível em:

<[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112469/9789241506700\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112469/9789241506700_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 28 mar. 2023

## APÊNDICE A – Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Contribuição da Biologia Molecular para o diagnóstico de tuberculose na Estomatologia

**Pesquisador:** Vanessa de Fátima Bernardes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 56476622.6.0000.5149

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.429.194

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa retrospectiva de uma série de casos, em que serão analisados materiais de biópsia de tecido mole incluídas em parafina, bem como os dados clínicos.

**INTRODUÇÃO:** A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que afeta diretamente a saúde pública mundial, sendo este um agravante para população em geral. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) foi estimado que em 2019, no mundo, cerca de 10 milhões de pessoas desenvolveram TB e 1,2 milhão morreram devido à doença, o que a torna a principal causa de morte, até 2020, por infecção em todo o mundo e uma das dez principais causas de morte em geral. Além disso, estima-se que um quarto da população mundial está infectada com *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Em relação ao tratamento, o percentual que foi obtido sucesso, em 2018, foi de 85% entre os casos novos (WHO, 2021). No Brasil, foi registrado 66.819 casos novos de TB, em 2020, o que levou a um coeficiente de incidência de 31,6 casos por 100 mil habitantes. Já em relação a mortalidade, em 2019, foram notificados cerca de 4,5 mil óbitos pela doença, com um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos por 100 mil habitantes (Brasil, 2021a). O local mais comum de infecção por TB é o pulmão, porém há cada vez mais relatos de tuberculose extrapulmonar (TBEP) em todo o mundo, mostrando a capacidade potencial de disseminação de *M. tuberculosis* (MTB) em muitos órgãos do corpo (Hillemann et al., 2011; Furini et al., 2013). A taxa de acometimento da TBEP ainda é incerta, compreendendo cerca de 15 a 20% dos casos de TB e pode compreender até 50% dos casos de TB daqueles indivíduos infectados pelo vírus da

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar 2ª Sala 2005 2º Campus Pampulha  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.429.194

Serão selecionadas amostras de parafina com hipóteses diagnósticas clínicas e diagnósticos histológicos de tuberculose oral além de outras lesões com características semelhantes, que fazem parte dos diagnósticos diferenciais. Também serão selecionadas amostras com diagnóstico histopatológico de lesões semelhantes a tuberculose, principalmente aquelas que não tiveram um diagnóstico final histológico específico, ao fim de se investigar através de coloração de BAAR (Ziehl-Neelsen) e PCR convencional. O DNA genômico (gDNA) será extraído das amostras de tecidos FFPE utilizando o QIAamp DNA FFPE Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras serão desparafinizadas utilizando a solução desparafinizadora (QIAGEN, Hilden, Germany), e digeridas com proteinase K (QIAGEN, Hilden, Germany) a 56°C. O gDNA será isolado conforme recomendações do fabricante do kit. Será realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação da região de interesse correspondente ao gene IS6110.

Informa CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO no Projeto/Brochura de Investigação: Serão excluídos aqueles pacientes em que não forem encontrados no Biorrepositório da Faculdade de Odontologia-UFMG os blocos de parafina.

**Objetivo da Pesquisa:**

OBJETIVO PRIMÁRIO: Avaliar a contribuição da biologia molecular para o diagnóstico de tuberculose na estomatologia OBJETIVO SECUNDÁRIO: Avaliar a possibilidade de aplicação da técnica de PCR para fins de diagnóstico de tuberculose oral em indivíduos que tiveram lesões com hipóteses diagnósticas de Tuberculose; Comparar a identificação do bacilo da tuberculose pela coloração de Ziehl-Neelsen com a técnica de PCR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: RISCOS, conforme descrito pela proponente: A pesquisa não apresenta riscos para os indivíduos. BENEFÍCIOS: Com a possibilidade de identificação, pela técnica de PCR convencional, do bacilo da tuberculose nas amostras de lesões orais com suspeita da doença, poderá haver uma redução do tempo entre o atendimento inicial do indivíduo e o encaminhamento para o centro de referência para tratamento. A PCR é uma técnica de Biologia Molecular que apresenta precisão dos resultados e possibilitará o diagnóstico da doença em menor tempo em relação às técnicas rotineiramente utilizadas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

RISCOS, conforme descrito pela proponente: A pesquisa não apresenta riscos para os indivíduos. BENEFÍCIOS: Com a possibilidade de identificação, pela técnica de PCR convencional, do bacilo da

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2, Sala 2005 2, Campus Pampulha  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 5.429.194

imunodeficiência humana (HIV) (TB-HIV) (Mehta et al., 2012). Os sintomas da TB são: tosse por 3 semanas ou mais, febre vespertina, sudorese noturna e o emagrecimento, sendo que desses, a tosse é o principal sintoma, podendo ela ser seca ou produtiva (com catarro) (Brasil, 2020). Já no acometimento oral (TBEP), as lesões apresentam como lesões ulcerativas com centro granulomatoso e halo esbranquiçado (de Souza et al, 2016). O bacilo MTB, é detectado geralmente através da observação microscópica após a coloração de Ziehl-Neelsen (ZN), em laboratórios clínicos e de patologia. É tido como escolha por ser considerado um método de teste rápido e acessível, porém a sensibilidade é baixa quando comparada às técnicas moleculares, ademais não permite a identificação das espécies de MTB presentes no espécime (Barcelos et al., 2008). Já a cultura, é tratada como “padrão ouro” no diagnóstico laboratorial da TB, porém geralmente leva de 3 a 8 semanas (Alli et al., 2011). Os aspectos histológicos da TB, em qualquer sítio de infecção, pulmonar ou TBEP, apresentam lesões patognomônicas conhecidas como tubérculos, que são reações inflamatória granulomatosa característica contra bacilos de MTB mediada por células de imunidade do hospedeiro. (Natarajan et al., 2020) Em comparação à coloração com ZN e cultura, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é altamente específica e sensível (Barcelos et al., 2017; Fukunaga et al., 2002). Além do fato de que é rápido, barato e pode ser realizado na maioria dos laboratórios clínicos e de patologia (Schoolnik, 1991). Porém, o diagnóstico definitivo e rápido para TBEP é visto como um desafio, uma vez que essa doença tem uma natureza paucibacilar (Khosravi et al., 2017). Além disso, a falta de volumes adequado de amostra clínica e distribuição não uniforme de bactérias nessas amostras, assim como a localização da doença em sítios de difícil acesso (Mehta et al., 2012). A técnica de PCR pode detectar quantidades <10 bacilos/mL de diferentes espécimes biológicos, sendo uma ferramenta útil para o diagnóstico de TB (da Cruz et al., 2011). No entanto, um problema sério de detecção de MTB por técnicas de PCR é a presença de substâncias inibidoras de PCR que se encontram associadas com o TBEP em comparação com as amostras pulmonares. A presença de inibidores é amplamente devido à realização de substâncias na preparação de amostra que interferem com a atividade da polimerase. Devido a isso, alguns investigadores recomendaram o re-amplificação após diluir os inibidores para melhorar o rendimento (Alli et al., 2011)

**HIPÓTESE:** A investigação do bacilo da tuberculose em amostras de biópsia de lesão oral com suspeita da doença pode ser feita utilizando-se a técnica de PCR, com maior precisão diagnóstica, possibilitando a redução do tempo entre o atendimento inicial do indivíduo e o encaminhamento ao centro de tratamento.

**METODOLOGIA**

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2, Sala 2005 2, Campus Pampulha  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.429.194

tuberculose nas amostras de lesões orais com suspeita da doença, poderá haver uma redução do tempo entre o atendimento inicial do indivíduo e o encaminhamento para o centro de referência para tratamento. A PCR é uma técnica de Biologia Molecular que apresenta precisão dos resultados e possibilitará o diagnóstico da doença em menor tempo em relação às técnicas rotineiramente utilizadas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

As amostras serão obtidas na Faculdade de Odontologia, com acesso aos blocos e a dados clínicos. Previsão de início em maio de 2022.

De acordo com o MANUAL DE ORIENTAÇÃO: PENDÊNCIAS FREQUENTES EM PROTOCOLOS DE PESQUISA CLÍNICA da /CONEP versão 2015, pg 43 item 7: "Algumas pesquisas utilizam material biológico oriundo de acervo que não corresponde nem a um biobanco nem a um biorrepositório, tendo sido coletado para fins assistenciais. Este é o caso, por exemplo, das biópsias armazenadas em blocos de parafina de um serviço de Anatomia Patológica. O material biológico obtido com fins assistenciais pode ser utilizado em pesquisa, desde que devidamente autorizado pelo participante, por meio de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico da pesquisa (ou, quando devidamente justificado, a obtenção de aprovação da dispensa do Termo pelo Comitê de Ética em Pesquisa)". Informa abordagem pessoal aos participantes ou contato por telefone para que sejam enviados os TCLEs por e-mail a fim de se obterem as respectivas autorizações. Informa que caso ocorram novos casos diagnosticados como as lesões supracitadas em pacientes da clínica de Patologia e Estomatologia da FOUFGM no decorrer do estudo, serão coletadas e incluídas, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados:

-Folha de rosto assinada pelo diretor do ICB-UFMG

-Formulário de informações básicas

-Parecer consubstanciado e aprovação pela Câmara Departamental do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG

-Autorização para uso dos blocos pela Coordenadora do Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial Faculdade de Odontologia-UFMG

-Projeto Completo

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2, Sala 2005 2, Campus Pampulha  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.429.194

-Termo de Constituição de Biorrespositório com assinaturas

-TCLE: Apesar de os riscos no Formulário de Informações Básicas estarem subestimados (“A pesquisa não apresenta riscos para os indivíduos.”), o TCLE os descreve adequadamente (constrangimento, quebra de sigilo e identificação pessoal), bem como as formas de minimização. O TCLE está adequado com todas os esclarecimentos ao participante. Apresenta texto referente a formação de biorrespositório.

- Carta resposta à diligência, informando a inclusão de descrição de como será realizada a triagem dos pacientes e obtenção e consentimento, e a inserção de campo para rubrica no TCLE

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

SMJ, o projeto está aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1908727.pdf	11/05/2022 11:22:10		Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP_UFMG.pdf	11/05/2022 11:16:16	Vanessa de Fátima Bernardes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ajuste_CEP.pdf	11/05/2022 11:15:55	Vanessa de Fátima Bernardes	Aceito

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2, Sala 2005 2, Campus Pampulha  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 5.429.194

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_tuberculose_oral_ajuste_CEP.pdf	11/05/2022 11:15:44	Vanessa de Fátima Bernardes	Aceito
Declaração de concordância	Autorizacao_de_uso_de_blocos_lab_FO UFMG_assinada.pdf	07/03/2022 15:30:37	Vanessa de Fátima Bernardes	Aceito
Orçamento	Orcamento_projeto_tuberculose_oral_C EP.pdf	07/03/2022 15:24:59	Vanessa de Fátima Bernardes	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_pesquisador_plataforma Brasil.pdf	07/03/2022 15:22:18	Vanessa de Fátima Bernardes	Aceito
Outros	Parecer_projeto_pesquisa_tuberculose_ oral.pdf	07/03/2022 14:50:09	Vanessa de Fátima Bernardes	Aceito
Outros	SEI_UFMG_1137206_Oficio_aprovacao projeto_tuberculose_oral.pdf	07/03/2022 14:48:08	Vanessa de Fátima Bernardes	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_de_Constituicao_de_Biorreposito rio_assinado.pdf	07/03/2022 14:46:28	Vanessa de Fátima Bernardes	Aceito
Folha de Rosto	SEI_UFMG_1292013_Folha_de_rosto_p rojeto_tuberculose_oral.pdf	07/03/2022 14:44:18	Vanessa de Fátima Bernardes	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 25 de Maio de 2022

Assinado por:  
**Críssia Carem Paiva Fontainha**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2, Sala 2005 2, Campus Pampulha  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

## APÊNDICE B - Termo De Consentimento Livre E Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**Contribuição da biologia molecular para o diagnóstico de tuberculose na estomatologia**”. Pedimos a sua autorização para a utilização do material biológico humano incluídos em blocos de parafina do Biorrepositório do Serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG. Também solicitamos sua autorização para utilizar dados da sua ficha clínica. A utilização do seu material biológico e de seus dados está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar em outros futuros. Nesta pesquisa pretendemos avaliar a utilização de métodos moleculares para contribuição diagnóstica de Tuberculose através do método de PCR.

A sua participação na pesquisa consiste em permitir que utilizemos uma parte da lesão que foi retirada de sua boca, transportada e processada no Biorrepositório do Laboratório de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG onde ficará armazenada sob a guarda do pesquisador responsável. Iremos examinar mais detalhadamente como a lesão se desenvolveu. Assim, pedimos sua autorização para utilizar essa amostra e também os dados de sua ficha clínica. Não será realizado nenhum procedimento direto com você voluntário(a), mas o uso do material e de seus dados apresenta o risco de constrangimento em caso de quebra de sigilo ou de identificação pessoal. Esse risco, porém, será minimizado por controle dos dados e anonimato dos participantes, ou seja, usaremos códigos que não identificarão seu nome. A pesquisa contribuirá para melhorar o entendimento das neoplasias de cavidade oral.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de utilização do material biológico, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

---

*Rubrica do pesquisador*

---

*Rubrica do participante*

Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG, e a outra será fornecida ao Sr. (a).

Os dados utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos na sala 3201 da Faculdade de Odontologia da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “Contribuição da biologia molecular para o diagnóstico de tuberculose na estomatologia”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

\_\_\_\_\_  
*Rubrica do pesquisador*

\_\_\_\_\_  
*Rubrica do participante*

- ( ) Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.  
 ( ) Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

---

Nome completo do participante

Data

---

Assinatura do participante

**Vanessa de Fátima Bernardes**

Endereço: Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 Pampulha  
 Instituto de Ciências Biológicas/ Departamento de Patologia Geral  
 CEP: 31270-901 / Belo Horizonte, MG  
 Telefones: (31) 3409-3046  
 E-mail: bernardesvf@icb.ufmg.br

---

Assinatura do pesquisador responsável

Data

**Rubens Signoretti Oliveira Silva**

Endereço: Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 Pampulha  
 Instituto de Ciências Biológicas/ Departamento de Patologia Geral  
 CEP: 31270-901 / Belo Horizonte, MG  
 Telefones: (31) 9 9606-9271  
 E-mail: rubensign@hotmail.com

---

Assinatura do pesquisador

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**  
 Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005  
 Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901  
 E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 3409-4592

APÊNDICE C – Tabela de frequências dos dados clínicos das amostras selecionadas

Tabela 5 – Dados de frequência das amostras selecionadas

<b>Variável</b>	<b>n (%)</b>
<b>Idade</b>	<b>07 (100)</b>
Menor que 20 anos	01 (14,2)
de 21 a 60 anos	04 (57,1)
Maior que 60 anos	02 (28,5)
<b>Sexo</b>	<b>07 (100)</b>
Fem.	02 (28,5)
Masc.	05 (71,4)
<b>Tipo da Lesão</b>	<b>09 (100)</b>
Úlcera	06 (66,7)
Cística	01 (11,1)
Tumor	02 (22,2)
<b>Cor da lesão</b>	<b>09 (100)</b>
Eritematosa	03 (33,3)
Semelhante à Mucosa Bucal	01 (11,1)
Dados faltantes	05 (55,6)
<b>Sintomatologia</b>	<b>07 (100)</b>
Sintomática	02 (28,5)
Assintomática	01 (14,2)
Dados faltantes	04 (57,1)
<b>Tipo de Biópsia</b>	<b>09 (100)</b>
Biópsia incisional	06 (66,7)
Biópsia excisional	01 (11,1)
Dados faltantes	02 (22,2)
<b>Status de HIV</b>	<b>07 (100)</b>
Positivo	01 (14,2)
Não Informado	06 (85,7)
<b>Localização</b>	<b>09 (100)</b>
Língua	04 (44,4)
Rebordo Alveolar inferior	02 (22,2)
Lábio	01 (11,1)
Mucosa jugal	01 (11,1)
Soalho bucal	01 (11,1)
<b>Tempo de Evolução (em meses)</b>	<b>07 (100)</b>
até 1 mês	01 (14,2)
de 1 a 2 meses	01 (14,2)
de 2 a 3 meses	01 (14,2)
mais que 3 meses	01 (14,2)
Indeterminado	02 (28,5)
Dados faltantes	01 (14,2)
<b>Tamanho (mm)</b>	<b>09 (100)</b>
até 10mm	03 (33,3)
de 10 a 59mm	01 (11,1)

maior ou igual a 60mm	01	(11,1)
Dados faltantes	04	(44,4)

---

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

## APÊNDICE D - Revisão de literatura para utilização dos primers

Quadro 4 – Use of different gene targets for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis, sensitivity and specificity of PCR tests

Reference	TB/Tissue	NAA's test	Gene	Primers	Amplicon size	Annealing (°C/min)	Cycle	St (%)	Sp (%)	
Barcelos <i>et al.</i> , 2008	Spleen (miliary TB)/FFPE	PCR	IS6110	F: CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG R: CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG	123	65	1	40	N.D.	N.D.
Alli <i>et al.</i> , 2011	Escarro	PCR	IS6110	F: CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG R: CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG	123	68	1	30	75,5	94,8
Khosravi <i>et al.</i> , 2017	EPTB	<i>nested</i> PCR	IS6110	outer F: ATCGTGGAAGCGACCCGCCAGCCCA GGAT R: CGGGACCACCCGCGGCAAAGCCCG CAGGAC	220	63	0,5	30	N.D.	N.D.
			inner	F: CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG R: CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG	123	68	0,5	35	N.D.	N.D.
De Almeida <i>et al.</i> , 2013	Culture	PCR	IS6110	F: CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG R: CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG	123	64	2	40	92,5	100
De Almeida <i>et al.</i> , 2015	Smear	PCR	IS6110	F: CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG R: CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG	123	68	2	40	37,5	100
Antonello <i>et al.</i> , 2021	EPTB/FFPE	ddPCR	IS6110	F: ATCTGGACCCGCCAA R: CCTATCCGTATGGTGGATAA	N.D.	56	1	39	98,5	100
			rpoB	F: GGAGCGCAAACCG R: AGTCCCGGAACCTCAA	N.D.	56	1	39	66,5	100
Bandyopadhyay <i>et al.</i> , 2008	EPTB/FFPE	GeneXpert® Multiplex PCR	MTB/RIF						79,4	100
			65 kDa	F: CTAGGTCGGGACGGTGAGGCCAGG R: CATTGCGAAGTGATTCCTCCGGAT	541	55	2	40	78,9	87,1
			<i>dnaJ</i>	F: AAGAGGAAGGAGAGAGGC R: GTCGTTGAGGTTGAACTC	365					
			IS6110	F: GTGGGCATGGTCGCAGAGAT R: CTCGATGCCCTCACGGTTCA	165					
		PCR	IS6110		N.D.	52	1	45	60	75

Chakravorty <i>et al.</i> , 2005	EPTB/ Smear and Culture		devR	F: ATCTGTTGTCCTCCGCATGCC R: GTCCAGCGCCCACATCTTT	N.D.				47	67
			Combined (devR + IS6110)						67	75
Da Cruz <i>et al.</i> , 2010	Blood and urine	<i>nested</i> PCR	IS6110	F: CCGCAAAGTGTGGCTAAC R: ATCCCCTATCCGTATGGTG	409	68	1	30	53.4	89.8
			Externo	F: AACGGCTGATGACCAAAC R: GTCGAGTACGCCTTCTTGTT	316	57	0,5	30		
Qing Jun, <i>et al.</i> , 2023	EPTB/FFPE	GeneXpert®	MTB/RIF						57,8	100
Allahyartorkaman <i>et al.</i> , 2019	PTB/FFPE EPTB/FFPE	GeneXpert®	MTB/RIF						95,5 76,5	96,7 95,9
Mustafa <i>et al.</i> , 2006	EPTB	<i>nested</i> PCR	IS6110	F: CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG R: CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG F: TTCGGACCACCAGCACCTAA R: TCGGTGACAAAGGCCACGTA	123	68	1	45	N.D.	N.D.
					92	58	1	35	N.D.	N.D.

Abbreviations: ddPCR: Droplet Digital PCR; EPTB: Extrapulmonary Tuberculosis; PTB: Pulmonary Tuberculosis; N.D.: Not Done; St: Sensitivity; Sp: Specificity  
Elaborado pelo próprio autor

APÊNDICE E – Capa manuscrito do artigo submetido no periódico *Oral Diseases* “*M. tuberculosis bacilli in oral biopsies containing granulomatous inflammation with caseous necrosis*”

Oral Diseases - Manuscript Copy



**M. tuberculosis bacilli in oral biopsies containing granulomatous inflammation with caseous necrosis**

Journal:	<i>Oral Diseases</i>
Manuscript ID	ODI-08-23--12974
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	21-Aug-2023
Complete List of Authors:	Bernardes, Vanessa; Universidade Federal de Minas Gerais Signoretti-Silva, Rubens Oliveira; Universidade Federal de Minas Gerais Gomez, Ricardo; Universidade Federal de Minas Gerais Diniz, Marina; Universidade Federal de Minas Gerais Miranda, Silvana Spíndola de; Universidade Federal de Minas Gerais Aguiar, Renato; Universidade Federal de Minas Gerais Figueredo, Lida Jouca de Assis; Universidade Federal de Minas Gerais Buzelin, Marcelo Araújo; Laboratory Center Specialized in Histotechnology Araújo, Thais Lima; Universidade Federal de Minas Gerais
Keywords:	Oral tuberculosis, Ziehl-Neelsen, Immunohistochemistry, nested-PCR, GeneXpert® MTB/RIF
Research Topics:	Oral and systemic health
Fixed Keywords List:	

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Oral Diseases - Manuscript Copy