



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**  
**DOUTORADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**SEGURANÇA E EFICÁCIA DE N-ACETILCISTEÍNA EM INDIVÍDUOS**  
**HOSPITALIZADOS COINFECTADOS COM HIV E TUBERCULOSE**  
**PULMONAR: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO, FASE II**

**(ESTUDO RIPENACTB)**

**IZABELLA PICININ SAFE**

**MANAUS**

**2019**

**IZABELLA PICININ SAFE**

**SEGURANÇA E EFICÁCIA DE N-ACETILCISTEÍNA EM INDIVÍDUOS  
HOSPITALIZADOS COINFECTADOS COM HIV E TUBERCULOSE  
PULMONAR: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO, FASE II**

**(ESTUDO RIPENACTB)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de *Doutor em Doenças Tropicais e Infecciosas*.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Cordeiro dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Vanderson de Souza Sampaio

**MANAUS**

**2019**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

128s Safe, Izabella Picinin

Segurança e eficácia de N-acetilcisteína em indivíduos hospitalizados coinfectados com HIV e tuberculose pulmonar: ensaio clínico randomizado, fase II : Estudo RIPENACTB / Izabella Picinin Safe. Manaus : [s.n], 2019. 103 f.: color.; 28 cm.

Tese - Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical UEA/FMT-HVD - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.

Inclui bibliografia

Orientador: Santos, Marcelo Cordeiro

Coorientador: Sampaio, Vanderson de Souza

1. Tuberculose pulmonar. 2. HIV. 3. N-acetilcisteína 4. Glutathiona 5. Terapia adjuvante. I. Santos, Marcelo Cordeiro (Orient.). II. Sampaio, Vanderson Souza (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Segurança e eficácia de N-acetilcisteína em indivíduos hospitalizados coinfectados com HIV e tuberculose pulmonar: ensaio clínico randomizado, fase II

*A todas as mulheres que conseguiram chegar até aqui, exercendo ao mesmo tempo várias funções, entre elas, a mais difícil, a de ser mãe. Que a minha pequena Maísa possa um dia desfrutar desse mesmo sentimento, o de ter feito valer a pena.*



***Ann-Moira e a ilustre Sra. Forbes-Sample***

John Lavery, 1923

## AGRADECIMENTOS

*A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu chegasse até aqui, em especial:*

*À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, que me ensina o que não está escrito nos artigos;*

*Aos pacientes coinfectados com TB/HIV, que contribuíram para que pudéssemos entender um pouco mais sobre a doença infecciosa que mais mata no mundo;*

*Ao Prof. Dr. Marcelo Cordeiro dos Santos, pelas oportunidades dadas, que contribuíram para o meu crescimento profissional;*

*Ao Prof. Dr. Vanderson de Souza Sampaio, pela paciência e acolhimento;*

*Ao Prof. Dr. Bruno Bezerril-Andrade e equipe, pela parceria;*

*A todos da Equipe RePORTBrazil, pelo trabalho diário e em conjunto;*

*À Gerência de Tuberculose da FMT-HVD, sem vocês nada teria acontecido;*

*Aos professores da pós-graduação que conheci de perto, pelos conhecimentos divididos;*

*À Simone, por exercer a mais bela das ciências, e ter me auxiliado a encarar o desafio de manter o equilíbrio emocional durante essa fase;*

*Ao Café do Futuro, onde passei boa parte do tempo escrevendo o artigo principal dessa tese;*

*À minha filha Máisa Safe de Lacerda, que foi o meu p mais significativo encontrado aos longos desses quatro anos;*

*Ao meu esposo, Marcus Lacerda, que além de ter contribuído intelectualmente, me abraçou todas as noites e conseguiu me fazer rir das maiores desgraças pelas quais um aluno de doutorado podia passar. Eu amo você;*

*E a todos os peões desse xadrez, não listados aqui, mas que como regra, só andaram comigo pra frente, contribuindo para que esse estudo acontecesse e chegasse até o final. Meu muito obrigada.*

## **AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

*À Cooperação Interfederativa do Amazonas (INTERFAM), iniciativa do antigo Departamento de Aids e Hepatites Virais, do Ministério da Saúde, por ter contribuído com essa pesquisa, possibilitando o desenvolvimento científico do Estado do Amazonas e a prática da Medicina baseada em evidências na assistência de indivíduos que convivem com HIV.*

*À CAPES, pelas bolsas de doutorado pagas durante boa parte do meu curso.*

*À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, que através do financiamento do Sistema Único de Saúde, patrocinou em grande parte a assistência dos pacientes incluídos nessa tese.*

*Ao estudo RePORT-Brazil, onde tudo começou.*

## EPÍGRAFE



Acervo pessoal

*“Santa Teresa rogai por nós (...)  
Rogai pelos tísicos  
Rogai pelos cardíacos  
Rogai pelos tabéticos  
Rogai pela gente de folego curto  
Santa Teresa rogai por nós...”*

**Manuel Bandeira**



Acervo pessoal

*“Senhor! Piedade! Meus pulmões negros / Sofrem agora angústias tamanhas / Que  
eles no seu retiro nefando / Recordam duas torvas montanhas / Que o túnel da  
amargura vai cavando.  
No meu pulmão há jardineiros / Que, quando chega a primavera, / Cuidam dos  
trágicos canteiros / Donde despontam papoulas fluídicas, / Vermelhas rosas  
liquefeitas.  
Sangue que não te estancas! / Suor que não te enxugas! / Andam por meu pulmão  
milhões de sanguessugas! / Vai prossequindo o louco a canção otimista: / Pulmão!  
Pulmão! Ó meu triste pulmão! / Como se o desgraçado tivesse pulmão”.*

**Boris Vian**

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Apesar da disponibilidade de antimicrobianos eficazes, a tuberculose (TB) ainda é uma séria ameaça à saúde. A mortalidade é ainda maior em pessoas vivendo com HIV. Novas terapias são necessárias para reduzir o tempo necessário para curar a TB e diminuir as taxas de mortalidade nessa população. A N-acetilcisteína (NAC) é um precursor da glutathione e demonstrou recentemente, *in vitro*, apresentar atividade antimicobacteriana. **OBJETIVO:** Testar a hipótese de que a NAC é segura, bem tolerada e secundariamente eficaz como terapia adjuvante em indivíduos hospitalizados coinfectados com TB/HIV. **MÉTODOS:** Foi realizado um estudo randomizado, de grupo paralelo, em centro único, de dois braços, em pacientes hospitalizados acima de 18 anos de idade, com TB pulmonar confirmada microbiologicamente e infecção por HIV. Um braço foi tratado com rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (RIPE) em doses padrão (grupo controle) e um segundo braço em que NAC 600 mg de 12/12 horas foi adicionada ao esquema RIPE por oito semanas (grupo NAC). **RESULTADOS:** Um total de 21 e 18 pacientes foram incluídos no grupo controle e no grupo NAC, respectivamente. Os eventos adversos não foram diferentes. Tendências na conversão da cultura ao final de 8 semanas foram observadas no grupo NAC ( $p=0,083$ ). A NAC reduziu o estresse oxidativo e aumentou os níveis de glutathione. **CONCLUSÃO:** Nossos resultados sugerem que, na população mais crítica de pacientes coinfectados TB/HIV, os eventos adversos não foram diferentes entre os grupos. A NAC reduz o estresse oxidativo e aumenta os níveis de glutathione. Talvez isso possa contribuir para acelerar a conversão da cultura, com potencial impacto no prognóstico e na transmissão. **Registro do ensaio clínico NCT03281226.**

**Palavras Chaves:** Tuberculose; HIV; N-acetilcisteína

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Despite the availability of effective antimicrobials, tuberculosis (TB) is still a serious health threat. Mortality is even higher in people living with HIV who are diagnosed with TB. New therapies are needed to shorten the time required to cure TB and decrease fatality rates in this population. N-acetylcysteine (NAC) is a glutathione precursor and has shown recently in experimental setting to present anti-mycobacterial activity. **OBJECTIVE:** To test the hypothesis that NAC is safe, well tolerated and secondarily efficacious as adjunctive therapy in hospitalized individuals with HIV-associated TB. **METHODS:** We performed a randomized, parallel group, single-center, open study trial of two arms, in hospitalized patients over 18 years of age, with microbiologically confirmed pulmonary TB in HIV infection: one arm with rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol at standard doses (Control Group), and a second arm in which NAC 600 mg bid for eight weeks was added (NAC Group). **RESULTS:** A total of 21 and 18 patients were enrolled to the Control Group and NAC Group, respectively. Adverse events were not different. Trends in culture conversion at the end of 8 weeks was seen in the NAC group ( $p=0,083$ ). NAC reduces oxidative stress and increases glutathione levels. **CONCLUSIONS:** Our findings suggest that in the more critical population of patients with HIV-associated TB, adverse events were not different between groups. NAC reduces oxidative stress and increases glutathione levels. This may contribute to fasten culture conversion, with potential impact on prognosis and transmission. **Clinical Trials Registration NCT03281226.**

**Keywords:** Tuberculosis; HIV; N-acetylcysteine

## RESUMO LEIGO

A N-acetilcisteína (NAC) é uma medicação liberada no Brasil e é comum o uso nas pessoas com doenças pulmonares. Estudos recentes mostram que essa medicação possui outras propriedades e pode auxiliar no tratamento da tuberculose (TB), que atualmente é a doença infecciosa que mais mata no mundo e que acomete com frequência pacientes que vivem com HIV. Esse estudo utilizou comprimidos de NAC em conjunto com o tratamento padrão para TB pulmonar, em indivíduos internados com HIV, considerados pelo médico como doentes graves. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os grupos quanto aos efeitos colaterais e que a NAC talvez possa diminuir o tempo em que o exame da tuberculose fica positivo, podendo assim, contribuir para a cura e redução de transmissão da TB. Com a realização de mais estudos, é possível que essa medicação, com poucos efeitos colaterais, possa ser usada junto com os remédios para TB, no futuro.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Glutathione e seus precursores.....	09
Figura 2 - Alterações prospectivas em níveis de mediadores de inflamação em pacientes com TB sob tratamento anti-TB, em uso de NAC (A) e sem NAC (B).....	56
Figura 3 - Análise de rede das matrizes de correlação de biomarcadores em diferentes pontos dos tratamento com e sem NAC.....	57
Figura 4 - Medidas de peroxidação lipídica e glutathione.....	58

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1:	Sumário da distribuição das visitas e respectivos procedimentos realizados (Protocolo RIPENACTB).....	17
Tabela 2:	Esquema de tratamento nos indivíduos do grupo controle.....	20
Tabela 3:	Esquema de tratamento nos indivíduos do grupo NAC.....	20

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>AIDS</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>ANTI-TB</b>	Antituberculostáticos
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AST</b>	Aspartato aminotrasferase
<b>BAAR</b>	Bacilo álcool-ácido resistente
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CONSORT</b>	Consolidated Standards of Reporting Trials
<b>DPOC</b>	Doença pulmonar obstrutiva crônica
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EA</b>	Evento adverso
<b>EAS</b>	Evento adverso sério
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FMT-HVD</b>	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>IATA</b>	Associação de Transporte Aéreo Internacional
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INTERFAM</b>	Cooperação Interfederativa do Amazonas
<b>LJ</b>	Löwenstein-Jensen
<b>MDR-TB</b>	Tuberculose multirresistente
<b>MGIT</b>	Tubo indicador de crescimento de micobactérias
<b>MHC</b>	Complexo de histocompatibilidade
<b>MTB</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OR</b>	Odds ratio

<b>PBMC</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>RIPE</b>	Rifampicina, isoniazida, pirazinamida, etambutol
<b>RI</b>	Rifampicina e isoniazida
<b>TARV</b>	Terapia antirretroviral
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TRM-TB</b>	Teste rápido molecular para TB
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>XDR-TB</b>	Tuberculose extensivamente resistente

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>1.1. Agente etiológico e transmissão.....</b>	<b>01</b>
<b>1.2. Breve histórico da tuberculose.....</b>	<b>02</b>
<b>1.3. Cenário epidemiológico.....</b>	<b>03</b>
1.3.1. Tuberculose no mundo.....	03
1.3.2. Tuberculose no Brasil e no Estado do Amazonas.....	03
1.3.3. Tuberculose na população HIV.....	04
<b>1.4. Diagnóstico da coinfeção TB/HIV (TB pulmonar).....</b>	<b>04</b>
<b>1.5. Tratamento da tuberculose.....</b>	<b>05</b>
1.5.1. Tratamento adjuvante da tuberculose.....	06
<b>1.6. Fisiopatogenia da tuberculose.....</b>	<b>06</b>
1.6.1. O papel da glutatona e da N-acetilcisteína.....	08
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1. Objetivo primário.....	13
2.2. Objetivos secundários.....	13
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Descrição do estudo.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Local do estudo.....</b>	<b>14</b>
<b>3.3. Participantes.....</b>	<b>14</b>
3.3.1. Critérios de elegibilidade.....	14
3.3.2. Critérios de não inclusão.....	15
3.3.3. Critérios de exclusão.....	15
3.3.4. Cálculo do tamanho da amostra.....	15
<b>3.4. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO.....</b>	<b>16</b>
3.4.1. Recrutamento e alocação do tratamento.....	16

3.4.2. Procedimento de seguimento.....	16
3.4.2.1. Esquema das visitas.....	16
3.4.2.2. Coleta de registros e informações.....	18
3.4.2.3. Procedimentos laboratoriais.....	18
<b>3.5. INTERVENÇÕES.....</b>	<b>19</b>
3.5.1. Tratamentos.....	19
3.5.2. Armazenamento e manuseio das medicações.....	21
3.5.3. Aderência ao tratamento.....	21
3.5.4. Medicções concomitantes.....	21
3.5.5. Tratamento após o término do estudo.....	21
3.5.6. Tratamento de superdose do medicamento em investigação.....	21
<b>3.6. INSTRUÇÕES DE SEGURANÇA.....</b>	<b>22</b>
3.6.1. Definições de Evento Adverso e Evento Adverso Sério.....	22
3.6.2. Monitoramento dos eventos adversos.....	22
<b>3.7. DEFINIÇÃO DOS DESFECHOS ANALISADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3.7.1. Segurança.....</b>	<b>23</b>
3.7.1.1. Tolerabilidade clínica.....	23
3.7.1.2. Tolerabilidade biológica do ponto de vista hepático.....	23
<b>3.7.2. Efetividade.....</b>	<b>23</b>
3.7.2.1. Conversão da cultura ou baciloscopia.....	23
3.7.2.2. Padrão radiológico.....	24
<b>3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>24</b>
<b>3.9. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....</b>	<b>25</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
4.1. Artigo 1.....	26
4.2. Resultados adicionais.....	56
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>

<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>75</b>
8.1. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	75
8.2. Carta de aceite do Comitê de Ética em Pesquisa.....	83
8.3. Lista de artigos publicados durante o doutorado.....	84
8.4. Lista de artigos submetidos durante o período.....	85

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Agente etiológico e transmissão

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa, de caráter crônico, causada por bacilos pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), que pode infectar várias espécies de animais, sendo Mtb o principal agente causador da TB em humanos (1). Embora primariamente seja um patógeno pulmonar, o Mtb pode causar doença em quase todas as partes do corpo, quadro clínico conhecido como TB extrapulmonar (2).

Mtb é um bacilo aeróbico, imóvel, não-esporulado, não-encapsulado. Ele cresce com mais sucesso em tecidos ricos em oxigênio, como os pulmões. Sua parede celular é complexa, rica em lipídeos e formada por ácidos micólicos, o que a torna hidrofóbica, e uma vez corada com corantes básicos, não pode ser descorada com solução de álcool e ácido, propriedade chamada bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (3).

A transmissão da doença ocorre mais comumente de pessoa a pessoa pelo ar, via aerossóis produzidos por indivíduos infectados ao tossir, falar, cantar ou espirrar. Devido ao seu pequeno tamanho, as partículas podem permanecer no ar por alguns minutos ou horas, após a expectoração por pessoas doentes (4). Essas partículas de aerossol contendo o bacilo, que ficou conhecido como bacilo de Koch, por ter sido descoberto por Robert Koch (1882), são inaladas por indivíduos saudáveis e, desta forma, alojam-se nos alvéolos pulmonares (3).

A infecção por Mtb pode ser contida pelo sistema imune do hospedeiro (TB latente) ou cursar com o adoecimento (TB ativa). Embora o risco de adoecer tenha diversos aspectos envolvidos, a probabilidade anual de desenvolver TB ativa é pequena, com um risco estimado de vida em torno de 10%, com aproximadamente metade desse risco ocorrendo nos primeiros dois anos após a infecção (5,6). A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o fator de risco mais importante para

um indivíduo adoecer e estima-se que esse risco seja 20 - 40 vezes maior quando comparado a pessoas não-infectadas por HIV (7).

## 1.2. Breve histórico da tuberculose

Especula-se que o gênero *Mycobacterium* tenha se originado há mais de 150 milhões de anos (8). Ao longo de toda a história da humanidade, TB vitimou milhares. Na Idade Média, a TB ganglionar, conhecida como escrófula, foi tratada como o “toque real” e milhares de acometidos foram tocados com a ideia de que um monarca poderia curar um súdito apenas com o contato de suas mãos (9). Durante os séculos XVIII e XIX, a TB ganhou proporções epidêmicas e ganhou o apelido de “capitão entre esses homens da morte” (10).

Robert Koch, nome que deu origem ao bacilo de Koch, assim ficou famoso por ter sido capaz de isolar, cultivar e inocular o bacilo em animais de laboratório. Foi em 1882 que esse cientista registrou um marco na história da TB. Em 1905, ele recebeu o prêmio Nobel de Medicina (11).

No século XIX surgiu a ideia do tratamento da TB em estabelecimentos fechados, os sanatórios, onde os doentes deveriam permanecer. *Sanitarium*, vem da palavra *sanitas*, que do latim significa saúde, saudável (12). A terapia medicamentosa teve início em 1943, com a descoberta do ácido para-amino-salicílico e da tiacetazona, que culminou em 1945, na produção dos primeiros tuberculostáticos (anti-TB). Em 1944, foi isolada a estreptomicina, primeiro anti-TB com ação bactericida (10). Neste mesmo ano, um paciente que recebeu o tratamento foi declarado curado da doença. Em 1951, a isoniazida foi testada. Ela foi seguida pelo desenvolvimento da pirazinamida (1952), cicloserina/terizidona (1952), etionamida (1956), rifampicina (1957), capreomicina (1959) e etambutol (1962) (13,14). A rifampicina revolucionou o tratamento da TB, mas logo a monoterapia foi desencorajada e surgiram as combinações terapêuticas, uma estratégia utilizada até hoje. Posteriormente, foram

surgindo outros anti-TB e mais recentemente foram aprovadas a delamanida e a bedaquilina, para o tratamento de Mtb resistente (15).

### **1.3. Cenário epidemiológico**

#### **1.3.1. Tuberculose no mundo**

Em 2017, 10 milhões de pessoas desenvolveram TB ativa, acometendo 5.8 milhões de homens, 3.2 milhões mulheres e um milhão crianças. Houve casos em todas as faixas etárias, mas no geral, 90% ocorreram em adultos com idade igual ou superior a 15 anos. A TB é uma das dez principais causas de morte no mundo e é a principal causa de morte em pessoas com HIV. Dos 10 milhões de indivíduos que adoeceram em 2017, 1,6 milhões morreram (incluindo 0,3 milhão de pessoas com HIV). Mesmo com esses números elevados, estima-se que 54 milhões de vidas foram salvas através do diagnóstico e tratamento, entre os anos de 2000 e 2017 (16).

#### **1.3.2. Tuberculose no Brasil e no Estado do Amazonas**

O Brasil está entre os países que concentram mais de 80% dos casos de TB no mundo (16). Só em 2018 foram registrados 72.788 casos novos, sendo que 72,7% dos casos novos pulmonares apresentaram confirmação laboratorial. Em 2017, foram 4.534 óbitos pela doença, correspondendo a um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos/100 mil habitantes (17).

O Estado do Amazonas, localizado na região norte do Brasil, é dividido em 62 municípios, tendo uma população estimada em 3.483.985 habitantes em 2011, 52% vivendo na capital, Manaus (18). Aproximadamente 70% dos casos registrados de TB no estado são residentes da capital (19). Em 2018, o Amazonas foi o estado com maior coeficiente de incidência (72,9 casos/100 mil habitantes) (17). Casos de TB foram registrados na população amazônica desde o século XIX, época em que a doença era a segunda principal causa de morte (20).

### 1.3.3. Tuberculose na população HIV

Após o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids), houve um aumento mundial no número de casos de TB. O HIV é o principal fator predisponente para desenvolvimento da TB (7). Só em 2018, havia aproximadamente 37,9 milhões de pessoas vivendo com HIV, com 1,7 milhões de pessoas sendo infectadas recentemente e 770.000 mortes por Aids. Entre os 10 milhões de pessoas que desenvolveram TB em 2017, 9% estavam vivendo com HIV. Estima-se que 49% das pessoas que vivem com HIV e TB desconhecem a sua coinfeção (21).

Um estudo realizado em Manaus, Amazonas, revelou que a TB foi a principal causa de óbito (28%) entre os 129 doentes com Aids autopsiados (22). Em 593 autopsias de indivíduos com HIV realizadas na África Subsaariana, as doenças infecciosas foram o principal diagnóstico *post mortem*, sendo a TB a mais comum e variando de 20 a 54% (23). TB continua sendo a principal causa de morte nessa população, representando cerca de um em cada três mortes relacionadas à Aids (21).

### 1.4. Diagnóstico da coinfeção TB/HIV (TB pulmonar)

O diagnóstico inicial da TB pulmonar deve ser feito com a suspeita clínica precoce, mas nem sempre a sintomatologia clássica de tosse, dor torácica, dispneia, hemoptise, febre, suores noturnos e perda de peso vai estar presente. Pode ocorrer até do paciente ser oligoassintomático ou assintomático (24). O quadro típico de TB pulmonar é geralmente visto com contagem de linfócitos CD4<sup>+</sup> acima de 200 células/mm<sup>3</sup> (25). O diagnóstico é auxiliado por um exame de imagem do tórax, mas lesões cavitárias são incomuns em doentes com imunossupressão grave, sendo necessário um alto índice de suspeita para o diagnóstico oportuno (26).

O diagnóstico microbiológico é feito através da microscopia da amostra respiratória que busca por BAAR. A baciloscopia tem sensibilidade baixa e variável (30 – 60%), mas por ser um recurso fácil e barato, é amplamente utilizado (27). O teste rápido molecular atua como uma ferramenta diagnóstica inicial, informando

simultaneamente a susceptibilidade à rifampicina. O Xpert MTB/RIF® foi aprovado pela OMS em dezembro de 2010, e fornece o resultado em menos de duas horas e pode detectar até 100 unidades formadoras de colônia (UFC), melhorando a sensibilidade para pacientes com baixa carga bacilar, quando comparado à baciloscopia (28). Ele não substitui o exame padrão ouro, que é a cultura de Mtb com teste de sensibilidade aos anti-TB. Em indivíduos coinfectados TB/HIV, a cultura em meio líquido (MGIT®) pareceu demonstrar superioridade quando comparada ao meio sólido Löwenstein-Jensen (LJ), com maior rendimento e menor influência pela contagem de células CD4<sup>+</sup> em relação à positividade da cultura (29).

### **1.5. Tratamento da tuberculose**

Embora o esquema de primeira linha para tratar TB seja semelhante na população não HIV, o tratamento da TB com terapia antirretroviral (TARV) envolve desafios, incluindo o momento ideal para iniciar os antirretrovirais, número de comprimidos, tolerabilidade, poucas opções terapêuticas devido a interações medicamentosas de antirretrovirais com a rifampicina e risco da síndrome de reconstituição imune. Apesar da TB ser uma doença potencialmente curável e a TARV melhorar a sobrevida, a mortalidade é alta em pessoas com HIV diagnosticadas com TB durante uma internação hospitalar (30,31).

A OMS (2010) recomenda que o tratamento dos casos novos de TB (independente do HIV) seja com o esquema de primeira linha que é composto por dois meses (fase intensiva com 60 doses) de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (RIPE), e no mínimo quatro meses (fase de manutenção com 120 doses) de rifampicina e isoniazida (RI), sendo seis meses o período mínimo de tratamento (32). O Ministério da Saúde do Brasil adota conduta semelhante a OMS e disponibiliza os comprimidos em dose fixa combinada, de acordo com o peso (33). O sucesso no tratamento e alcance da cura dependerá da melhora clínica, radiológica e microbiológica. Sem tratamento adequado, em média, 45% das pessoas HIV negativas e todas as pessoas HIV positivas morrerão (34).

### **1.5.1. Tratamento adjuvante da tuberculose**

Apesar dos esforços para controlar a TB, desafios são enfrentados no tratamento da doença. São alguns deles: a) preocupação com o surgimento e desenvolvimento de espécies multirresistentes (MDR-TB) e extensivamente resistentes ao anti-TB (XDR-TB); b) falta de vacinas eficazes para controlar a infecção; c) longa duração do tratamento que atualmente tem tempo mínimo de seis meses; d) toxicidade medicamentosa. Avanços são necessários para o desenvolvimento de regimes mais curtos, com menos comprimidos, mais eficazes, mais seguros e com melhor tolerabilidade (35).

Além dos novos antimicrobianos, estudos estão sendo feitos com terapias direcionadas ao hospedeiro, com intuito de melhorar a resposta imune, modular a inflamação para reduzir o dano nos tecidos dos órgãos-alvo e melhorar a efetividade do tratamento antimicrobiano na eliminação da infecção (36). As terapias com esse fim são chamadas de terapia adjuvante e o emprego desses agentes em combinação com os antibióticos pode ser uma abordagem promissora para as controlar doenças infecciosas e obter melhores desfechos (37,38). N-acetilcisteína (NAC), medicação investigacional desse estudo, é um exemplo de terapia adjuvante no tratamento da TB.

### **1.6. Fisiopatogenia da tuberculose**

Após a inalação de partículas infectantes, contendo bacilos vivos, esses passam ao longo da traquéia, brônquios, bronquíolos e chegam aos alvéolos. Nas vias aéreas, a mucosa respiratória desencadeia a primeira linha de defesa. Os alvéolos são formados por células epiteliais do tipo I e II, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (39). Algumas destas células são capazes de realizar o processo de fagocitose (ou endocitose), e por isso são chamadas de fagócitos. Os macrófagos alveolares são importantes fagócitos envolvidos na resposta imune inicial (ou inata) ao Mtb. A fagocitose do bacilo envolve a participação de diferentes receptores e quando em ambiente intracelular, uma sequência de eventos é desencadeada resultando no

objetivo final que é a destruição do microrganismo. Dentre estes eventos, podemos destacar: a fusão do fagossomo com o lisossomo possibilitando que enzimas proteolíticas em pH ácido possam atuar sobre o microrganismo; produção de produtos químicos com ação antimicrobiana como o peróxido de hidrogênio (intermediários reativos do oxigênio) e o óxido nítrico (intermediários reativos do nitrogênio), metais tóxicos como ferro, zinco e cobre; e morte celular por apoptose (40). O êxito na resposta imune inicial dependerá da capacidade microbicida dos fagócitos e da virulência da cepa de Mtb (41).

As células dendríticas, após a fagocitose do bacilo, migram do local da infecção para o linfonodo mais próximo, onde apresentam os peptídeos antigênicos do Mtb aos linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup>, através da expressão do receptor complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe II (42). Esta interação celular representa a ativação da resposta imune adquirida, o que faz com que os linfócitos migrem do tecido linfonodal para o parênquima pulmonar, auxiliando os fagócitos lá presentes (43). Os macrófagos também são células apresentadoras de antígenos, mas esse processo ocorre no alvéolo pulmonar. O controle do Mtb depende principalmente do sucesso dessa interação. O déficit de linfócitos T CD4<sup>+</sup> na Aids mostra a importância destas células no controle da TB. As ações descritas são requeridas para a produção de citocinas, que são proteínas com a função de modular a ação das células imunes. Elas influenciam os linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naïve* a se diferenciarem em diferentes linhagens. A interleucina-12 (IL-12) produzida por fagócitos, induz a linhagem Th1 e a produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), que é a principal citocina envolvida na resposta imune ao Mtb. Outras células podem produzir IFN- $\gamma$ , mas são esses linfócitos os principais produtores. Ao contrário, a linhagem Th2 induzida pela produção de IL-4, inibe a produção de IFN- $\gamma$  e conseqüentemente a ativação dos fagócitos (41).

Quando a resposta imune Th1 predomina, ocorre a formação de granulomas, que são células de defesa atuando conjuntamente na tentativa de conter a propagação dos bacilos, já que não pode erradicá-los, o que caracteriza a TB latente (44). Mediante a sinalização celular adequada, os monócitos se diferenciam em macrófagos, uma

etapa crucial na formação do granuloma e contenção do Mtb (45). Na falha da vigilância imunológica, a doença pode ser reativada e disseminada. Os bacilos tendem a se concentrarem no centro do granuloma, que é frequentemente necrosado e contém macrófagos rodeados por fibroblastos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos. A necrose é chamada de caseosa, do latim *caseum*, que significa queijo, pela consistência macroscópica da necrose (46). Apesar do granuloma ter o intuito de conter a propagação do bacilo, alguns estudos sugerem que este ambiente de necrose caseosa pode ser propício para a multiplicação de Mtb (47).

A interferência nos mecanismos de defesa do hospedeiro é crucial para a sobrevivência de Mtb no ambiente intracelular. Alguns bacilos são capazes de se adaptarem a resposta imune, escapando das estratégias do hospedeiro (48). A inibição da fusão do fagossomo com o lisossomo representa um dos principais mecanismos de escape do bacilo à ação das hidrolases lisossomais (49). O bloqueio permite aos bacilos a sobrevivência intracelular e impede a apresentação de antígenos necessária para ativação dos linfócitos (50). Outra forma de defesa do Mtb é poder neutralizar a produção de intermediários reativos do oxigênio (51). Além destes mecanismos, uma das táticas de evasão da resposta imune tardia é o estímulo da produção de IL-10 pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, tendendo a uma resposta do tipo Th2, em que a secreção de IFN- $\gamma$  é inibida, favorecendo ao Mtb (52).

As diferentes manifestações da TB refletem o equilíbrio entre os mecanismos de defesa do Mtb e do hospedeiro (41). Em mais de 90% das pessoas infectadas, Mtb está contido na forma latente, permanecendo o indivíduo saudável (53). Se a contenção e eliminação dos bacilos não forem suficientes, há uma disseminação linfática até o linfonodo satélite, de onde poderá haver uma disseminação hematogênica, causando as diferentes formas extrapulmonares da TB (54).

### **1.6.1. O papel da glutatona e da N-acetilcisteína**

A glutathiona é um tripeptídeo sintetizado por meio da adição sequencial de cisteína ao ácido glutâmico, seguido pela adição de glicina ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina). O grupo sulfidríla (-SH) da cisteína é o componente ativo (55).

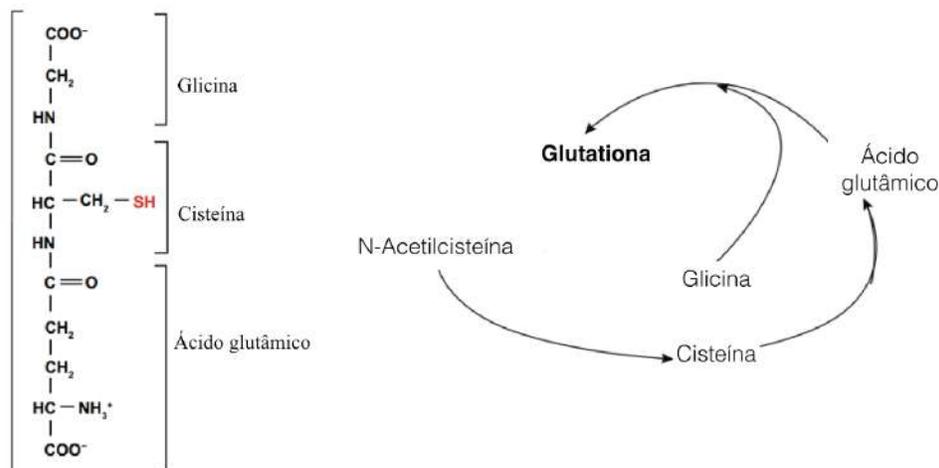


Figura 1: Glutathiona e seus precursores. Adaptado de Pietro Ghezzi, 2011 (55).

Esse tripeptídeo está presente na maioria das células do organismo humano e desempenha diferentes funções, dentre elas a manutenção da viabilidade celular. Um dos mecanismos utilizados para morte intracelular de microrganismos é a produção de substâncias oxidantes como os intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio. Durante este processo é necessário também a síntese simultânea de antioxidantes, a fim de proteger as células do hospedeiro contra os efeitos tóxicos desse mecanismo bactericida. A glutathiona é um dos mais importantes antioxidantes produzido pelo hospedeiro. O desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes é denominado estresse oxidativo, e leva à redução dos níveis de glutathiona e seus precursores (56,57). Tem sido descrita a ação da glutathiona na modulação do sistema imune, particularmente nos linfócitos. Níveis baixos podem inibir as citocinas envolvidas na resposta Th1 e induzir a apoptose dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (58,59).

Embora alguns outros antioxidantes como vitamina C e vitamina K possam neutralizar diretamente os radicais livres, eles não repõem a cisteína necessária para a síntese de glutathiona (57). A administração de glutathiona não é considerada eficaz

devido à sua fraca biodisponibilidade e sua limitada capacidade de atravessar a bicamada fosfolipídica de células. Do mesmo modo, a cisteína sofre rápida oxidação para o seu dissulfureto, cistina, que tem pobre solubilidade.

NAC teve seu primeiro benefício relatado durante os anos 1960, quando mostrou ser um agente mucolítico eficaz em indivíduos com fibrose cística. Posteriormente, um novo papel surgiu ao investigar seu potencial terapêutico na intoxicação por acetaminofeno. A clivagem do grupo acetilo torna a cisteína disponível para posterior incorporação na síntese da glutathione (figura 1), diminuída na lesão hepática causada pelo acetaminofeno. Esse mecanismo faz com que NAC exerça um efeito antioxidante indireto, o que despertou nos anos 1980 um interesse em estudar o efeito dela nas doenças que cursam com estresse oxidativo (60). Diferentes linhas de pesquisa abordaram o tema. O estudo PANTHEON propôs NAC como composto adjunto no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), a fim de evitar exacerbações no quadro clínico do paciente, sendo seu uso preconizado a longo prazo (por um ano), com doses diárias de 1.200 mg do composto (61).

TB e infecção por HIV também são doenças que cursam com um estímulo inflamatório crônico, com constante formação de radicais livres que, em excesso, podem gerar o estresse oxidativo celular e sistêmico. Os efeitos de NAC em ambas populações são estudados. Alguns autores mostraram que indivíduos com TB possuem subníveis de glutathione (62–64). O mesmo ocorreu em um modelo de animais infectados com o Mtb, sugerindo que o estresse oxidativo foi devido, em parte, a defesa antioxidante pobre do hospedeiro. A suplementação de NAC diminuiu a carga bacteriana no baço e a gravidade da necrose no pulmão (65). Também foi visto que NAC é capaz de provocar melhora na resposta granulomatosa contra o Mtb (45).

O equilíbrio entre as substâncias oxidantes e antioxidantes desempenha um papel crítico na indução da produção de IL-12, envolvida na resposta Th1 e sugere que o uso de NAC pode ser útil para um melhor controle imunológico da TB (66). IL-6 é uma citocina pró-inflamatória gerada em resposta a fatores que levam ao dano tecidual. A

redução dessa citocina foi vista quando utilizada NAC *in vitro*, sugerindo que isso possa ajudar na regulação negativa de danos as células hospedeiras (45).

Benefícios adicionais da NAC em indivíduos com TB estão relacionados ao possível efeito protetor hepático às drogas anti-TB (67) e ao efeito antimicrobiano direto demonstrado *in vitro*. O tratamento com NAC em culturas de Mtb reduziu a atividade metabólica bacteriana após 5 dias de tratamento, não sendo constatada alteração (aumento ou redução) na carga bacteriana durante o período do experimento. Esses achados sugerem que a NAC tenha ação bacteriostática direta no crescimento do bacilo (68). Embora a NAC não seja um antibiótico, ela possui propriedades antimicrobianas e também tem sido testada em biofilmes bacterianos de patógenos clinicamente relevantes (69).

Níveis diminuídos de glutathione foram relatados em pacientes com HIV em glóbulos vermelhos, células natural killer (NK), macrófagos e linfócitos T, e correlacionam-se com o controle diminuído da infecção por Mtb (70,71). Isso porque as células NK e os macrófagos são componentes importantes no sistema imune inato, que contribuem significativamente em indivíduos imunocomprometidos sem uma resposta suficiente dos linfócitos T (72). Os baixos níveis de glutathione nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> quando comparados ao controle saudável são restaurados após suplementação *in vivo* com NAC, favorecendo a produção de citocinas envolvidas na resposta Th1. O tratamento de células infectadas com o vírus HIV com NAC diminuiu os níveis de IL-1, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-6, e aumentou os níveis de INF- $\gamma$  (73). Também observaram que a depleção de glutathione em linfócitos esteve correlacionada a níveis aumentados de TNF e radicais livres. O TNF é uma citocina pró-inflamatória associada a progressão do HIV e manutenção do dano inflamatório (74). Espécies reativas do oxigênio geradas no estresse oxidativo estão envolvidas na ativação do fator nuclear-kB que controla a transcrição de genes para a replicação do HIV (75). disso, o estresse oxidativo tem sido associado ao processo de envelhecimento por meio de danos celulares e talvez seja uma explicação ao mecanismo pelo qual o HIV pode levar ao envelhecimento prematuro (76).

A incapacidade do sistema imune de indivíduos HIV em conter Mtb pode ser em consequência dos baixos níveis de glutathione nos macrófagos (73). A restauração dos níveis de glutathione reverteu a perda das funções da imunidade inata, o que sugere um novo mecanismo de controle de Mtb e um possível complemento ao tratamento antirretroviral (77).

Assim, a hipótese que pretendemos testar foi a de que NAC é uma medicação segura em pacientes com coinfeção TB/HIV, hospitalizados, por acreditar que são os pacientes que mais poderiam se beneficiar da introdução de mais uma opção terapêutica, em função do seu risco aumentado de morte. Secundariamente, a eficácia da terapia adjuvante com NAC foi avaliada, apesar do pequeno número de pacientes incluídos no estudo de segurança.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo primário**

Avaliar segurança e tolerabilidade da NAC como terapia coadjuvante no tratamento da TB em indivíduos com HIV internados em instituição terciária de referência, na Amazônia Brasileira.

### **2.2. Objetivos secundários**

2.2.1. Observar a taxa de conversão da baciloscopia e da cultura para micobactérias nas primeiras oito semanas de uso da NAC;

2.2.2. Avaliar níveis de glutathione e o perfil de biomarcadores de ativação imunológica e inflamação em indivíduos coinfectados TB/HIV, em uso ou não da NAC;

2.2.3. Comparar o padrão radiológico nas primeiras oito semanas de uso da NAC.

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1. Descrição do estudo**

RIPENACTB foi um ensaio clínico unicêntrico, randomizado, de grupos paralelos, aberto, não supervisionado, de fase II.

#### **3.2. Local do estudo**

O estudo foi realizado na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), localizada na Amazônia Ocidental Brasileira, na Cidade de Manaus, capital do Estado do Amazonas. A FMT-HVD é uma instituição do Governo do Estado do Amazonas, criada em 1974, sendo atualmente referência nacional e internacional na assistência médica especializada, ensino e pesquisa em doenças infecciosas e parasitárias. O complexo é dividido em unidade de internação, unidade ambulatorial, laboratórios de análises clínicas e gerências de pesquisa.

#### **3.3. Participantes**

##### **3.3.1. Critérios de elegibilidade**

Pacientes internados na FMT-HVD, por decisão clínica, com:

- Idade maior ou igual 18 anos;
- Tuberculose pulmonar com teste rápido molecular para TB (TRM-TB) detectável e sensível a rifampicina;
- Uso de esquema RIPE há menos de 72 horas;
- Exame de HIV positivo;
- Previsão de permanência hospitalar superior a vinte e quatro horas.

### 3.3.2. Critérios de não-inclusão

- Recusa em realizar o exame de HIV;
- Gestantes, lactantes ou planos de engravidar durante o período do estudo;
- TB extrapulmonar, sem acometimento pulmonar;
- Não ter condições de realizar a coleta de amostra respiratória na visita D0, para confirmação microbiológica, mesmo que de forma induzida;
- Alanina aminotransferase (ALT) basal maior que três vezes a normalidade;
- Uso de antibióticos da classe quinolona nos últimos sete dias antes da inclusão;
- Impossibilidade de acompanhamento clínico.

### 3.3.3. Critérios de exclusão

- Cultura basal negativa para Mtb;
- Mono, poli ou multirresistência ao Mtb, detectada no perfil de sensibilidade;
- Necessidade de suspensão do esquema RIPE, conforme decisão da equipe assistente ou do médico pesquisador;
- Falta de adesão ao tratamento proposto por mais de sete dias consecutivos.

### 3.3.4. Cálculo do tamanho da amostra

O objetivo principal desse estudo foi fornecer estimativas de segurança e tolerabilidade na população estudada. Heiko *et al*, mostrou que escolher mais de 150 eventos na fase II parece não ser necessário, pois, o impacto nessas probabilidades torna-se pequeno (78). Sendo um estudo de situação de desafio real, o tamanho de 50 indivíduos foi escolhido com base em demanda do centro, características clínicas da população estudada e viabilidade de execução dentro do tempo estimado de recrutamento e acompanhamento.

### **3.4. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

#### **3.4.1. Recrutamento e alocação do tratamento**

O indivíduo potencialmente elegível foi convidado a participar do estudo através de TCLE aplicado por profissional designado. Na impossibilidade de entendimento, o TCLE foi oferecido ao familiar mais próximo. Tendo consentido, os participantes passaram por avaliação clínica e laboratorial. Em seguida, foram randomizados para um dos grupos, na proporção 1:1. A lista de randomização foi gerada previamente ao início do estudo, por computador, no formato de blocos, contendo cada um 25 participantes.

#### **3.4.2. Procedimento de seguimento**

##### **3.4.2.1. Esquema das visitas**

O protocolo RIPENACTB está detalhado na tabela 1, sendo que na visita de inclusão (D0) foram aceitos os seguintes exames:

- Beta-HCG (urina ou sangue): até sete dias;
- Hemograma, ureia, aspartato aminotransferase (AST), ALT, bilirrubinas: até 24 horas;
- Teste rápido (ou sorologia) de HIV, hepatite B e C: até seis meses;
- Carga viral HIV e contagem de CD4+/CD8+: até seis meses;
- Radiografia de tórax: até sete dias;

Durante a internação e após a alta hospitalar, os indivíduos foram acompanhados pela equipe do estudo, que incluiu médico infectologista com experiência no manejo de coinfectados TB/HIV. Em caso de ausência, foi dada a tolerância de sete dias úteis para agendamento, caso contrário, foi considerado como impossibilidade de acompanhamento. Visitas não programadas aconteceram conforme a indicação

médica. Após o término do tratamento da TB e dado o indivíduo como curado, ele foi encaminhado ao ambulatório da FMT-HVD, para dar seguimento ao seu acompanhamento com a equipe assistencial.

Tabela 1: Sumário da distribuição das visitas e respectivos procedimentos realizados

Parâmetros	D0	D7	D14	D28	D42	D56	M4	M6
Elegibilidade/TCLE	X							
Consulta médica	X	X	X	X	X	X	X	X
Início NAC	X							
Término NAC						X		
Beta-HCG (urina)	X							
Creatinina sérica	x							
ALT/AST/Bilirrubinas	X	X	X	X	X	X		
Hemograma	X							
Teste rápido HIV	X							
Teste rápido hepatite B	X							
Teste rápido hepatite C	X							
Carga viral HIV	X					X		
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	X					X		
Baciloscopia	X	X	X	X	X	X		
TRM-TB*	X							
Cultura para micobactéria em meios líquido e sólido	X	X	X	X	X	X		
Teste de sensibilidade	X							
Radiografia de tórax	X					X		
Coleta de plasma EDTA**, soro e PBMC*** para imunoenaios	X		X	X		X	X	X

\*TRM-TB: teste rápido molecular para tuberculose

\*\*EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético;

\*\*\*PBMC: *peripheral blood mononuclear cells* (células mononucleares do sangue periférico).

#### **3.4.2.2. Coleta de registros e informações**

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes foram registrados em documentos-fonte, no caso, o prontuário eletrônico (iDoctor<sup>®</sup>) de cada paciente, na FMT-HVD.

#### **3.4.2.3. Procedimentos laboratoriais**

As amostras respiratórias foram submetidas a baciloscopia (BAAR), TRM-TB (Xpert MTB/RIF<sup>®</sup>) e a cultura para micobactéria líquida (MGIT<sup>®</sup>) e sólida (Löwenstein-Jensen). Foram coletadas amostras nas visitas D0, D7, D14, D28, D42 e D56, M4 e M6. Elas foram processadas em até uma hora e rejeitadas se tivessem qualquer um dos seguintes critérios: não possuir identificação ou estiver mal identificada; apresentar vazamento; ou recipiente inapropriado. O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi feito na amostra basal, desde que tenha sido identificado Mtb. Toda equipe do laboratório de TB foi cegada para o processamento das amostras. Na ausência de escarro espontâneo, foi feita a tentativa de escarro induzido. Durante o tratamento da TB, pacientes que mesmo com a indução não tiveram produção de escarro, foram considerados como não produtores de amostra respiratória, o que foi julgado como um desfecho clínico favorável.

As amostras sanguíneas destinadas a imunologia, hematologia e bioquímica foram obtidas dos pacientes por punção venosa, sendo coletados cerca de 15 mL de sangue de cada paciente, durante as visitas do estudo. Os exames de hematologia e bioquímica foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas da FMT-HVD, por meio de equipamentos automatizados (ABX PENTRA 60<sup>®</sup> e THERMO KONELAB 60<sup>®</sup>) como parte do processo de avaliação de elegibilidade e avaliação de segurança e toxicidade da droga. A centrifugação e aliquotagem das amostras destinadas a análise imunológica foram realizadas no Laboratório de Imunologia da FMT-HVD e posteriormente enviadas aos colaboradores, no Laboratório de Inflamação e

Biomarcadores da Fundação Osvaldo Cruz, Salvador, Bahia, seguindo os regras da Associação de Transporte Aéreo Internacional (IATA).

Radiografias de tórax pósterio-anterior e perfil (para pacientes que deambulavam) ou anteroposterior (para pacientes acamados) foram feitas no setor de radiologia da FMT-HVD, como parte de elegibilidade e avaliação do desfecho radiológico da TB.

### **3.5. INTERVENÇÕES**

#### **3.5.1. Tratamentos**

Nas primeiras oito semanas, todos indivíduos receberam esquema RIPE (150 mg, 75 mg, 400 mg, 275 mg), com comprimidos de dose fixa combinados de acordo com o peso, fornecidos por Farmanguinhos<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil. O que diferiu entre os grupos foi que no grupo NAC, além de esquema RIPE, os indivíduos receberam dois comprimidos efervescentes, sabor limão, contendo 600 mg de N-acetilcisteína (Fluimucil<sup>®</sup>) cada, por oito semanas, baseado na mesma dose usada em um estudo preliminar sobre o efeito do NAC na TB (79). Os comprimidos foram dissolvidos em 200 mL de água antes da ingestão e administrados via oral ou através do tubo nasointestinal, de 12/12 horas.

Após oito semanas, ambos grupos deram início ao uso isolado de rifampicina 150 mg e isoniazida 75 mg (RI), com comprimidos de dose fixa combinados de acordo com o peso, também fornecidos por Farmanguinhos<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil. Esse período foi chamado de fase de manutenção e não teve tempo pré-estabelecido, pois, apesar de ter duração mínima de quatro meses, poderia ser estendido conforme indicação médica.

Tabela 2: Esquema de tratamento nos indivíduos do grupo controle

<b>Fase intensiva: 2 meses</b>	20 - 35 kg	36 - 50 kg	> 50 kg
Rifampicina 150 mg + isoniazida 75 mg + pirazinamida 400 mg + etambutol 275mg (comprimido em dose fixa combinada)	2 comprimidos	3 comprimidos	4 comprimidos

<b>Fase de manutenção: cerca de 4 meses</b>	20 - 35 kg	36 - 50 kg	> 50 kg
Rifampicina 150 mg + isoniazida 75 mg (comprimido em dose fixa combinada)	2 comprimidos	3 comprimidos	4 comprimidos

Tabela 3 – Esquema de tratamento nos indivíduos do grupo NAC

<b>Fase intensiva: 2 meses</b>	20 - 35 kg	36 - 50 kg	> 50 kg
Rifampicina 150 mg + isoniazida 75 mg + pirazinamida 400 mg + etambutol 275mg (comprimido em dose fixa combinada)	2 comprimidos	3 comprimidos	4 comprimidos

+

N-acetilcisteína (comprimido efervescente, sabor limão)	600mg de 12/12 horas (independente do peso)
---	---

<b>Fase de manutenção: cerca de 4 meses</b>	20 - 35 kg	36 - 50 kg	> 50 kg
Rifampicina 150 mg + isoniazida 75 mg (comprimido em dose fixa combinada)	2 comprimidos	3 comprimidos	4 comprimidos

### **3.5.2. Armazenamento e manuseio das medicações**

Os medicamentos do estudo foram armazenados em local seguro e sob condições físicas adequadas. O acesso foi limitado ao pesquisador. A liberação foi feita durante as visitas, pelo médico infectologista, com registro no prontuário.

### **3.5.3. Aderência ao tratamento**

Foram cobradas nas consultas médicas as embalagens dos medicamentos dispensados e realizadas ligações telefônicas uma vez por semana com intuito de enfatizar a adesão ao tratamento. Enquanto os participantes estiveram internados foi feito o tratamento diretamente observado.

### **3.5.4. Medicações concomitantes**

Todas as medicações concomitantes recebidas durante o estudo foram registradas em prontuário institucional. Não houve contraindicação absoluta ou relativa ao uso concomitante de nenhuma medicação.

### **3.5.5. Tratamento após o término do estudo**

Não houve estudo de extensão planejado. Após alcançada a cura de TB, os indivíduos foram encaminhados ao ambulatório da FMT-HVD para dar continuidade ao acompanhamento especializado.

### **3.5.6. Tratamento de superdose do medicamento em investigação**

Uma superdose para este estudo foi considerada como qualquer dose acima do planejado. Até o momento não há um antídoto específico para NAC, mas não houve ocorrência de efeito adverso devido a superdosagem da NAC.

### **3.6. INSTRUÇÕES DE SEGURANÇA**

A segurança e a tolerabilidade dos tratamentos foram avaliadas a partir do registro dos eventos adversos (EAs) e da classificação das avaliações laboratoriais e dos sinais vitais. Para classificar a gravidade de todos os sintomas, achados do exame físico e resultados laboratoriais, foi utilizada a tabela para classificação da gravidade dos eventos adversos em adultos, DAIDS, versão 2.0, 2014, uma ferramenta utilizada com frequência em ensaios clínicos com HIV, disponível em: <<https://rsc.niaid.nih.gov/sites/default/files/daids-ae-grading-table-v2-nov2014.pdf>> (80)

#### **3.6.1. Definições de Evento Adverso e Evento Adverso Sério**

Foi considerado evento adverso (EA) qualquer ocorrência médica não desejada em um participante de estudo clínico a quem se administre um produto farmacêutico, mesmo que essa ocorrência não necessariamente tenha relação causal com o tratamento. Foi considerado EA qualquer ocorrência médica não desejada que, em qualquer dose:

- Resultou em morte ou;
- Impôs risco à vida ou;
- Exigiu a hospitalização do paciente ou o prolongamento de uma hospitalização já existente ou;
- Resultou em invalidez/incapacidade persistente ou significativa ou;
- Resultou em defeito de nascimento ou anomalia congênita ou;
- Constituiu um evento importante do ponto de vista clínico conforme julgamento clínico.

#### **3.6.2. Monitoramento dos eventos adversos**

Todos as alterações clínicas descritas em cada visita foram registradas como um evento adverso, se incidentes ou agravadas durante o estudo, e se consideradas como relacionadas ao medicamento do estudo.

### **3.7. DEFINIÇÃO DOS DESFECHOS ANALISADOS**

#### **3.7.1. Segurança**

##### **3.7.1.1. Tolerabilidade clínica**

Foram coletados dados sobre incidência e gravidade dos eventos adversos. Em cada visita, o médico questionou ao paciente se ele apresentou qualquer evento adverso desde a visita anterior.

##### **3.7.1.2. Tolerabilidade biológica do ponto de vista hepático**

Foram programadas as realizações de avaliações bioquímica nas visitas D0, D7, D14, D28, D42 e D56. Tais avaliações poderiam ser realizadas em qualquer outro dia se o médico julgasse necessário para o cuidado do paciente.

A hepatotoxicidade foi definida como ALT e/ou AST maior que 3 vezes o limite da normalidade, com a presença de sintomas de hepatite ou maior que 5 vezes o limite da normalidade, na ausência desses sintomas; ou níveis totais de bilirrubina maior que 2 vezes o valor da normalidade, definição adaptada de (67). Os valores de referência adotados foram 38 UI/mL (AST), 44 UI/mL (ALT) e 1,3 mg/dL (bilirrubina). Todos os pacientes foram testados para hepatite B e C.

#### **3.7.2. Efetividade**

##### **3.7.2.1. Conversão da cultura ou baciloscopia**

A conversão da cultura ficou definida como a primeira amostra respiratória negativa em meio líquido (MGIT®) ou sólido (Löwenstein-Jensen), sem uma cultura positiva subsequente. Também foram consideradas como conversão culturas negativas seguidas por culturas contaminadas e a situação em que participante não pudesse mais expectorar após uma cultura negativa. A taxa de conversão da cultura foi definida como o tempo decorrido desde a inclusão até a primeira cultura negativa (81). A mesma regra foi aplicada para a conversão da baciloscopia.

### 3.7.2.2. Padrão radiológico

As radiografias de tórax foram feitas em D0 e na visita D56. A avaliação comparativa foi realizada por um único médico radiologista, cego para os grupos, que avaliou os dois exames e os classificou em: (1) melhora ou sem alteração, ou (2) piora.

## 3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas de acordo com o princípio da intenção de tratar. O teste do Qui-quadrado de Person foi utilizado para comparar as variáveis categóricas entre os grupos estudados. A análise de regressão logística foi usada para testar associações com os principais resultados do estudo, e foi representada por Odds Ratio (OR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%). Diferenças com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significantes. Os níveis das citocinas foram comparadas usando o teste de Kruskal-Wallis junto ao método de múltiplas comparações de Dunn (comparação de 3 ou mais grupos). Análises hierárquicas de grupo utilizaram o método de Ward para a formulação de mapas de calor (*heat maps*) com *bootstrap* de 100x dos dados para representar o perfil geral de expressão dos biomarcadores indicados nos grupos de estudo. Os dendogramas representam a distância Euclidiana. Todas as comparações univariadas com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significantes. O perfil das correlações entre os biomarcadores nos diferentes grupos foi analisado por rede das matrizes de correlação de Spearman (com *bootstrap* de 100x). Nas análises indicadas, apenas correlações

fortes, definidas aqui por valores de Spearman  $>0,6$  ou  $<-0,6$  e valor de  $p < 0,05$  após o ajuste para várias medidas, usando o método de Holm-Bonferroni, foram incluídas na visualização de rede. Em tais análises, marcadores que exibiam perfis de correlações semelhantes, foram agrupadas com base na modularidade (82). Os dados coletados foram digitados em planilha de Microsoft Excel<sup>®</sup> 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA) e as análises estatísticas foram realizadas no Stata<sup>®</sup> 13.0, GraphPad Prism 7<sup>®</sup> (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA), e JMP 12.0 (SAS, Cary, Carolina do Norte, EUA).

### **3.9. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMT-HVD, sob o CAAE 60219916.5.0000.0005. Além disso, está registrado na base [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) sob o número identificador NCT03281226 e seguiu as normas do Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT). Os indivíduos elegíveis a participar foram abordados pela enfermeira do estudo, que aplicou TCLE e explicou todos os procedimentos do ensaio clínico, enfatizando a liberdade de decidir participar e o não-prejuízo em sua assistência no caso de desistência. Antes do consentimento, foi dada a oportunidade de retirar dúvidas médicas com o médico infectologista.

## 4. RESULTADOS

- 4.1. **Artigo 1: submetido à revista PLoS ONE em 07 de agosto de 2019, estando em processo de revisão por pares.**

### Clinical Trial

**Safety and efficacy of N-acetylcysteine in hospitalized patients with HIV-associated tuberculosis: an open-label, randomized, phase II trial (RIPENACTB Study)**

Izabella Picinin Safe<sup>1,2</sup>, Marcus Vinícius Guimarães Lacerda<sup>1,2,3\*</sup>, Vitoria Silva Printes<sup>1</sup>, Adriana Ferreira Praia Marins<sup>1</sup>, Amanda Lia Rebelo Rabelo<sup>2</sup>, Amanda Araújo Costa<sup>1</sup>, Michel Araújo Tavares<sup>4</sup>, Jaqueline Silva Jesus<sup>1</sup>, Alexandra Brito Souza<sup>2</sup>, Francisco Beraldi-Magalhães<sup>2</sup>, Cynthia Pessoa Neves<sup>1,2</sup>, Wuelton Marcelo Monteiro<sup>1,2</sup>, Vanderson Souza Sampaio<sup>1,2</sup>, Eduardo P. Amaral<sup>5</sup>, Renata Spener Gomes<sup>2</sup>, Bruno B. Andrade<sup>6,7,8,9,10,11,12†</sup>, Marcelo Cordeiro-Santos<sup>1,2†</sup>

1. Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil
2. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil
3. Instituto Leônidas & Maria Deane, Fiocruz, Manaus, Brazil
4. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil
5. Immunobiology Section, National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

6. Laboratório de Inflamação e Biomarcadores, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Brazil
7. Multinational Organization Network Sponsoring Translational and Epidemiological Research, (MONSTER) Initiative, Salvador, Brazil
8. Universidade Salvador (UNIFACS), Laureate Universities, Salvador, Brazil
9. Curso de Medicina, Faculdade de Tecnologia e Ciências, Salvador, Brazil
10. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Salvador, Brazil
11. Wellcome Centre for Infectious Diseases Research in Africa (CIDRI-Africa), Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town (UCT), Cape Town, South Africa
12. Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA

\*Corresponding author: Marcus Vinícius Guimarães Lacerda

Av. Pedro Teixeira, 25, Manaus, Amazonas, 69040-000

E-mail: [marcuslacerda.br@gmail.com](mailto:marcuslacerda.br@gmail.com)

† Equally contributed to this work.

**Short title: N-acetylcysteine in TB/HIV coinfection**

**Abstract**

Despite the availability of effective antimicrobials, tuberculosis (TB) is still a serious health threat. Mortality is even higher in people living with HIV who are diagnosed with TB. New therapies are needed to shorten the time required to cure TB and decrease fatality rates in this population. N-acetylcysteine (NAC) is a glutathione precursor and has shown recently in experimental setting to present *in vitro* and *in vivo* anti-mycobacterial activity. We test the hypothesis that NAC is safe, well tolerated and secondarily efficacious as adjunctive anti-TB therapy in hospitalized individuals with HIV-associated TB. Patients were enrolled sequentially in a tertiary care center, in the Brazilian Amazon. We performed a randomized, parallel group, single-center, open study trial of two arms, in hospitalized patients over 18 years of age, with microbiologically confirmed pulmonary TB in HIV: one with rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol at standard doses (Control Group), and a second in which NAC 600 mg bid for eight weeks was added (NAC Group). A total of 21 and 18 patients were enrolled to the Control Group and NAC Group, respectively. Adverse events were not different. Trends in culture conversion at the end of 8 weeks was seen in the NAC group. Our findings suggest that in the more critical population of hospitalized patients with HIV-associated TB, the use of NAC is safe and seems to fasten culture conversion, with potential impact on prognosis and transmission.

**Keywords.** tuberculosis; pulmonary tuberculosis; HIV; Aids; N-acetylcysteine

## Introduction

Worldwide, tuberculosis (TB) is one of the top 10 causes of death. Despite significant efforts to control the disease, World Health Organization (WHO) estimates that 920,000 people living with HIV developed TB worldwide in 2017. Globally, the best estimate is that 10.0 million people (range, 9.0–11.1 million) developed TB disease in 2017: 5.8 million men, 3.2 million women and 1.0 million children (83). Treatment scheme of TB in people with HIV is the same as in HIV-negative patients. The recommended regimen for drug-susceptible disease is a combination of Rifampicin, Isoniazid, Pyrazinamide, Ethambutol (RIPE) for 2 months, followed by at least 4 months of rifampicin and isoniazid (84). Although it is a curable and treatable disease, TB is the leading cause of death (40%), admission to hospital (18%), and in-hospital death (25%) in people living with HIV (PLWH) (31,85).

Glutathione (GSH) is the main nonprotein thiol responsible for cellular homeostasis and maintenance of the cellular redox balance (86). HIV infection is associated with increased oxidative stress (OS). Intracellular GSH levels in macrophages of HIV individuals are compromised, contributing to the loss of innate immune function observed in these patients and an increase in the growth of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (87). Agents that assist in the restoration of GSH levels in macrophages isolated from individuals with HIV infection promote better control of Mtb (77). N-acetylcysteine (NAC), a GSH precursor, is an agent that restores GSH levels. T lymphocytes derived from HIV infected individuals are deficient in GSH, and this deficiency correlates with decreased levels of Th1 cytokines and enhanced growth

of Mtb inside human macrophages (74). NAC was shown to tailor macrophages to induce enhanced Th1 response that may be helpful to control TB (66). NAC is included in the list of essential medicines of WHO (88). It is widely used in patients with a wide range of respiratory diseases due to its mucolytic and anti-oxidant activities, making it attractive as a potential chronic obstructive pulmonary disease therapy (89). NAC potentially protects against anti-TB drug-induced hepatotoxicity in individuals with TB without HIV (67). NAC treatment in Mtb-infected human macrophages resulted in a decrease of oxidative stress and enhanced anti-mycobacterial activity (68). In a model of Mtb infection of mice, NAC treatment resulted in diminished mycobacterial loads in lungs (68), highlighting the therapeutic potential of this drug.

NAC as an adjuvant appears to be an effective agent in terms of early bacteriological and radiological improvement in treatment of pulmonary TB (79). However, to our knowledge, no evidence exists for patients with HIV-associated TB, and especially in those more complicated cases requiring hospitalization. Such clinical trial play innovative and strategic role in WHO New Global Elimination Tuberculosis Strategy (Pillar III research strategy) (90).

## **Methods**

### **Study Design**

RIPENACTB Study was an open-label, single center, randomized, phase II trial to test whether NAC-containing treatment regimen was as safe as the standard regimen for TB treatment in hospitalized patients with HIV, besides exploring efficacy upon respiratory

sample culture conversion. The study was conducted at *Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado* (FMT-HVD), a tertiary care reference institution for coinfection TB/HIV in Manaus, Western Brazilian Amazon, from December 2016 to April 2018. This is a reference public institution for infectious diseases in the Amazonas State, with ~150 beds available for hospitalization and 7 intensive care unit (ICU) beds, where all cases of TB/HIV coinfection are referred to.

### **Study Participants**

Either gender 18 years or older patients with pulmonary TB diagnosed through positive Xpert-MTB/RIF and hospitalized (at clinician's discretion) for more than 24 hours, were eligible to be included in the study. Patients without HIV, with extrapulmonary TB only, unable to collect respiratory sample, pregnant and lactating women, exposed to quinolones in the last 7 days, and in use of anti-TB drugs for more than 72 hours or in use of anti-TB drugs as second line drugs were not included in the study. Enrolled patients were subsequently excluded if their baseline culture failed to grow Mtb or grew a strain of Mtb that was resistant to any anti-TB drug.

### **Randomization and Study Treatments**

Patients were randomized into **Control Group** or **NAC Group** in a 1:1 ratio using a computer-generated randomization table. The groups received standard anti-TB treatment with RIPE (150 mg, 75 mg, 400 mg, 275 mg), fixed dose tablets combined according to weight, for eight weeks. RIPE was supplied by Farmanguinhos®, Rio de Janeiro, Brazil. In addition, NAC group received two effervescent tablets containing N-

acetylcysteine (Fluimucil®) 600 mg bid, for eight weeks, following the same dose used in a preliminary study on the effect of NAC on TB (79). Tablets were dissolved in water before oral ingestion or administration through the nasointestinal tube.

Patients and involved infectious disease physicians were aware of the treatments, except laboratory team, to whom the study was blinded. While hospitalized, all the medication was administered in a supervised way by the nursing team. After discharge, patients were asked to take anti-TB drugs accordingly, and NAC only until eight weeks was completed. During every visit to the clinics, patients were requested to bring medication packages for tablet counting, as a proxy of adherence. Adherence was considered low when patients did not take the medication for more than seven consecutive days. The study was registered at [Clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03281226). (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03281226>)

### **Study Procedures**

All participants underwent a baseline clinical evaluation, which included physical examination, sputum (spontaneous or induced whenever sputum production was considered insufficient) or tracheal aspirate in unconscious patients, CD4<sup>+</sup> lymphocyte count, viral load, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), bilirubins, screening of concomitant drug exposures and chest radiograph. Safety assessments were performed at baseline and weeks 1, 2, 4, 6 and 8. Additional exams were solicited whenever needed.

Respiratory samples were submitted to smear Ziehl–Nielsen staining technique, Xpert-MTB/RIF for Mtb, and sown in liquid culture BACTEC MGIT™ 960 and solid culture Löwenstein-Jensen. Xpert-MTB/RIF for Mtb, even being more expensive, was used as inclusion criterion because of its higher sensitivity (91).

### **Study Outcomes**

The primary endpoint was clinical and laboratorial safety, and tolerability. Radiology alterations recovery, respiratory specimen culture conversion rate on liquid and solid media at the end of eight weeks of treatment were secondary endpoints.

### **Definitions**

#### **Culture conversion and rate of culture conversion**

We defined culture conversion as the first negative respiratory sample (sputum or tracheal aspirate) cultures on liquid or solid media, without an intervening positive culture. Negative cultures followed by contaminated cultures were also regarded as culture conversion. Culture conversion was also defined as a case where the participant could not expectorate after one negative sputum culture. The rate of culture conversion was defined as the time elapsed from day 1 to the first negative culture (81).

#### **Radiology assessment**

Chest radiography was performed at baseline and week 8. Comparative assessment was performed by a single specialist in radiology, blinded to the group of enrollment,

which evaluated both exams and classified them as: (1) improvement or no change, or (2) worsening.

### **Hepatotoxicity**

Hepatotoxicity was defined as ALT and/or AST increased more than 3 times the upper limit of normal range with the presence of hepatitis symptoms, or increased up to 5 times the upper limit of normal range in the absence of symptoms or total levels of bilirubinemia greater than twice the upper normal limit, as described elsewhere (67). Reference values adopted were 38 UI/mL (AST), 44 UI/mL (ALT) and 1.3 mg/dL (bilirubins). All patients were tested for HBsAg and anti-HCV.

### **Adverse events**

Adverse events were graded according to the modified toxicity events criteria of the *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*, Division of AIDS (DAIDS) Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Event (Corrected Version 2.1, July 2017) (80).

### **Statistical Analysis**

All analyses were performed according to the intention-to-treat principle. Differences in categorical variables were achieved through Pearson's chi-squared tests. Logistic regression analysis was used to test associations with the major outcomes of the study, and was represented by odds ratio (OR) and respective 95% confidence intervals (CI). Differences with  $P$ -value $<.05$  were considered statistically significant. The statistical analyses were performed using Stata 13.0.

## Results

Between December 2016 and April 2018, 162 participants were assessed for eligibility, and 50 underwent randomization (Figure 1). Out of those, 21 were included in the Control Group and 18 in the NAC Group. Demographic and clinical characteristics of participants were similar between the study arms, except that more males were included in the control arm (Table 1). Overall, most of the included patients had CD4+ lymphocyte counts under 200 cells/mm<sup>3</sup>.

As per protocol, no patient in the NAC Group had low adherence to NAC. Table 2 shows similar types of adverse events seen in both groups, and table 3 shows the similar grading. No patient was positive for HBV or HCV.

Figure 2 shows the major outcomes related to the efficacy of the NAC arm. Despite no statistical significance, the figure depicts the trends of improvement in all parameters, in special culture conversion at week 8, the major endpoint of the study.

## Discussion

This trial conducted with TB/HIV coinfecting hospitalized patients aimed to estimate whether the use of NAC together with RIPE was safe, and secondarily improved respiratory specimen culture conversion, in an exploratory analysis.

Hospitalized patients, used here as a proxy of clinical severity, were the targeted population because of their increased likelihood of evolving to death, and therefore, more prone to adhere to adjunctive therapy. Non-severe HIV/TB patients are already in use of many drugs simultaneously, and any adjunctive therapy would compromise adherence if a major benefit is not clearly seen by the patient. Therefore, we believe that adjunctive therapy in HIV/TB coinfection must be designed to give priority to more complicated patients. That requests that safety and efficacy studies are performed in this population since the very beginning of the evidence generation process.

For non-severe TB patients, NAC has been pursued as an adjunctive drug to decrease hepatotoxicity, a problem that still persists in ~25% of patients, impacting adherence to RIPE and TB cure, ultimately (92). The only clinical trial in which NAC was concurrently used in pulmonary TB, NAC was significantly associated to faster sputum negativity, improved radiological response, weight, serum glutathione peroxidase level, and amelioration of the deregulated immune response (93).

In PLWH, up to 30% of the patients experience hepatotoxicity, HIV infection apparently being one predisposing factor (94). However, not only hepatotoxicity is an expected effect of NAC adjunctive therapy in this population, but also culture conversion, used routinely as a marker of TB clinical recovery, which is critical in patients with immune deficiency, and increased risk of death. To date, however, no proof of concept study has been performed targeting this high-risk population of PLWH and TB coinfection. The selected dose of NAC was chosen based on the lack of immunological

effect in PLWH using 600 mg qd (95), and the promising dose of 600 mg bid in TB patients (93).

Safety was the major outcome of interest in our study, considering that TB/HIV hospitalized patients are a special group of subjects under enormous stress, with very low CD4<sup>+</sup> lymphocyte counts, and in use of many drugs with potential interactions. During the eight weeks in which NAC was used in one of the arms, adverse events were seen in similar proportions in both arms, gastrointestinal events being the most frequent (Table 2). When the total number of events and grading were assessed, no significant findings were seen, evidencing that NAC adjunctive to RIPE is as safe as RIPE by itself in coinfecting patients. No trends in decrease of hepatotoxicity in patients using NAC was seen, suggesting that oxidative stress only partially explains liver damage in these patients in use of RIPE.

In figure 2, although no statistically significance was seen in the exploratory endpoints of efficacy, most of the 95% confidence intervals favor the use of NAC, and the culture conversion was almost significant (P-value=0.083), evidencing some clinical benefit. This finding suggests that NAC may be a particularly useful therapeutic option in TB/HIV co-infected patients, who are generally at greater risk for delayed respiratory sample culture conversion with standard treatment. Moreover, shortening the time to culture conversion is an important step towards reducing TB transmission, in special in the hospital setting.

Major limitation of the trial was the reduced sample size, which did not allow for a more robust statistical analysis. However, the universe of eligible patients seen in such a reference unit is not much bigger, and the whole study recruited patients over 16 months. A multicentric approach will certainly be needed in further phase III studies. It is also known that more males present HIV/TB coinfection in Brazil (96), but in this randomized trial, table 1 shows that more males were enrolled in the Control Group, what may be explained by chance and the small sample size. No clear bias was considered. Noteworthy to say that results found here may not be extrapolated to non-severe patients seen in the outpatient clinics. Likewise, results are not applicable to multidrug-resistant Mtb (97), a condition in which adjunctive therapies are also needed. Some patients were already hospitalized in the ICU during enrollment, and therefore, ICU hospitalization as an endpoint had limitation in the analyses. Data from our group show high early mortality rate amongst TB/HIV coinfecting ICU patients. The factors predictive of mortality in this population were invasive mechanical ventilation, hypoalbuminemia, and severe immunosuppression (98). Indigenous population was also excluded from the analysis, but represents a major burden of the disease in the Brazilian Amazon (18,99).

As the use of NAC in the HIV/TB population seems promising in terms of safety and efficacy, our results indicate that RIPE plus NAC regimen is suitable for a larger phase III trial. It is worth mentioning that NAC has a well-known safety profile safety, even in much higher doses (100), is tolerable in pregnant women, is quite economically affordable, and requests no major medical supervision during the administration of oral presentations mostly flavored. During oral administration, deacetylation reaction of NAC

happens while passing along the small intestine as well as liver, thus its bioavailability is only 4-10% decreased (101). The ongoing TB-SEQUEL cohort study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03702738) aims to evaluate similar endpoints, using a higher dose of 1,200 mg bid of NAC in patients with TB, with and without HIV coinfection. Therefore, in the near future, more evidence will be generated to support the use of this safe drug in coinfecting patients, still a major contributor to mortality in developing countries.

## Notes

**Acknowledgments.** The authors would like to thank all patients and the *Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado* Tuberculosis Laboratory staff. This manuscript is dedicated to *Maísa Safe Lacerda*, a 'secondary endpoint' of this trial.

## References

1. Fogel N. Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis*. 2015.
2. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis Review. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;
3. Lawn SD ZA. Tuberculosis. *Lancet (Seminar)*. *Lancet*. 2011.
4. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Seminar: Tuberculosis. *Lancet*. 2003;
5. Comstock GW, Livesay VT, Woolpert SF. The prognosis of a positive tuberculin reaction in childhood and adolescence. *Am J Epidemiol*. 1974;
6. Sutherland I. Recent studies in the epidemiology of tuberculosis, based on the risk of being infected with tubercle bacilli. *Adv Tuberc Res*. 1976;

7. Sandhu G. Tuberculosis: Current situation, challenges and overview of its control programs in India. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2011.
8. DANIEL T. The history of tuberculosis Past, present, and challenges for the future. In: *Tuberculosis*. 2009.
9. Murray JF, Rieder HL, Finley-Croswhite A. The King's Evil and the Royal Touch: The medical history of scrofula. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016;
10. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med*. 2006;
11. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*. 2017.
12. Daniel TM. Hermann Brehmer and the origins of tuberculosis sanatoria. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;
13. Keshavjee S, Farmer PE. Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine. *New England Journal of Medicine*. 2012.
14. Arbex MA, Varella M de CL, de Siqueira HR, de Mello FAF. Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. parte 1: Fármacos de primeira linha. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2010.
15. Zumla A, Chakaya J, Centis R, D'Ambrosio L, Mwaba P, Bates M, et al. Tuberculosis treatment and management-an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2015.
16. WHO. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. WHO Publication. 2018.

17. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença. Bol epidemiológico. 2019;
18. Da Garrido MS, Bühner-Sékula S, De Souza AB, Ramasawmy R, De Quincó PL, Monte RL, et al. Temporal distribution of tuberculosis in the state of Amazonas, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2015.
19. Marreiro L da S, Cruz MA da, Oliveira M de NF de, Garrido M da S. Tuberculose em Manaus, Estado do Amazonas: resultado de tratamento após a descentralização TT - Tuberculosis in Manaus, state of Amazon: treatment outcome decentralization. Epidemiol serv saúde. 2009;
20. BATISTA D. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Amazonas. Bol Oficina Sanit Panam. 1953;
21. UNAIDS. Fact Sheet - Global AIDS Update 2019. UNAIDS. 2019;
22. Souza SL, Feitoza P V, Araujo JR, Andrade R V, Ferreira LC. Causes of death among patients with acquired immunodeficiency syndrome autopsied at the Tropical Medicine Foundation of Amazonas. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2008/08/23. 2008;41(3):247–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719803>
23. Cox JA, Lukande RL, Lucas S, Nelson AM, Van Marck E, Colebunders R. Autopsy causes of death in HIV-positive individuals in sub-Saharan Africa and correlation with clinical diagnoses. AIDS Reviews. 2010.
24. Sterling TR, Pham PA, Chaisson RE. HIV Infection–Related Tuberculosis: Clinical Manifestations and Treatment. Clin Infect Dis. 2010;
25. Aaron L, Saadoun D, Calatroni I, Launay O, Mémain N, Vincent V, et al.

- Tuberculosis in HIV-infected patients: A comprehensive review. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004.
26. Padyana M, Bhat R V., Dinesha M, Nawaz A. Hiv-tuberculosis: A study of chest X-ray patterns in relation to CD4 count. *N Am J Med Sci*. 2012;
  27. Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infectious Diseases*. 2006.
  28. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014.
  29. Hongler J, Musaazi J, Ledergerber B, Eberhard N, Sekaggya-Wiltshire C, Keller PM, et al. Comparison of Löwenstein–Jensen and BACTEC MGIT 960 culture for *Mycobacterium tuberculosis* in people living with HIV. *HIV Med*. 2018;
  30. Ford N, Matteelli A, Shubber Z, Hermans S, Meintjes G, Grinsztejn B, et al. TB as a cause of hospitalization and in-hospital mortality among people living with HIV worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the International AIDS Society*. 2016.
  31. Ford N, Shubber Z, Meintjes G, Grinsztejn B, Eholie S, Mills EJ, et al. Causes of hospital admission among people living with HIV worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Lancet HIV*. 2015;
  32. Organization WH. WHO | Guidelines for treatment of tuberculosis. Who. 2010;
  33. Ministério da Saúde (BR). Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde. 2017.

34. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC- SA 3.0 IGO. Global tuberculosis Report WHO 2018. WHO report. 2018.
35. Tiberi S, du Plessis N, Walzl G, Vjecha MJ, Rao M, Ntoumi F, et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018.
36. Zumla A, Maeurer M, Chakaya J, Hoelscher M, Ntoumi F, Rustomjee R, et al. Towards host-directed therapies for tuberculosis. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015.
37. Zumla A, Rao M, Wallis RS, Kaufmann SHE, Rustomjee R, Mwaba P, et al. Host-directed therapies for infectious diseases: Current status, recent progress, and future prospects. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016.
38. Kaufmann SHE, Dorhoi A, Hotchkiss RS, Bartenschlager R. Host-directed therapies for bacterial and viral infections. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018.
39. Lerner TR, Borel S, Gutierrez MG. The innate immune response in human tuberculosis. *Cellular Microbiology*. 2015.
40. Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev*. 2015;
41. Van Crevel R, Ottenhoff THM, Van der Meer JWM. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002.
42. Marino S, Pawar S, Fuller CL, Reinhart TA, Flynn JL, Kirschner DE. Dendritic Cell Trafficking and Antigen Presentation in the Human Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* . *J Immunol*. 2004;
43. Orme IM, Robinson RT, Cooper AM. The balance between protective and

- pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nature Immunology*. 2015.
44. Lin PL, Flynn JL. Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. *J Immunol*. 2010;
  45. Teskey G, Cao R, Islamoglu H, Medina A, Prasad C, Prasad R, et al. The synergistic effects of the glutathione precursor, NAC and first-line antibiotics in the granulomatous response against mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol*. 2018;
  46. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunology*. 2011.
  47. Shaler CR, Horvath CN, Jeyanathan M, Xing Z. Within the enemy's camp: Contribution of the granuloma to the dissemination, persistence and transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Immunology*. 2013.
  48. Kaufmann SHE. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology*. 2001.
  49. Rohde K, Yates RM, Purdy GE, Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunological Reviews*. 2007.
  50. Poirier V, Av-Gay Y. *Mycobacterium tuberculosis* modulators of the macrophage's cellular events. *Microbes and Infection*. 2012.
  51. Shin DM, Jeon BY, Lee HM, Jin HS, Yuk JM, Song CH, et al. *Mycobacterium tuberculosis* eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling. *PLoS Pathog*. 2010;
  52. Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, Kishore U, Bhakta S. *Mycobacterium tuberculosis*: Immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*. 2012.

53. Gideon HP, Flynn JL. Latent tuberculosis: What the host “sees”? *Immunol Res.* 2011;
54. Cruz-Knight W, Blake-Gumbs L. Tuberculosis: An overview. *Primary Care - Clinics in Office Practice.* 2013.
55. Ghezzi P. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. *International Journal of General Medicine.* 2011.
56. Venketaraman V, Dayaram YK, Amin AG, Ngo R, Green RM, Talaue MT, et al. Role of glutathione in macrophage control of mycobacteria. *Infect Immun.* 2003;
57. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Current Opinion in Pharmacology.* 2007.
58. Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;
59. Gil L, Martínez G, González I, Tarinas A, Álvarez A, Giuliani A, et al. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacol Res.* 2003;
60. Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacology and Therapeutics.* 2014.
61. Zheng JP, Wen FQ, Bai CX, Wan HY, Kang J, Chen P, et al. Twice daily N-acetylcysteine 600 mg for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (PANTHEON): A randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2014;

62. Vijayamalini M, Manoharan S. Lipid peroxidation, vitamins C, E and reduced glutathione levels in patients with pulmonary tuberculosis. *Cell Biochem Funct.* 2004;
63. Reddy YN, Murthy S, Krishna DR PM. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc.* 2004;
64. Venketaraman V, Millman A, Salman M, Swaminathan S, Goetz M, Lardizabal A, et al. Glutathione levels and immune responses in tuberculosis patients. *Microb Pathog.* 2008;
65. Palanisamy GS, Kirk NM, Ackart DF, Shanley CA, Orme IM, Basaraba RJ. Evidence for oxidative stress and defective antioxidant response in guinea pigs with tuberculosis. *PLoS One.* 2011;
66. Alam K, Ghousunnissa S, Nair S, Valluri VL, Mukhopadhyay S. Glutathione-Redox Balance Regulates c-rel-Driven IL-12 Production in Macrophages: Possible Implications in Antituberculosis Immunotherapy. *J Immunol.* 2010;
67. Baniasadi S, Eftekhari P, Tabarsi P, Fahimi F, Raoufy MR, Masjedi MR, et al. Protective effect of N-acetylcysteine on antituberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010;
68. Amaral EP, Conceição EL, Costa DL, Rocha MS, Marinho JM, Cordeiro-Santos M, et al. N-acetyl-cysteine exhibits potent anti-mycobacterial activity in addition to its known anti-oxidative functions. *BMC Microbiol.* 2016;
69. Dinicola S, De Grazia S, Carlomagno G, Pintucci JP. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. *European review for medical and pharmacological sciences.* 2014.
70. Ly J, Lagman M, Saing T, Singh MK, Tudela EV, Morris D, et al. Liposomal

- Glutathione Supplementation Restores TH1 Cytokine Response to Mycobacterium tuberculosis Infection in HIV-Infected Individuals. *J Interf Cytokine Res.* 2015;
71. Morris D, Nguyen T, Kim J, Kassissa C, Khurasany M, Luong J, et al. An elucidation of neutrophil functions against mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol.* 2013;
  72. Allen M, Bailey C, Cahatol I, Dodge L, Yim J, Kassissa C, et al. Mechanisms of control of Mycobacterium tuberculosis by NK cells: Role of glutathione. *Front Immunol.* 2015;
  73. Venketaraman V, Rodgers T, Linares R, Reilly N, Swaminathan S, Hom D, et al. Glutathione and growth inhibition of Mycobacterium tuberculosis in healthy and HIV infected subjects. *AIDS Res Ther.* 2006;
  74. Guerra C, Morris D, Sipin A, Kung S, Franklin M, Gray D, et al. Glutathione and adaptive immune responses against mycobacterium tuberculosis infection in healthy and HIV infected individuals. *PLoS One.* 2011;
  75. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991;
  76. Deeks SG. HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. *Annu Rev Med.* 2011;
  77. Morris D, Guerra C, Khurasany M, Guilford F, Saviola B, Huang Y, et al. Glutathione Supplementation Improves Macrophage Functions in HIV. *J Interf Cytokine Res.* 2013;
  78. Götte H, Schüler A, Kirchner M, Kieser M. Sample size planning for phase II

- trials based on success probabilities for phase III. *Pharm Stat.* 2015;
79. D. N, S. M, S. G. Supplementation of N-acetylcysteine as an adjuvant in treatment of newly diagnosed pulmonary tuberculosis patients: A prospective, randomized double blind, placebo controlled study. *Eur Respir J.* 2013;
  80. DAIDS. Division of Aids Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events Division of Aids Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events. *Natl Inst Allergy Infect Dis.* 2017;
  81. Lee HY, Chae KO, Lee CH, Choi SM, Lee J, Park YS, et al. Culture conversion rate at 2 months of treatment according to diagnostic methods among patients with culture-positive pulmonary tuberculosis. *PLoS One.* 2014;
  82. Blondel VD, Guillaume JL, Lambiotte R, Lefebvre E. Fast unfolding of communities in large networks. *J Stat Mech Theory Exp.* 2008;
  83. WHO. WHO Global Tuberculosis Report 2018. *Pharmacological Reports.* 2018.
  84. WHO. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care. World Health Organization. 2017.
  85. Ford N, Matteelli A, Shubber Z, Hermans S, Meintjes G, Grinsztejn B, et al. TB as a cause of hospitalization and in-hospital mortality among people living with HIV worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the International AIDS Society.* 2016.
  86. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta.* 2003.
  87. Morris D, Guerra C, Donohue C, Oh H, Khurasany M, Venketaraman V. Unveiling the mechanisms for decreased glutathione in individuals with HIV infection. *Clin Dev Immunol.* 2012;

88. WHO. WHO model list of essential medicines 20th edition. World Health Organization. 2017.
89. Tse HN, Raiteri L, Wong KY, Yee KS, Ng LY, Wai KY, et al. High-dose N-acetylcysteine in stable COPD: the 1-year, double-blind, randomized, placebo-controlled HIACE study. *Chest*. 2013;
90. Kritski A, Andrade KB, Galliez RM, Maciel ELN, Cordeiro-Santos M, Miranda SS, et al. Tuberculosis: Renewed challenge in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2018.
91. De Castro AZ, Moreira AR, Oliveira J, Costa PA, Da Graça CLAL, Pérez M de A, et al. Clinical impact and cost analysis of the use of either the Xpert MTB Rif test or sputum smear microscopy in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018;
92. El Bouazzi O, Hammi S, Bourkadi JE, Tebaa A, Tanani DS, Soulaymani-Bencheikh R, et al. First line anti-tuberculosis induced hepatotoxicity: Incidence and risk factors. *Pan Afr Med J*. 2016;
93. Mahakalkar S, Nagrale D, Gaur S, Urade C, Murhar B, Turankar A. N-acetylcysteine as an add-on to Directly Observed Therapy Short-I therapy in fresh pulmonary tuberculosis patients: A randomized, placebo-controlled, double-blinded study. *Perspect Clin Res*. 2017;
94. Araújo-Mariz C, Lopes EP, Acioli-Santos B, Maruza M, Montarroyos UR, De Ximenes RAA, et al. Hepatotoxicity during treatment for tuberculosis in people living with HIV/AIDS. *PLoS One*. 2016;
95. Treitinger A, Spada C, Masokawa IY, Verdi JCV, Silveira MVDS, Luis MC, et al. Effect of N-acetyl-L-cysteine on lymphocyte apoptosis, lymphocyte viability,

- TNF-alpha and IL-8 in HIV-infected patients undergoing anti-retroviral treatment. *Brazilian J Infect Dis.* 2004;
96. Carvalho BM de, Monteiro AJ, Pires Neto R da J, Grangeiro TB, Frota CC. Factors related to HIV/tuberculosis coinfection in a Brazilian reference hospital. *Brazilian J Infect Dis.* 2008;
97. Grutzmacher LK, Dalmarco EM, Blatt SL, Cordova CMM de. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* strains in southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;
98. Ferreira MD, Neves CP das, Souza AB de, Beraldi-Magalhães F, Migliori GB, Kritski AL, et al. Predictors of mortality among intensive care unit patients coinfecting with tuberculosis and HIV. *J Bras Pneumol.* 2018;
99. Aguirre S, Cuellar CM, Herrero MB, Cortesi GC, de Romero NG, Alvarez M, et al. Prevalence of tuberculosis respiratory symptoms and associated factors in the indigenous populations of Paraguay (2012). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;
100. De Rosa SC, Zaretsky MD, Dubs JG, Roederer M, Anderson M, Green A, et al. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur J Clin Invest.* 2000;
101. Mokhtari V, Afsharian P, Shahhoseini M, Kalantar SM, Moini A. A review on various uses of N-acetyl cysteine. *Cell Journal.* 2017.
102. Hassen Ali A, Belachew T, Yami A, Ayen WY. Anti-Tuberculosis Drug Induced Hepatotoxicity among TB/HIV Co-Infected Patients at Jimma University Hospital, Ethiopia: Nested Case-Control Study. *PLoS One.* 2013;
103. Dworkin MS, Adams MR, Cohn DL, Davidson AJ, Buskin S, Horwitch C, et al. Factors that complicate the treatment of tuberculosis in HIV-infected patients. *J*

- Acquir Immune Defic Syndr. 2005;
104. Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, De Lange WCM, Van Der Ven AJAM, Dekhuijzen R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date review. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2008.
  105. Attri S, Rana S V., Vaiphei K, Sodhi CP, Katyal R, Goel RC, et al. Isoniazid- and rifampicin-induced oxidative hepatic injury - Protection by N-acetylcysteine. *Hum Exp Toxicol*. 2000;
  106. Farazi A, Masoomah S, Mansoureh J. Efficacy of N-Acetylcysteine on Prevention of Antituberculosis Drug- Induced Hepatotoxicity. *World J Med Sci*. 2015;
  107. Helbling B, Von Overbeck J, Lauterburg BH. Decreased release of glutathione into the systemic circulation of patients with HIV infection. *Eur J Clin Invest*. 1996;
  108. ECK H-P, GMÜNDER H, HARTMANN M, PETZOLDT D, DANIEL V, DRÖGE W. Low Concentrations of Acid-Soluble Thiol (Cysteine) in the Blood Plasma of HIV-1-Infected Patients. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1989;
  109. De Quay B, Malinverni R, Lauterburg BH. Glutathione depletion in HIV-infected patients: Role of cysteine deficiency and effect of oral N-acetylcysteine. *AIDS*. 1992;
  110. Buhl R, Holroyd KJ, Mastrangeli A, Cantin AM, Jaffe HA, Wells FB, et al. SYSTEMIC GLUTATHIONE DEFICIENCY IN SYMPTOM-FREE HIV-SEROPOSITIVE INDIVIDUALS. *Lancet*. 1989;
  111. Herzenberg LA, De Rosa SC, Dubs JG, Roederer M, Anderson MT, Ela SW, et al. Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease.

- Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;
112. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection. In: Tuberculosis and the Tubercle Bacillus, Second Edition. 2016.
  113. Cooper AM, Mayer-Barber KD, Sher A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. Mucosal Immunology. 2011.
  114. Viora M, Quaranta MG, Straface E, Vari R, Masella R, Malorni W. Redox imbalance and immune functions: Opposite effects of oxidized low-density lipoproteins and N-acetylcysteine. Immunology. 2001;
  115. Aliyu MH, Salihu HM, Ratard R. HIV infection and sputum-culture conversion in patients diagnosed with Mycobacterium tuberculosis: A population-based study. Wien Klin Wochenschr. 2003;
  116. Montales MT, Chaudhury A, Beebe A, Patil S, Patil N. HIV-Associated TB Syndemic: A Growing Clinical Challenge Worldwide. Front Public Heal. 2015;

## Legends

Figure 1. Flowchart of eligible, randomized and enrolled patients in the study.

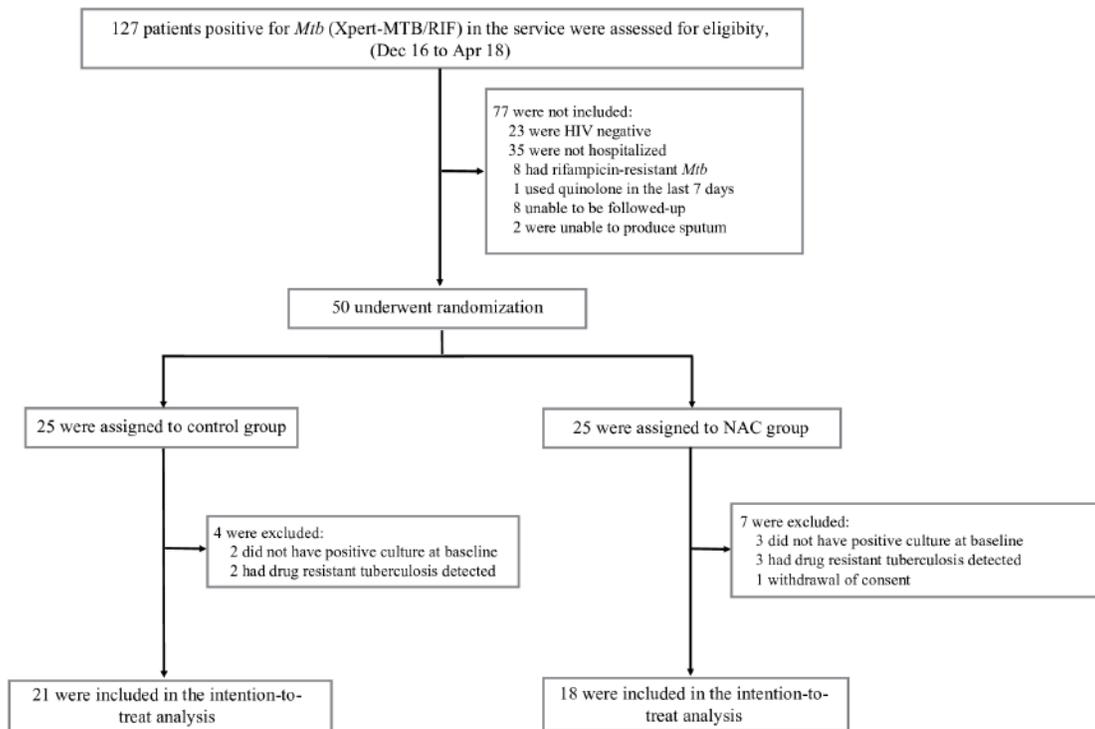


Figure 2. Major outcomes and respective 95% confidence intervals.

Status and outcome	Group	no. (%)	Odds Ratio (95%CI)	P-value
Week 8 negative culture	Control	7 (33.3)	3.14 (.85 - 11.67)	.083
	NAC	11 (61.1)		
Week 8 negative smear	Control	10 (47.6)	.91 (.26 - 3.20)	.882
	NAC	9 (50.0)		
Radiological response	Control	4 (30.8)	1.88 (.35 - 9.98)	.461
	NAC	5 (45.5)		
Discharge at 14 days	Control	10 (58.8)	1.07 (.26 - 4.49)	.925
	NAC	8 (57.1)		
Death	Control	4 (19.1)	1.63 (.36 - 7.33)	.521
	NAC	5 (27.8)		

Table 1. Baseline characteristics of patients enrolled in both groups.

Characteristic	Control Group (n=21)	NAC Group (n=18)	P-value
	n (%)	n (%)	
<b>Male sex</b>	19 (90.5)	10 (55.6)	<b>.013</b>
<b>Age group, in years</b>			.971
<25	4 (19.1)	4 (22.2)	
25-34	6 (28.6)	4 (22.2)	
35-45	8 (38.1)	7 (38.9)	
>45	3 (14.3)	3 (16.7)	
<b>CD4<sup>+</sup> lymphocyte count</b>			.336
<50 cells/mm <sup>3</sup>	6 (28.6)	9 (50)	
50-199 cells/mm <sup>3</sup>	12 (57.1)	8 (44.4)	
≥200 cells/mm <sup>3</sup>	3 (14.3)	1 (5.6)	
<b>Viral load</b>			.873
≤ 400 copies/mL	5 (23.8)	4 (22.2)	
401-3,000 copies/mL	1 (4.8)	1 (5.6)	
3,001-10,000 copies/mL	1 (4.8)	0 (0.0)	
10,001-100,000 copies/mL	3 (14.3)	4 (22.2)	
>100,000 copies/mL	11 (52.4)	9 (50)	
<b>Hemoglobin&lt;8g/dL</b>	4 (19.1)	5 (27.8)	.519
<b>Albumin≤2.7mg/dL</b>	4 (19.1)	8 (44.5)	.090
<b>Time between TB diagnosis and ART in naïve patients</b>			.549
< 2 weeks	5 (55.6)	4 (50)	
2 weeks - 8 weeks	3 (33.3)	4 (50)	
> 8 weeks	1 (11.1)	0 (0.0)	
<b>Concurrent opportunistic infection</b>			.173
No	16 (76.2)	10 (55.6)	
Yes	5 (23.8)	8 (44.4)	
<b>Concurrent extrapulmonary TB</b>			.718
<b>Disseminated TB (≥2 sites)</b>	14 (66.7)	11 (61.1)	.520
<b>Years since HIV diagnosis</b>	3 (14.3)	4 (22.2)	.138
<1 year	15 (83.4)	13 (62)	
>1 year	8 (38.1)	3 (16.7)	

<b>ICU hospitalization at enrollment</b>	4 (19.1)	0 (0.0)	...
--	----------	---------	-----

ART: antiretroviral therapy

Table 2. Major adverse events seen in both groups.

Adverse event	Control Group (n=21)	NAC Group (n=18)	
<b>Gastrointestinal disorders</b>			
Gastric fullness	0	1 (5.5)	...
Dysphagia	0	2 (11.1)	...
Nausea	1 (4.7)	3 (16.6)	NS
Vomiting	2 (9.5)	4 (22.2)	NS
Hepatotoxicity	7 (33.3)	10 (55.5)	NS
<b>Respiratory disorders</b>			
Dyspnea	0	1 (5.5)	...
<b>Other disorders</b>			
Pyrosis	0	1 (5.5)	...
Pruritus	0	1 (5.5)	...
Rash	1 (4.7)	0	...

NS: Non-Significant

Table 3. Grading of adverse events seen in both groups.

Adverse event	Control Group (n=21)		NAC Group (n=18)		Comparing number of participants
	Number of events	Number of participants (%)	Number of events	Number of participants (%)	
No events	...	6 (28.6)	...	2 (11.1)	NS
Any event, except death	33	13 (61.9)	41	14 (77.8)	NS
Grade 1	15	10 (47.6)	18	12 (55.6)	NS
Grade 2	10	7 (33.3)	12	7 (38.9)	NS
Grade 3	4	3 (14.3)	10	5 (27.8)	NS
Grade 4	4	2 (9.5)	1	1 (5.6)	NS
Death	...	4 (19.1)	...	5 (27.8)	NS

NS: Non-Significant

## 4.2. Resultados adicionais

Esse estudo teve como objetivo secundário a dosagem dos níveis de glutatona e de mediadores inflamatórios. Esse processo está sendo realizado em parceria com o Dr. Bruno Benzerril Andrade (ID Lattes: 5853710848006520) e equipe, no Laboratório de Inflamação e Biomarcadores da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia.

Os resultados parciais não encontraram diferenças entre os medidores inflamatórios (figura 2). Foram feitas redes de correlações do tipo “spearman” e em ambos os grupos não foram encontradas correlações negativas. A NAC parece ter afetado a relação entre os biomarcadores, com um *boost* inflamatório lido pelo aumento da complexidade no D14 (figura 3), o que pode ter sido responsável pela tendência de negativação de cultura maior nesse grupo. Entretanto, torna-se necessário finalizar as análises para concluir esse desfecho. O tratamento com NAC reduziu o estresse oxidativo e aumentou os níveis de glutatona (figura 4).

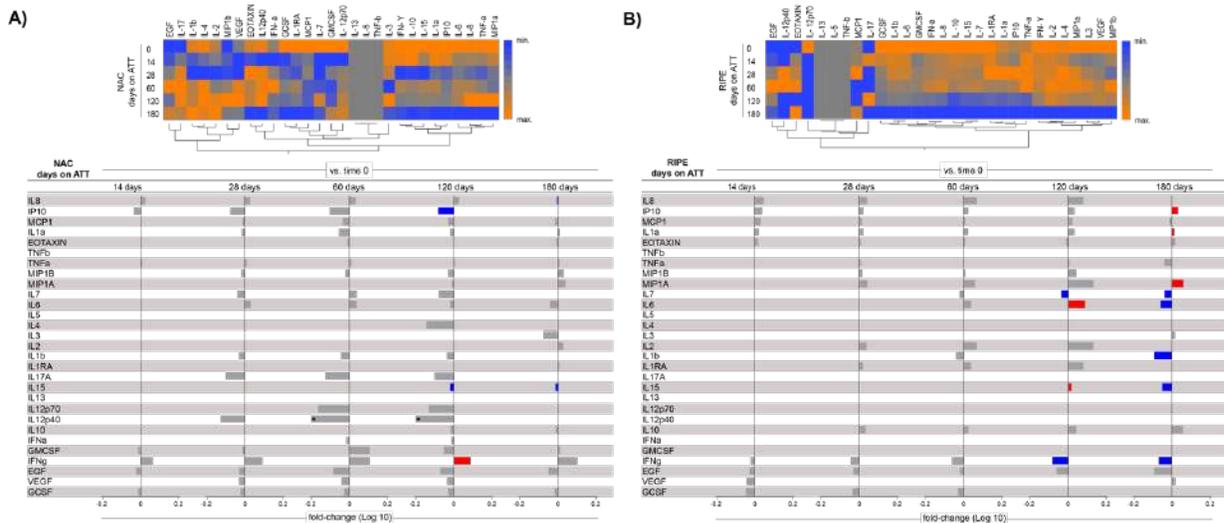


Figura 2: Alterações prospectivas em níveis de mediadores de inflamação em pacientes com TB sob tratamento anti-TB, em uso de NAC (A) e sem NAC (B).

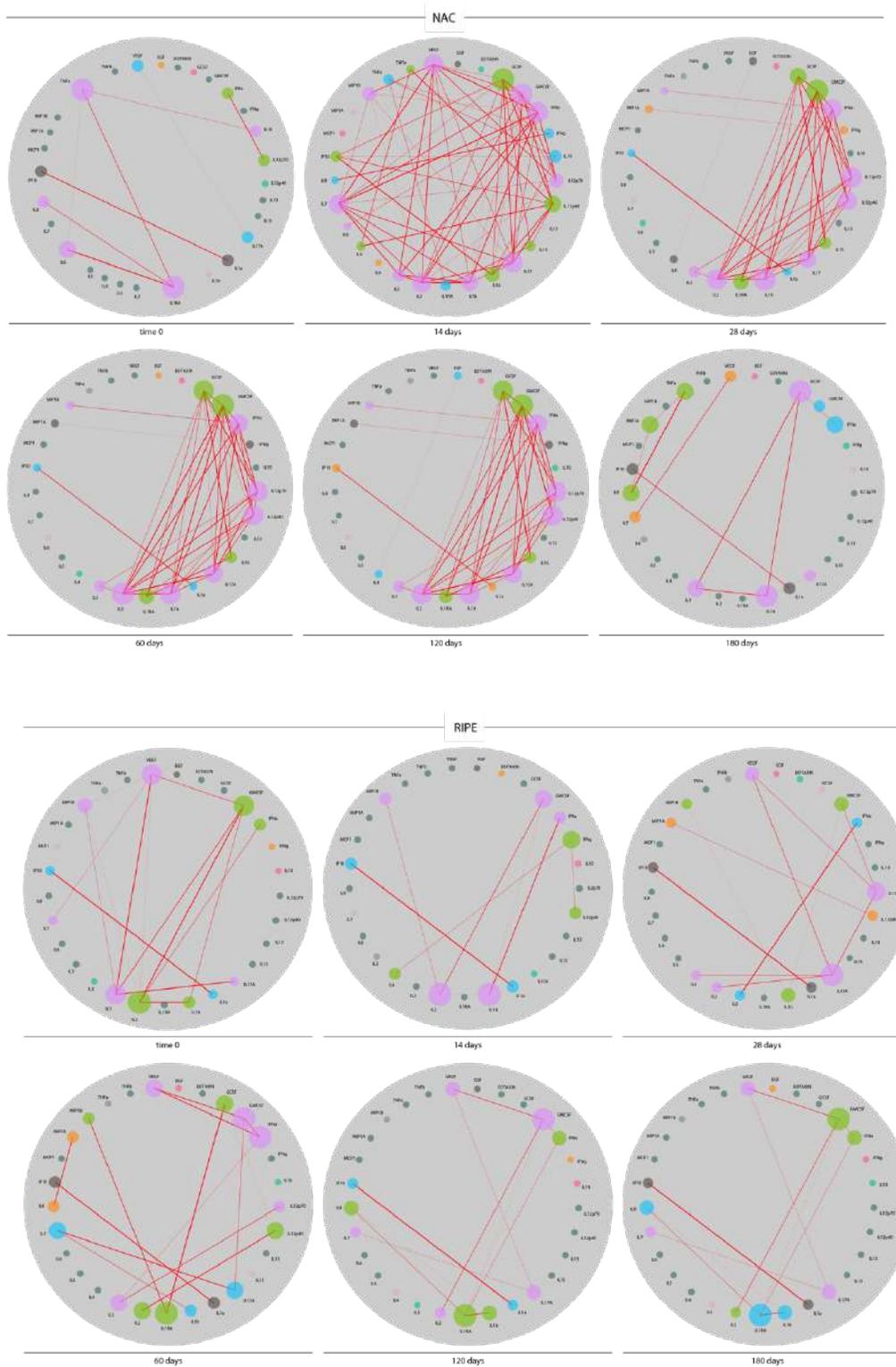


Figura 3: Análise de rede das matrizes de correlação de biomarcadores em diferentes pontos dos tratamentos com e sem NAC.

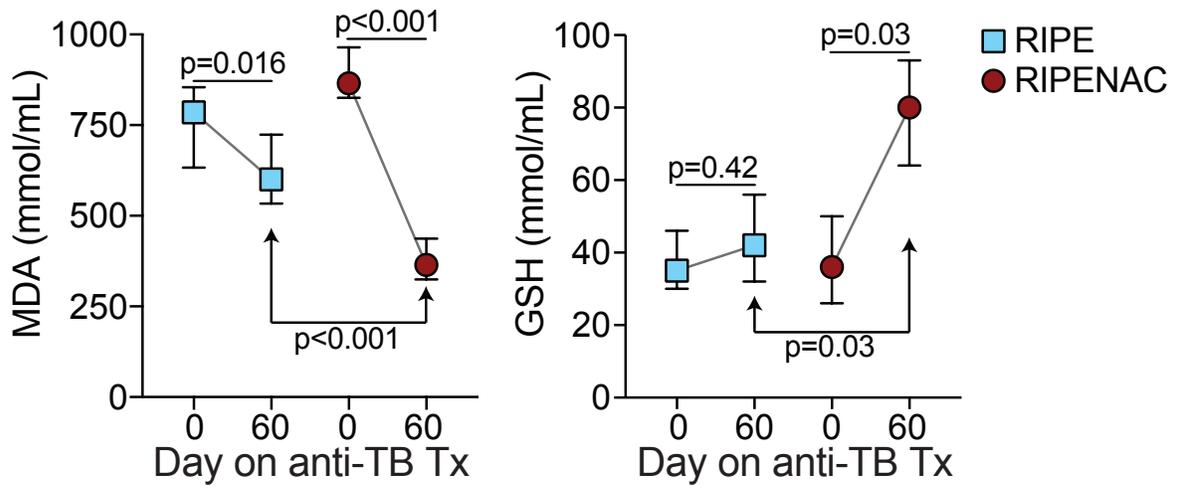


Figura 4: Medidas de peroxidação lipídica e glutatona.

## 5. DISCUSSÃO

Pacientes hospitalizados (entende-se como alguma gravidade clínica que levou o médico assistente a indicar a internação) foram a população-alvo desse estudo por terem maior chance de evoluir para óbito e, portanto, acreditamos que fossem mais propensos a se beneficiarem da intervenção. Optamos por não incluir pacientes tratados ambulatoriamente (não-graves), com a justificativa de que qualquer medicação adicional a quem já usa anti-TB, TARV e em alguns casos tratamento ou profilaxia de doenças oportunistas, só seria válida se um grande benefício fosse visto.

Para que uma terapia coadjuvante seja avaliada, estudos de segurança e eficácia são necessários para o início do processo de geração de evidências. A segurança foi o principal desfecho de interesse, considerando que pacientes hospitalizados com TB/HIV são um grupo especial de indivíduos com risco de interação medicamentosa. Os eventos adversos foram observados em proporções semelhantes nos dois grupos. Não houve diferença estatística quanto ao número total de eventos e suas graduações.

A hepatotoxicidade induzida por drogas anti-TB é uma das principais causas de interrupção do tratamento durante o curso de tratamento da TB que causa hospitalização (102). O risco relativo desse desfecho em indivíduos HIV é cerca de 4, mas sobe para 14 quando o vírus da hepatite C está presente (103). A coinfeção com o vírus B e C não foi encontrada nesse estudo. A hepatotoxicidade geralmente ocorre nos primeiros dois meses de tratamento, tempo pelo qual usamos NAC (104). Ao contrário de alguns estudos feitos em murinos e indivíduos não HIV, não foi observado no grupo NAC tendência em diminuir esse desfecho, sugerindo que o estresse oxidativo deva explicar parcialmente o dano hepático em coinfectados TB/HIV (67,105,106).

Está em andamento o estudo TB-SEQUEL, com desfechos semelhantes, mas com NAC na dose de 1.200 mg de 12/12h, em indivíduos HIV ( $CD4^+ >220$  células). (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03702738). No entanto, não há ensaios clínicos disponíveis com uso de NAC em pacientes internados com TB/HIV e, portanto, nenhum comparador será possível. Porém, existem estudos de suporte que sugerem benefícios

com uso de NAC. Um ensaio randomizado, placebo-controlado e duplo cego, feito com 48 pacientes com TB (não foi descrito se HIV positivos ou não), utilizou 1.200 mg de NAC, por dois meses, e observou melhora radiológica (redução do infiltrado pulmonar e do tamanho da cavitação) em 87,5% no grupo NAC em comparação a 33,3% no grupo placebo. Também foi vista conversão precoce da baciloscopia no grupo NAC (95,8%) comparada ao grupo controle (58,3%), ao final de 3 semanas (93). Os autores sugerem que a influência sobre a baciloscopia possa ter sido alcançada pelo aumento dos níveis de glutathione, que pode ter tido efeito direto no bacilo ou diminuído o estresse oxidativo favorecendo uma resposta Th1, uma justificativa plausível já que em outro estudo, a adição de NAC à cultura de neutrófilos infectados com *Mtb* elevou os níveis de glutathione e causou a morte do bacilo (71). Outros achados interessantes foram o aumento de peso e melhor reação a prova tuberculínica no grupo NAC, dois desfechos que não foram feitos em nosso estudo (93).

Não encontramos diferenças estatisticamente significativas nos desfechos de eficácia, embora a maioria dos intervalos de confiança de 95% favorecem o uso de NAC, em especial, a conversão da cultura, com de  $p=0,083$ . Esse é o único estudo com coinfectados TB/HIV que utiliza o exame padrão-ouro na cura microbiológica da TB, que é a cultura para micobactérias. Em relação a tendência favorável ao óbito, acreditamos que isso possa ser explicado pelo maior número de pacientes com infecções oportunistas, hipoalbuminemia e CD4 abaixo de 50 células, no grupo NAC.

Nós mostramos que a NAC reduz o estresse oxidativo e aumenta os níveis de glutathione (figura 4). A glutathione é um antioxidante que desempenha um importante papel no aprimoramento das funções imunológicas. Pessoas com HIV tem níveis mais baixos de glutathione no plasma, líquido epitelial do revestimento pulmonar, células mononucleares do sangue periférico e outras células sanguíneas (107–110). Essa diminuição de glutathione em células mononucleares está associada a um pior prognóstico. Herzenberg *et al.* mostraram que os níveis de glutathione são menores em indivíduos com CD4+ abaixo de 220 células e que isso prever uma diminuição na sobrevivência. A probabilidade de sobreviver de 2 a 3 anos aumenta a medida que os níveis de glutathione se aproximam do normal (111).

A interação entre Mtb e células granulomatosas do sistema imunológico inato e adaptativo resulta na secreção constante de citocinas, mais notavelmente, fator de TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$  (112,113). A NAC regula de maneira positiva a produção de citocinas pró inflamatórias e diminui a regulação de citocinas anti-inflamatórias. Viora *et al*, demonstrou que a NAC regula positivamente a secreção de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12 e IL-15 (114). Níveis elevados de IL-10 durante o curso do HIV podem contribuir para supressão imunológica, favorecendo infecções oportunistas, entre elas a TB. A IL-10 é produzida por macrófagos infectados com Mtb e o tratamento com NAC diminuiu os níveis dessa citocina (73). Nós não observamos diferenças entre os biomarcadores inflamatórios (figura 2), mas na rede de correlações (figura 3), a NAC parece ter afetado as relações entre eles, influenciando no ambiente inflamatório e talvez contribuído para a tendência da negatização da cultura. Mais análises são necessárias.

A principal limitação do estudo foi o tamanho reduzido da amostra, com perda do poder estatístico, o que não permitiu uma análise mais robusta. No entanto, o universo de pacientes elegíveis atendidos em uma unidade de referência não é muito maior e o estudo todo recrutou por 16 meses. Ainda que pequena, acreditamos que essa seja uma amostra peculiar, devido ao perfil dos indivíduos incluídos, que foram em sua maioria pacientes com imunossupressão grave. Mais homens foram registrados no grupo controle, o que pode ser explicado pelo acaso, pequeno tamanho da amostra ou pelo fato desse sexo apresentar mais coinfeção TB/HIV no mundo e no Brasil (96,116).

NAC é um medicamento aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). É uma droga estudada em diferentes linhas de pesquisa e uma dose padrão ainda não foi bem estabelecida. Ainda que tenhamos utilizado a mesma dose feita em estudos anteriores, isso é um assunto ainda a ser definido. Utilizamos 600 mg de 12/12 horas, mas há autores que utilizaram em indivíduos HIV não coinfectados com TB, de 800 mg/dia a 8.000 mg/dia, sem que isso tenha aumentado os efeitos colaterais (100). Treitinger *et al*, criticou a dose de 600mg/dia, pois os pacientes HIV positivos não recuperaram os níveis de cisteína e

glutathione, talvez devido à baixa disponibilidade de NAC, por dose insuficiente ou porque a dose foi tomada apenas uma vez ao dia (95). O fato de não ter sido dosado os níveis séricos da NAC é uma outra limitação do nosso estudo.

Nossos achados sugerem que NAC possa ser uma opção terapêutica útil em pacientes graves, coinfectados TB/HIV, que apresentam risco de atraso na conversão da cultura com o tratamento padrão, retardando a cura microbiológica (115). Além disso, acelerar o tempo de conversão da cultura é um passo importante para reduzir a carga bacilífera e, portanto, a transmissão da TB, especialmente no ambiente hospitalar, local em que esses doentes costumam permanecer internados e não raro com limitações de recursos de biossegurança. Apesar de ter sido um ensaio clínico aberto e sem supervisão, nenhum viés claro foi considerado pela equipe, mas uma abordagem multicêntrica fase III é necessária.

## 6. CONCLUSÃO

Apesar de ser uma doença potencialmente curável, TB continua sendo um problema de saúde pública mundial e atualmente é a doença infecciosa que mais mata no mundo. O tratamento padrão ainda que eficaz, enfrenta grandes barreiras para alcançar resultados melhores. A terapia adjuvante no tratamento da TB oferece uma nova estratégia que inclui a ativação de mecanismos de defesa ou a melhoria de danos aos tecidos, mas as evidências de ensaios clínicos randomizados ainda são escassas, motivo pelo qual esse estudo tem relevância. A NAC parece ser promissora, quando mostra tendência favorável na segurança e em desfechos exploratórios de eficácia, mas precisa de evidências mais robustas para que atinja pessoas que de fato irão se beneficiar. Mostramos que não houve diferença entre os grupos de coinfectados TB/HIV, quanto a segurança e a tolerabilidade. Sendo essa população a mais vulnerável a adquirir e morrer por TB, acreditamos que os achados desse estudo possam ser particularmente úteis para encorajar um ensaio fase III.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fogel N. Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis*. 2015.
2. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis Review. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;
3. Lawn SD ZA. Tuberculosis. *Lancet (Seminar)*. *Lancet*. 2011.
4. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Seminar: Tuberculosis. *Lancet*. 2003;
5. Comstock GW, Livesay VT, Woolpert SF. The prognosis of a positive tuberculin reaction in childhood and adolescence. *Am J Epidemiol*. 1974;
6. Sutherland I. Recent studies in the epidemiology of tuberculosis, based on the risk of being infected with tubercle bacilli. *Adv Tuberc Res*. 1976;
7. Sandhu G. Tuberculosis: Current situation, challenges and overview of its control programs in India. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2011.
8. DANIEL T. The history of tuberculosis Past, present, and challenges for the future. In: *Tuberculosis*. 2009.
9. Murray JF, Rieder HL, Finley-Croswhite A. The King's Evil and the Royal Touch: The medical history of scrofula. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016;
10. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med*. 2006;
11. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*. 2017.
12. Daniel TM. Hermann Brehmer and the origins of tuberculosis sanatoria. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;
13. Keshavjee S, Farmer PE. Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine. *New England Journal of Medicine*. 2012.
14. Arbex MA, Varella M de CL, de Siqueira HR, de Mello FAF. Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. parte 1: Fármacos de primeira linha. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2010.
15. Zumla A, Chakaya J, Centis R, D'Ambrosio L, Mwaba P, Bates M, et al.

- Tuberculosis treatment and management-an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2015.
16. WHO. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. WHO Publication. 2018.
  17. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença. *Bol epidemiológico*. 2019;
  18. Da Garrido MS, Bühner-Sékula S, De Souza AB, Ramasawmy R, De Quincó PL, Monte RL, et al. Temporal distribution of tuberculosis in the state of Amazonas, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015.
  19. Marreiro L da S, Cruz MA da, Oliveira M de NF de, Garrido M da S. Tuberculose em Manaus, Estado do Amazonas: resultado de tratamento após a descentralização TT - Tuberculosis in Manaus, state of Amazon: treatment outcome decentralization. *Epidemiol serv saúde*. 2009;
  20. BATISTA D. Aspectos epidemiológicos da tuberculose no Amazonas. *Bol Oficina Sanit Panam*. 1953;
  21. UNAIDS. Fact Sheet - Global AIDS Update 2019. UNAIDS. 2019;
  22. Souza SL, Feitoza P V, Araujo JR, Andrade R V, Ferreira LC. Causes of death among patients with acquired immunodeficiency syndrome autopsied at the Tropical Medicine Foundation of Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2008/08/23. 2008;41(3):247–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719803>
  23. Cox JA, Lukande RL, Lucas S, Nelson AM, Van Marck E, Colebunders R. Autopsy causes of death in HIV-positive individuals in sub-Saharan Africa and correlation with clinical diagnoses. *AIDS Reviews*. 2010.
  24. Sterling TR, Pham PA, Chaisson RE. HIV Infection–Related Tuberculosis: Clinical Manifestations and Treatment. *Clin Infect Dis*. 2010;
  25. Aaron L, Saadoun D, Calatroni I, Launay O, Mémain N, Vincent V, et al. Tuberculosis in HIV-infected patients: A comprehensive review. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004.

26. Padyana M, Bhat R V., Dinesha M, Nawaz A. Hiv-tuberculosis: A study of chest X-ray patterns in relation to CD4 count. *N Am J Med Sci.* 2012;
27. Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infectious Diseases.* 2006.
28. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2014.
29. Hongler J, Musaaazi J, Ledergerber B, Eberhard N, Sekaggya-Wiltshire C, Keller PM, et al. Comparison of Löwenstein–Jensen and BACTEC MGIT 960 culture for *Mycobacterium tuberculosis* in people living with HIV. *HIV Med.* 2018;
30. Ford N, Matteelli A, Shubber Z, Hermans S, Meintjes G, Grinsztejn B, et al. TB as a cause of hospitalization and in-hospital mortality among people living with HIV worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the International AIDS Society.* 2016.
31. Ford N, Shubber Z, Meintjes G, Grinsztejn B, Eholie S, Mills EJ, et al. Causes of hospital admission among people living with HIV worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Lancet HIV.* 2015;
32. Organization WH. WHO | Guidelines for treatment of tuberculosis. Who. 2010;
33. Ministério da Saúde (BR). Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde. 2017.
34. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC- SA 3.0 IGO. Global tuberculosis Report WHO 2018. WHO report. 2018.
35. Tiberi S, du Plessis N, Walzl G, Vjecha MJ, Rao M, Ntoumi F, et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *The Lancet Infectious Diseases.* 2018.
36. Zumla A, Maeurer M, Chakaya J, Hoelscher M, Ntoumi F, Rustomjee R, et al. Towards host-directed therapies for tuberculosis. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2015.
37. Zumla A, Rao M, Wallis RS, Kaufmann SHE, Rustomjee R, Mwaba P, et al.

- Host-directed therapies for infectious diseases: Current status, recent progress, and future prospects. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016.
38. Kaufmann SHE, Dorhoi A, Hotchkiss RS, Bartenschlager R. Host-directed therapies for bacterial and viral infections. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018.
  39. Lerner TR, Borel S, Gutierrez MG. The innate immune response in human tuberculosis. *Cellular Microbiology*. 2015.
  40. Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev*. 2015;
  41. Van Crevel R, Ottenhoff THM, Van der Meer JWM. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002.
  42. Marino S, Pawar S, Fuller CL, Reinhart TA, Flynn JL, Kirschner DE. Dendritic Cell Trafficking and Antigen Presentation in the Human Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* . *J Immunol*. 2004;
  43. Orme IM, Robinson RT, Cooper AM. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nature Immunology*. 2015.
  44. Lin PL, Flynn JL. Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. *J Immunol*. 2010;
  45. Teskey G, Cao R, Islamoglu H, Medina A, Prasad C, Prasad R, et al. The synergistic effects of the glutathione precursor, NAC and first-line antibiotics in the granulomatous response against *mycobacterium tuberculosis*. *Front Immunol*. 2018;
  46. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunology*. 2011.
  47. Shaler CR, Horvath CN, Jeyanathan M, Xing Z. Within the enemy's camp: Contribution of the granuloma to the dissemination, persistence and transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Immunology*. 2013.
  48. Kaufmann SHE. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology*. 2001.
  49. Rohde K, Yates RM, Purdy GE, Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis* and

- the environment within the phagosome. *Immunological Reviews*. 2007.
50. Poirier V, Av-Gay Y. Mycobacterium tuberculosis modulators of the macrophage's cellular events. *Microbes and Infection*. 2012.
  51. Shin DM, Jeon BY, Lee HM, Jin HS, Yuk JM, Song CH, et al. Mycobacterium tuberculosis eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling. *PLoS Pathog*. 2010;
  52. Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, Kishore U, Bhakta S. Mycobacterium tuberculosis: Immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*. 2012.
  53. Gideon HP, Flynn JL. Latent tuberculosis: What the host "sees"? *Immunol Res*. 2011;
  54. Cruz-Knight W, Blake-Gumbs L. Tuberculosis: An overview. *Primary Care - Clinics in Office Practice*. 2013.
  55. Ghezzi P. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. *International Journal of General Medicine*. 2011.
  56. Venketaraman V, Dayaram YK, Amin AG, Ngo R, Green RM, Talaue MT, et al. Role of glutathione in macrophage control of mycobacteria. *Infect Immun*. 2003;
  57. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Current Opinion in Pharmacology*. 2007.
  58. Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;
  59. Gil L, Martínez G, González I, Tarinas A, Álvarez A, Giuliani A, et al. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacol Res*. 2003;
  60. Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacology and Therapeutics*. 2014.
  61. Zheng JP, Wen FQ, Bai CX, Wan HY, Kang J, Chen P, et al. Twice daily N-acetylcysteine 600 mg for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (PANTHEON): A randomised, double-blind placebo-controlled trial.

- Lancet Respir Med. 2014;
62. Vijayamalini M, Manoharan S. Lipid peroxidation, vitamins C, E and reduced glutathione levels in patients with pulmonary tuberculosis. *Cell Biochem Funct.* 2004;
  63. Reddy YN, Murthy S, Krishna DR PM. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc.* 2004;
  64. Venketaraman V, Millman A, Salman M, Swaminathan S, Goetz M, Lardizabal A, et al. Glutathione levels and immune responses in tuberculosis patients. *Microb Pathog.* 2008;
  65. Palanisamy GS, Kirk NM, Ackart DF, Shanley CA, Orme IM, Basaraba RJ. Evidence for oxidative stress and defective antioxidant response in guinea pigs with tuberculosis. *PLoS One.* 2011;
  66. Alam K, Ghousunnissa S, Nair S, Valluri VL, Mukhopadhyay S. Glutathione-Redox Balance Regulates c-rel-Driven IL-12 Production in Macrophages: Possible Implications in Antituberculosis Immunotherapy. *J Immunol.* 2010;
  67. Baniasadi S, Eftekhari P, Tabarsi P, Fahimi F, Raoufy MR, Masjedi MR, et al. Protective effect of N-acetylcysteine on antituberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010;
  68. Amaral EP, Conceição EL, Costa DL, Rocha MS, Marinho JM, Cordeiro-Santos M, et al. N-acetyl-cysteine exhibits potent anti-mycobacterial activity in addition to its known anti-oxidative functions. *BMC Microbiol.* 2016;
  69. Dinicola S, De Grazia S, Carlomagno G, Pintucci JP. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. *European review for medical and pharmacological sciences.* 2014.
  70. Ly J, Lagman M, Saing T, Singh MK, Tudela EV, Morris D, et al. Liposomal Glutathione Supplementation Restores TH1 Cytokine Response to Mycobacterium tuberculosis Infection in HIV-Infected Individuals. *J Interf Cytokine Res.* 2015;
  71. Morris D, Nguyen T, Kim J, Kassissa C, Khurasany M, Luong J, et al. An elucidation of neutrophil functions against mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol.* 2013;

72. Allen M, Bailey C, Cahatol I, Dodge L, Yim J, Kassissa C, et al. Mechanisms of control of Mycobacterium tuberculosis by NK cells: Role of glutathione. *Front Immunol.* 2015;
73. Venketaraman V, Rodgers T, Linares R, Reilly N, Swaminathan S, Hom D, et al. Glutathione and growth inhibition of Mycobacterium tuberculosis in healthy and HIV infected subjects. *AIDS Res Ther.* 2006;
74. Guerra C, Morris D, Sipin A, Kung S, Franklin M, Gray D, et al. Glutathione and adaptive immune responses against mycobacterium tuberculosis infection in healthy and HIV infected individuals. *PLoS One.* 2011;
75. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991;
76. Deeks SG. HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. *Annu Rev Med.* 2011;
77. Morris D, Guerra C, Khurasany M, Guilford F, Saviola B, Huang Y, et al. Glutathione Supplementation Improves Macrophage Functions in HIV. *J Interf Cytokine Res.* 2013;
78. Götte H, Schüler A, Kirchner M, Kieser M. Sample size planning for phase II trials based on success probabilities for phase III. *Pharm Stat.* 2015;
79. D. N, S. M, S. G. Supplementation of N-acetylcysteine as an adjuvant in treatment of newly diagnosed pulmonary tuberculosis patients: A prospective, randomized double blind, placebo controlled study. *Eur Respir J.* 2013;
80. DAIDS. Division of Aids Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events Division of Aids Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events. *Natl Inst Allergy Infect Dis.* 2017;
81. Lee HY, Chae KO, Lee CH, Choi SM, Lee J, Park YS, et al. Culture conversion rate at 2 months of treatment according to diagnostic methods among patients with culture-positive pulmonary tuberculosis. *PLoS One.* 2014;
82. Blondel VD, Guillaume JL, Lambiotte R, Lefebvre E. Fast unfolding of communities in large networks. *J Stat Mech Theory Exp.* 2008;
83. WHO. WHO Global Tuberculosis Report 2018. *Pharmacological Reports.* 2018.

84. WHO. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care. World Health Organization. 2017.
85. Ford N, Matteelli A, Shubber Z, Hermans S, Meintjes G, Grinsztejn B, et al. TB as a cause of hospitalization and in-hospital mortality among people living with HIV worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the International AIDS Society*. 2016.
86. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*. 2003.
87. Morris D, Guerra C, Donohue C, Oh H, Khurasany M, Venketaraman V. Unveiling the mechanisms for decreased glutathione in individuals with HIV infection. *Clin Dev Immunol*. 2012;
88. WHO. WHO model list of essential medicines 20th edition. World Health Organization. 2017.
89. Tse HN, Raiteri L, Wong KY, Yee KS, Ng LY, Wai KY, et al. High-dose N-acetylcysteine in stable COPD: the 1-year, double-blind, randomized, placebo-controlled HIACE study. *Chest*. 2013;
90. Kritski A, Andrade KB, Galliez RM, Maciel ELN, Cordeiro-Santos M, Miranda SS, et al. Tuberculosis: Renewed challenge in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2018.
91. De Castro AZ, Moreira AR, Oliveira J, Costa PA, Da Graça CLAL, Pérez M de A, et al. Clinical impact and cost analysis of the use of either the Xpert MTB Rif test or sputum smear microscopy in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018;
92. El Bouazzi O, Hammi S, Bourkadi JE, Tebaa A, Tanani DS, Soulaymani-Bencheikh R, et al. First line anti-tuberculosis induced hepatotoxicity: Incidence and risk factors. *Pan Afr Med J*. 2016;
93. Mahakalkar S, Nagrale D, Gaur S, Urade C, Murhar B, Turankar A. N-acetylcysteine as an add-on to Directly Observed Therapy Short-I therapy in fresh pulmonary tuberculosis patients: A randomized, placebo-controlled, double-blinded study. *Perspect Clin Res*. 2017;
94. Araújo-Mariz C, Lopes EP, Acioli-Santos B, Maruza M, Montarroyos UR, De

- Ximenes RAA, et al. Hepatotoxicity during treatment for tuberculosis in people living with HIV/AIDS. *PLoS One*. 2016;
95. Treitinger A, Spada C, Masokawa IY, Verdi JCV, Silveira MVDS, Luis MC, et al. Effect of N-acetyl-L-cysteine on lymphocyte apoptosis, lymphocyte viability, TNF-alpha and IL-8 in HIV-infected patients undergoing anti-retroviral treatment. *Brazilian J Infect Dis*. 2004;
  96. Carvalho BM de, Monteiro AJ, Pires Neto R da J, Grangeiro TB, Frota CC. Factors related to HIV/tuberculosis coinfection in a Brazilian reference hospital. *Brazilian J Infect Dis*. 2008;
  97. Grutzmacher LK, Dalmarco EM, Blatt SL, Cordova CMM de. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* strains in southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;
  98. Ferreira MD, Neves CP das, Souza AB de, Beraldi-Magalhães F, Migliori GB, Kritski AL, et al. Predictors of mortality among intensive care unit patients coinfecting with tuberculosis and HIV. *J Bras Pneumol*. 2018;
  99. Aguirre S, Cuellar CM, Herrero MB, Cortesi GC, de Romero NG, Alvarez M, et al. Prevalence of tuberculosis respiratory symptoms and associated factors in the indigenous populations of Paraguay (2012). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;
  100. De Rosa SC, Zaretsky MD, Dubs JG, Roederer M, Anderson M, Green A, et al. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur J Clin Invest*. 2000;
  101. Mokhtari V, Afsharian P, Shahhoseini M, Kalantar SM, Moini A. A review on various uses of N-acetyl cysteine. *Cell Journal*. 2017.
  102. Hassen Ali A, Belachew T, Yami A, Ayen WY. Anti-Tuberculosis Drug Induced Hepatotoxicity among TB/HIV Co-Infected Patients at Jimma University Hospital, Ethiopia: Nested Case-Control Study. *PLoS One*. 2013;
  103. Dworkin MS, Adams MR, Cohn DL, Davidson AJ, Buskin S, Horwitch C, et al. Factors that complicate the treatment of tuberculosis in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;
  104. Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, De Lange WCM, Van Der Ven AJAM, Dekhuijzen R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date

- review. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2008.
105. Attri S, Rana S V., Vaiphei K, Sodhi CP, Katyal R, Goel RC, et al. Isoniazid- and rifampicin-induced oxidative hepatic injury - Protection by N-acetylcysteine. *Hum Exp Toxicol*. 2000;
  106. Farazi A, Masoomah S, Mansoureh J. Efficacy of N-Acetylcysteine on Prevention of Antituberculosis Drug- Induced Hepatotoxicity. *World J Med Sci*. 2015;
  107. Helbling B, Von Overbeck J, Lauterburg BH. Decreased release of glutathione into the systemic circulation of patients with HIV infection. *Eur J Clin Invest*. 1996;
  108. ECK H-P, GMÜNDER H, HARTMANN M, PETZOLDT D, DANIEL V, DRÖGE W. Low Concentrations of Acid-Soluble Thiol (Cysteine) in the Blood Plasma of HIV-1-Infected Patients. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1989;
  109. De Quay B, Malinverni R, Lauterburg BH. Glutathione depletion in HIV-infected patients: Role of cysteine deficiency and effect of oral N-acetylcysteine. *AIDS*. 1992;
  110. Buhl R, Holroyd KJ, Mastrangeli A, Cantin AM, Jaffe HA, Wells FB, et al. SYSTEMIC GLUTATHIONE DEFICIENCY IN SYMPTOM-FREE HIV-SEROPOSITIVE INDIVIDUALS. *Lancet*. 1989;
  111. Herzenberg LA, De Rosa SC, Dubs JG, Roederer M, Anderson MT, Ela SW, et al. Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;
  112. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus, Second Edition*. 2016.
  113. Cooper AM, Mayer-Barber KD, Sher A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunology*. 2011.
  114. Viora M, Quaranta MG, Straface E, Vari R, Masella R, Malorni W. Redox imbalance and immune functions: Opposite effects of oxidized low-density lipoproteins and N-acetylcysteine. *Immunology*. 2001;
  115. Aliyu MH, Salihu HM, Ratard R. HIV infection and sputum-culture conversion in patients diagnosed with Mycobacterium tuberculosis: A population-based study.

- Wien Klin Wochenschr. 2003;
116. Montales MT, Chaudhury A, Beebe A, Patil S, Patil N. HIV-Associated TB Syndemic: A Growing Clinical Challenge Worldwide. *Front Public Heal.* 2015;

## 8. ANEXOS

### 8.1. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

##### **Introdução:**

Você está sendo convidado (a) a participar deste projeto porque tem suspeita de tuberculose no ou porque recebeu esse diagnóstico recentemente. A tuberculose é causada por uma bactéria, tem cura, mas também pode ter complicações e, até mesmo, levar a morte se não diagnosticada rapidamente e tratada corretamente. Os sintomas da tuberculose são tosse seca ou com catarro há mais de duas semanas, febre, suor a noite mesmo com ar-condicionado ou ventilador, emagrecimento, cansaço, dor no peito e falta de ar. Por isso, todas as pessoas com esses sintomas devem investigar se estão ou não com tuberculose.

Para descobrir, é necessário examinar o catarro produzido pelos pulmões. Para fazer esse exame, é preciso escarrar em um pote, fornecido pelo hospital, e depois entregá-lo no laboratório para que o técnico analise esse catarro no microscópio para ver se tem ou não a bactéria da tuberculose

##### **Descrição sumária do projeto:**

Este projeto visa estudar a melhor e mais rápida maneira de diagnosticar a tuberculose por meio da coleta de catarro mais indicada para cada indivíduo e também estudar o tratamento de pessoas que estão em uso de medicamentos contra a tuberculose.

Queremos, dentre outras coisas produzir um sistema de pontuação, chamado **escore**, ele é realizado através de um questionário, perguntando seus sintomas e características sociais, além de avaliar seus exames de catarro, sangue, urina e

imagem. Um dos escores é para ajudar no diagnóstico e o outro para ajudar a decidir se o paciente com tuberculose é mais grave ou não.

Poderão participar deste estudo todos os pacientes abordados na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), seja ele, internado nas enfermarias, unidade de terapia intensiva (UTI) adulto ou em atendimento ambulatorial. Quando o paciente sozinho não puder decidir sua participação nesse projeto por alguma limitação de saúde, um familiar poderá autorizar. Dependendo do método mais adequado a você, a secreção do pulmão (catarro) será coletada mais de uma vez, ao longo do seu tratamento.

Algumas pessoas não conseguem produzir o catarro para o exame de laboratório e precisam de alguma ajuda. Caso você aceite participar, temos alguns métodos diferentes para ajudar:

**Escarro induzido** é uma inalação feita em jejum por pelo menos 2 horas. Essa inalação fará soltar o catarro das paredes do seu pulmão e fará você ter vontade de tossir e assim colocar o catarro para fora.

**Mini BAL e aspirado traqueal** são usados nos pacientes que estão na UTI e com um tubo na boca, a diferença entre elas é que uma será realizada com soro e a outra não. Será colocado uma sonda dentro do tubo que fica na boca, esta sonda será ligada a um sistema de sucção e quando essa sonda chegar ao pulmão irá sugar o catarro para dentro de um frasco coletor, será retirado nesse procedimento a quantidade igual ou superior a meia colher de chá. Será colocado em um frasco e os dois materiais serão encaminhados ao laboratório.

**String test** usa a secreção do estômago para confirmar a presença ou ausência da tuberculose. Para realizar esse exame você passará a noite em jejum, ao amanhecer, daremos a você uma cápsula enrolada com um fio de nylon para engolir, esta capsula descenderá até seu estômago e o fio ficará preso no canto de sua boca com uma fita, você

deverá permanecer com a cápsula por uma hora, após esse tempo, a cápsula terá sido desfeita restando apenas o fio que será puxado pela sua boca.

O seu tratamento contra a tuberculose será com quatro remédios, chamados de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol. Para facilitar, chamamos esse esquema de RIPE usando as letras iniciais de cada um. Você tomará o esquema RIPE por dois meses, depois, na mudança do segundo para o terceiro mês, haverá uma troca e você seguirá o tratamento apenas com dois remédios, rifampicina e isoniazida que, para facilitar, chamamos de RI.

Esses remédios serão tomados uma vez ao dia, em jejum ou duas horas após o seu café da manhã. O número de comprimidos dependerá do seu peso, sendo no máximo quatro comprimidos. Essas medicações e o tempo de tratamento (no mínimo seis meses) é igualzinho o que recomenda o Ministério da Saúde. Ou seja, participando ou não desse estudo, o tratamento da tuberculose será feito da mesma forma como ocorre em todo o Brasil.

Queremos ajudar a definir melhor as dosagens do tratamento contra a tuberculose, talvez algumas pessoas precisem de mais ou de menos remédio para tratar a doença. É importante lembrar que remédio de mais pode causar efeitos adversos, prejudicando órgãos como rim, fígado e coração e, remédio de menos não mata a bactéria, impedindo o paciente de melhorar. Por isso, você poderá ser convidado a avaliar quanto do remédio que pode tomar e se ele está indo, de verdade, para o seu sangue. Para isso serão realizadas dezesseis coletas de sangue ao longo de quatro dias. Mas, não se preocupe, você não receberá agulhadas o tempo todo. Essas coletas serão realizadas através de um acesso na sua veia, como já é realizado no dia-a-dia da internação, seja na UTI ou enfermarias.

Você também poderá ser convidado a associar um novo remédio para ajudar no seu tratamento. Será associado a esse tratamento da tuberculose um medicamento chamado Fluimucil®, que já é usado e recomendado para outras doenças no pulmão e

pode ajudar no tratamento da tuberculose, matando a bactéria mais rápido e protegendo o seu fígado. O comprimido do Fluimucil® é efervescente, ao colocá-lo em um copo de água ele irá se dissolver. É preciso tomá-lo de manhã e à noite, por dois meses. Ele tem um gostinho de limão. Não são todos os pacientes que usarão essa outra medicação porque para tentar provar o benefício dela, algumas pessoas irão usar e outras não.

### **A sua participação neste estudo:**

Se concordar em participar deste estudo, para que o seu tratamento funcione e você receba o diagnóstico de cura, você deve comparecer à todas as consultas agendadas, tomar corretamente todos os medicamentos que foram prescritos, além de realizar os exames complementares solicitados. Importante ressaltar que nenhuma medicação, bem como nenhum exame, feito dentro deste projeto, gerará custo a você.

Além disso, se você for mulher e tiver potencial para engravidar, nós solicitaremos que você forneça urina para fazermos um teste de gravidez no início do estudo. Solicitaremos que você faça o teste nas demais visitas apenas se houver suspeita de gravidez. Você não poderá participar ou continuar no estudo se estiver grávida ou amamentando.

### **Riscos e desconfortos:**

A coleta de amostras de sangue pode resultar em uma pequena dor ou vermelhidão associada com o uso da agulha. Todo o material usado será novo, estéril e descartável. A coleta das formas alternativas e habituais de catarro podem causar algum desconforto, como citado anteriormente, no entanto, são essenciais para o diagnóstico da tuberculose e que de forma geral é bem tolerado. Todos os procedimentos serão realizados em local apropriado e você será orientado (a) sobre como e onde obter as amostras. Caso haja alguma dúvida ou se você se sentir constrangido (a) com as

coletas, poderá pedir ajuda à equipe do estudo que tentará minimizar ao máximo o seu desconforto.

O *mini bal* e o aspirado traqueal podem provocar queda de oxigênio, aumento ou diminuição dos batimentos cardíacos ou da pressão arterial, lesão na mucosa do pulmão com possíveis sangramentos e estreitamento temporário da passagem do ar para os pulmões. Caso aconteça alguma intercorrência durante ou após o procedimento a equipe multiprofissional dessa unidade atenderá prontamente com as medidas protocoladas para a resolução do ocorrido.

**Benefícios:**

Você terá uma assistência integral durante a sua participação no projeto e ao mesmo tempo poderá contribuir para melhorar o conhecimento sobre o processo de diagnóstico, adoecimento, gravidade e cura da tuberculose no futuro.

**Custos:**

Não há nenhum custo para você. Além disso, deve ficar claro que não haverá remuneração direta associada à sua participação. Entretanto, caso ocorra algum dano permanente devido à sua participação você terá direito à indenização, sem contar a garantia de assistência médica durante todo o período do projeto.

**Uso do Material Coletado, Dados e Confidencialidade:**

Todo material coletado será mantido em local seguro. As suas informações demográficas (exemplos: idade, sexo, onde nasceu, e outras perguntas) e informações clínicas, obtidas durante o estudo através de entrevista, serão utilizadas para análise deste estudo e serão armazenadas em um sistema de dados onde somente pessoas autorizadas terão acesso. Nenhuma das suas informações pessoais será fornecida e sua confidencialidade será mantida.

Você tem direito de saber os resultados obtidos com a utilização do seu material e a receber orientações quanto às consequências destes resultados, caso haja alguma. Para isso você poderá contatar o (a) pesquisador responsável pelo estudo através do e-mail no fim deste documento.

Você poderá retirar o seu consentimento (desistir de participar do estudo) a qualquer tempo, sem nenhum prejuízo para você ou seu tratamento. Para isso, você deverá formalizar sua desistência através de um documento assinado e datado por você ou por seu familiar. A desistência será válida a partir desta data e nós destruiremos todo o seu material coletado.

### **Participação voluntária:**

Você pode participar ou não deste estudo. A sua participação é voluntária, cabe a você decidir se quer ou não participar. Não estamos oferecendo nada em troca pela sua participação. Caso aceite, você pode desistir de participar a qualquer momento retirando o seu consentimento, sem nenhum prejuízo para você ou seu tratamento. Seu familiar e/ ou você não precisa explicar porque não quer mais participar, deve apenas comunicar à equipe do estudo.

Caso você tenha lido e entendido as informações neste termo de consentimento – ou elas tenham sido lidas para você – e caso concorde ou autorize o seu familiar em participar voluntariamente deste estudo. Caso não tenha entendido muito bem, pode ficar à vontade para esclarecer qualquer dúvida, tome o tempo necessário para fazer as perguntas que você quiser. A equipe do estudo explicará qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Duas vias originais desse TCLE serão assinadas por você e pelo pesquisador, uma ficará com você e a outra com a equipe do estudo. Ao assinar este documento, você não abrirá mão de nenhum direito legal. Será também necessário que você e o

pesquisador rubrique todas as páginas, assegurando que todas foram lidas, o que garante ainda mais a sua proteção.

### **Retirado do estudo:**

A sua participação neste estudo será interrompida caso você não siga os procedimentos do projeto, se, na opinião do responsável do estudo, for o melhor para você, se o CEP decidir encerrar o estudo ou se você preencher os critérios de exclusão do projeto.

### **Questões:**

**Marcelo Cordeiro dos Santos**, Pesquisador responsável.

Fundação de Medicina Tropical - Dr. Heitor Vieira Dourado. Gerência de Tuberculose.

Avenida Pedro Teixeira, número 25, bairro Dom Pedro.

E-mail: [marcelocordeiro.br@gmail.com](mailto:marcelocordeiro.br@gmail.com)

Para emergências, telefones: Amanda Lia (92) 9 9322 7121, Cynthia Neves (92) 9 9116 4437, Izabella Safe (92) 9 9498 8610.

### **Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)**

Av. Pedro Teixeira, número 25, bairro Dom Pedro.

Horário de funcionamento: Segunda à sexta-feira, 08:00h às 14:00h.

E-mail: [cep@fmt.am.gov.br](mailto:cep@fmt.am.gov.br)

Telefone: (92) 2127-3572.

Nome do participante (letra legível) ou digital (para analfabeto ou impossibilitado de assinar no momento)	/ / Data
Assinatura do participante	: Hora
	/ /

_____ Nome do representante legal (letra legível/ se aplicável)	_____ Data
_____ Assinatura do representante legal	_____ :_____ Hora
_____ Nome da testemunha imparcial (letra legível/ se aplicável)	_____ /_____/_____ Data
_____ Assinatura da testemunha imparcial	_____ :_____ Hora
_____ Nome do profissional que aplicou o termo (letra legível)	_____ /_____/_____ Data
_____ Assinatura do profissional que aplicou o termo	_____ :_____ Hora

## 8.2. Carta de aceite do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

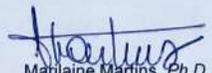


**AMAZONAS**  
GOVERNO DO ESTADO

**DECLARAÇÃO**

Declaramos para os devidos fins, com base no Parecer consubstanciado nº 1.774.751, datado de 14 de outubro de 2016, respectivamente, o projeto de pesquisa intitulado "RIPE VERSUS RIPE E N-ACETILCISTEÍNA EM INDIVÍDUOS COINFECTADOS TB/HIV: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO, FASE II", CAAE: 60219916.5.0000.0005, que tem como Pesquisador responsável o Dr. Marcelo Cordeiro dos Santos, a Instituição proponente a Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado-FMT-HVD e o Patrocinador Principal o Ministério da Saúde, foi devidamente **Aprovado** pelo Colegiado do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado - CEP/FMT-HVD.

Manaus, 24 de setembro de 2019.



Marilaine Martins, Ph.D.  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FMT-HVD  
Fundação de Medicina Tropical "Heitor Vieira Dourado",  
Av. Pedro Teixeira, 25 - D. Pedro - Manaus - AM  
Fone (+55)92 2127-3572, [cep@fmt.am.gov.br](mailto:cep@fmt.am.gov.br)

**Profª Drª Marilaine Martins**  
Comitê de Ética em Pesquisa  
FMT-HVD

---

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres  
Humanos – Fundação de Medicina Tropical Dr.  
Heitor Vieira Dourado FMT-HVD

Avenida Pedro Teixeira Nº 25, Bairro D. Pedro  
CEP 69040-000 – Manaus-Amazonas, Brasil  
FONE/FAX (92) 2127-3572 – PABX (92) 2127-3555  
E. Mail: [cep@fmt.am.gov.br](mailto:cep@fmt.am.gov.br)

### 8.3. Lista de artigos publicados durante o período

1. Teixeira R, Rodrigues MGA, Ferreira MD, Borges MC, **Safe I**, Melo GC, Spener R, Garrido MS, Monteiro WM, Siqueira AM, Lacerda MVG, Cordeiro-Santos M, de Souza Sampaio V. *Tuberculosis and malaria walk side by side in the Brazilian Amazon: an ecological approach*. Trop Med Int Health. 2019 Aug;24(8):1003-1010.
2. Pérez-Gómez AS, Monteiro WM, João GAP, Sousa JDB, **Safe IP**, Damian MM, Sachett JAG, Silva IMD. *Hemorrhagic stroke following viper bites and delayed antivenom administration: three case reports from the Western Brazilian Amazon*. Rev Soc Bras Med Trop. 2019 Jul 18;52:e20190115.
3. Spener R, **Safe I**, Baia-da-Silva DC, de Lacerda MVG, Cordeiro-Santos M. *Löffler's syndrome*. Int J Infect Dis. 2019 Sep 12. pii: S1201-9712(19)30373-X.

### 8.3. Lista de artigos submetidos:

- a) HIV infected female with thigh pain: case report.
- b) Nontuberculous mycobacterial infections after esthetic procedures: comparison of clinical features and treatment.
- c) Morphological and transcriptional changes in the human bone marrow during natural *P. vivax* malaria infections.
- d) Mini-bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in critically ill patients: proof of concept
- e) Management of yellow fever in the intensive care unit: Lack of evidence and still piggybacking on evidence from other diseases.
- f) Myopericarditis associated with acute Zika virus infection: a case report.
- g) Splenic tuberculosis in HIV-positive patient: a hard to sterilize reservoir?
- h) Acute cardiomyopathy secondary to Amphotericin-B: a case report.
- i) Acute Retroviral Syndrome Presenting as Acute Hepatitis: a case report.
- j) Neurological manifestations associated with parvovirus B19 infection.
- k) Dengue 4 in Manaus, Western Brazilian Amazon: characterization of clinical aspects during the first epidemic in the Amazonas state.
- l) Acute kidney injury in *Plasmodium vivax* malaria hospitalized patients in Manaus, Brazilian Amazon: are we underestimating the real burden?